



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

# **Detección y caracterización de tres aislados virales presentes en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) de Ecuador.**

Trabajo presentado por  
WILSON DAVID DÁVILA ALDAS  
para obtener el grado de  
MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

Director  
Doctor. Gustavo Germán Gómez  
Tutor  
Doctor. José Miguel Mulet Salort

Valencia, 2016

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar reconociendo a mi madre María Rosario Aldas y a mi padre Wilson Germán Dávila por las enseñanzas, el sacrificio, guía, que nos han brindado a mis hermanos y a mí. Gracias por enseñarnos a perseverar y luchar todos los días para ser mejores personas.

A Gustavo Gómez por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y haberme abierto las puertas del conocimiento.

A Lorena Corachan y a Maite Castellano por su ayuda desinteresada para aclarar las dudas surgidas en este trabajo.

A mi amigo y compañero de carrera y de laboratorio Antonio Bustamante por el apoyo brindado en el transcurso de este año.

Al apoyo incondicional que me ha dado mi novia Ana María Tito para poder alcanzar este nuevo objetivo que nos trazamos juntos al llegar a Valencia - España.

A mis amados hermanos Paola, Paúl y Adrián. A mi sobrino Felipe y mi cuñado Edwin, gracias por existir.

A mi primo Martín García y su esposa Silvia Chávez por su ayuda para que esta meta se materialice.

A mis abuelitos, tíos, tías, primas y primos; por su apoyo y conversaciones y hacerme sentir cerca de mi tierra y de mi gente.

No quiero olvidarme de las personas que conocí en Valencia, grandes amigos y personas: Pedro M, Pedro P, Verito, Adri, Telmo, Sofí, Esteban, Eli, Santi, Carlos, Estefi, Iván, Gabriel, Andrés, Emilia, Anita, Fernando, Jairo, Emilio.

A mis eternos amigos: Alberto, Mariel, Yosselin, Mafer, Choco, Lotty por la lucha y esfuerzo que hace cada uno por alcanzar nuevos objetivos.

Quiero citar una frase de Isaac Newton que refleja mi agradecimiento por poder alcanzar esta nueva meta: *"Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes"*.

*"La vida es un pájaro sin plan de vuelo que jamás volará en línea recta"*



## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
DESARROLLO DEL CONCEPTO DE VIRUS.....	3
VIRUS Y EL MECANISMO NATURAL DE RESISTENCIA DE LAS PLANTAS ....	6
DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE PLANTAS .....	7
Metodos que involucran propiedades del ácido nucleico viral.....	8
Tipo y tamaño del ácido nucleico.....	8
Patrones de segmentación DNA.....	8
Procedimientos de Hibridación .....	9
Hibridación en <i>Dot Blot</i> .....	10
Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	11
ASPECTOS BASICOS DE LOS VIRUS INCLUIDOS EN ESTE ESTUDIO.....	11
FAMILIA BROMOVIRIDAE .....	11
GENERO ALFAMOVIRUS .....	12
FAMILIA ALPHAFLEXIVIRIDAE .....	13
GENERO POTEXVIRUS .....	13
FAMILIA POTYVIRIDAE.....	14
GENERO POTYVIRUS.....	15
IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN DE CULTIVOS ASOCIADOS A LA INFECCION POR VIRUS .....	16
IMPORTANCIA DE CULTIVO DE PIMIENTO .....	16
IMPORTANCIA DE CULTIVO DE PIMIENTO EN ECUADOR .....	18
OBJETIVO GENERAL .....	20
Objetivos Específicos .....	20

MATERIALES Y METODOS.....	21
MUESTRAS DE PIMIENTO .....	21
ANÁLISIS MOLECULAR .....	21
Extracción de RNA total de pimiento.....	21
Hibridación molecular <i>Dot Blot</i> .....	22
Aplicación de RNA a la membrana.....	22
Pre-hibridación, hibridación y lavados de membrana .....	22
Revelado de la membrana.....	23
Análisis por RT-PCR.....	23
Electroforesis en gel de agarosa .....	25
Recuperación de los cDNAs de interés .....	25
Ligación de los cDNAs en un vector de clonación .....	25
Transformación de bacterias con el plásmido recombinante.....	26
Selección de clones para secuenciación .....	26
Análisis Bioinformática.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
Muestras de Pimiento .....	28
Hibridación molecular <i>dot blot</i> .....	30
RT-PCR .....	33
Detección de AMV, PVX y PVY .....	33
Ligación transformación y selección de los clones recombinantes.....	35
Análisis Bioinformático.....	36
Análisis de secuencia y Dendograma filogenético .....	41
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	49

## RESUMEN

Durante un estudio de enfermedades virales realizado en Noviembre del 2014 en la Provincia de Imbabura en Ecuador se observaron plantas de pimiento rojo (*Capsicum annuum*) que exhibían un mosaico amarillo, clorosis, enanismo y hojas deformadas. En Ecuador el pimiento tiene gran demanda en el mercado nacional e internacional. Generalmente se cultiva en campo abierto, la variación de los factores de producción es muy alta, pues el cultivo es susceptible a plagas y enfermedades lo que pone en evidencia la necesidad de implementar programas de control fitosanitario, inexistentes en este momento en Ecuador.

Para este trabajo se recolectaron muestras de plantas de pimiento sintomáticas localizadas en la parroquia Natabuela en el cantón Antonio Ante, con el objeto de determinar mediante técnicas moleculares de diagnóstico si estas alteraciones podían estar asociadas a infección con el *virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), *virus X de la patata* (PVX) y *virus Y de la patata* (PVY). Extractos de RNA total, extraídos a partir de cinco plantas sintomáticas se analizaron por hibridación en *Dot Blot* y por RT-PCR, con el objeto de determinar la presencia de estos agentes virales. Los resultados obtenidos en ambas pruebas de diagnóstico, indicaron que dos de las muestras analizadas estaban infectadas por AMV y una por PVX y PVY. Interesantemente, una de las muestras (M4) mostró una infección múltiple por los tres virus analizados. Mediante análisis informático de las secuencias parciales de la Proteína de Cubierta de cada virus se pudo inferir que estos aislados obtenidos en plantas de pimiento provenientes de Ecuador poseen altos niveles de homología (mayores del 95%) con otros aislados descritos en el continente Americano. Los resultados obtenidos en este trabajo, constituyen la primera descripción fehaciente de este tipo de patógenos virales en plantaciones de pimiento en Ecuador y significan el primer paso en el proceso de intentar establecer sistemas de control fitosanitario en ese país. Parte de esta investigación dio origen a un trabajo científico titulado “*First report of Alfalfa mosaic virus in red pepper plants in Ecuador*” publicado en 2015 en la revista de la Sociedad Americana de Fitopatología *Plant Disease*.

## ABSTRACT

During a study of viral diseases held in November 2014 in the Province of Imbabura in Ecuador a severe mosaic yellow, symptoms of chlorosis, dwarfism and leaves deformed were observed in many plants of red bell pepper (*Capsicum annuum*). In Ecuador the pepper has a great demand in the national and international market. It is generally grown in an open field, the variation of the factors of production is very high, because the crop is susceptible to pests and diseases which demonstrates the need to implement programs of phytosanitary control, non-existent at this time in Ecuador. For this work were collected samples of green pepper plants symptomatic located in the parish Natabuela in canton Antonio Suede to determine by molecular techniques for diagnosing if these alterations could be associated with the *alfalfa mosaic virus* (AMV), *potato X virus* (PVX), and *potato Y virus* (PVY). Extracts of total RNA obtained from five plants symptomatic were analyzed by hybridization in *Dot Blot* and RT-PCR, with the aim to determine the presence of these viral agents. The results obtained in both diagnostic tests, indicated that two of the samples tested were infected by AMV and one by PVX and PVY. Interestingly, one of the samples (M4) showed an infection multiple due to the three viruses analyzed. Through computer analysis of the partial sequences of the protein of coat for each virus could be deduced that these isolates obtained in green pepper plants from Ecuador possess high similarities (over 95 %) with other isolated previously described in other countries of the Americas. The results obtained in this work provide the first reliable description of this type of viral pathogens in plantations of pepper in Ecuador and constitute the first step in the process of trying to establish systems of phytosanitary control in that country. Part of this research has led to a scientific work entitled "***First report of Alfalfa mosaic virus in red pepper plants in Ecuador***" published in 2015 in the journal of the American Phytopathological Society *Plant Disease*

## DESARROLLO DEL CONCEPTO DE VIRUS

La raíz etimológica de la palabra virus proviene del latín “*virus-i*” y fue usada para describir un veneno o jugo nocivo para la salud. Hoy en día los virus se los define como agentes patógenos que afectan a plantas, animales, bacterias y hongos. (Genovés Martínez, *et al.*, 2008)

La invención de los filtros de porcelana en 1884 por Chamberland - quien trabajaba con Louis Pasteur - fue una de las herramientas que permitió el descubrimiento de los virus. Estos filtros tenían un tamaño de poro de (100 – 1000 nm) y podían ser usados para la remoción completa de bacterias y células conocidas hasta esa época a partir de líquidos en suspensión. Este invento permitió el establecimiento de una nueva ciencia – la virología -. El científico alemán Adolf Mayer publicó en 1886; su trabajo sobre la “enfermedad del mosaico” de tabaco o “mozaikziekte” la cual podía ser transmitida a otras plantas usando un extracto líquido de una planta infectada; que había sido filtrado a través de un papel y luego había sido frotada en las hojas de una planta sana, pero había concluido el resultado de su trabajo erróneamente diciendo que se trataba de una infección bacteriana. Luego, Dmitri Ivanovski en Rusia en 1892, había usado los filtros de porcelana con el extracto infeccioso de las plantas de tabaco con la enfermedad del mosaico, y concluyó que el agente causal de la infección era probablemente una toxina que aún era soluble y no era retenida por el filtro de porcelana. Posteriormente el científico holandés Martinus Beijerinck en 1898 reportó resultados similares con extractos purificados libres de bacterias, pero dio el paso conceptual y describió al agente del mosaico del tabaco como “un fluido infeccioso vivo” (“*contagium vivum fluidum*”), el extracto estaba completamente estéril y podía ser conservado durante varios años y seguir siendo infeccioso (Rybicki, 2012). Además encontró que la enfermedad del mosaico tenía la habilidad de multiplicarse a partir de una dilución y capaz de retornar a su concentración inicial en plantas vivas. Este resultado sugería que el patógeno no era una sustancia química (toxina) ya que era capaz de reproducirse en pasos seriales. El concepto de agente filtrable, muy pequeño para poder ser observado a través de la luz del microscopio pero capaz de causar una enfermedad había nacido (Lustig & Levine, 1992).

Entre 1900 y 1935, muchas enfermedades de plantas que eran causadas por “virus filtrables” habían sido descritas, pero existía una considerable confusión debido a que no se había desarrollado un método adecuado para distinguir un virus de otro. Smith en

1931 hizo una importante contribución que ayudó a clarificar esta situación. Trabajando con enfermedades causadas por virus en patata, se dio cuenta de la necesidad de utilizar indicadores en plantas, usando otras especies, que podrían reaccionar de manera diferente a los virus presentes en las patatas. Usando métodos novedosos y diferentes para separar los virus, fue capaz de mostrar que muchas de las enfermedades causadas por virus en las patatas eran causadas por la combinación de dos virus con diferentes propiedades, a los cuales los describió como X y Y. El virus X no era transmitido por el áfido *Myzus persicae*, y el virus Y sí lo era. De esta manera pudo aislar el virus Y del virus X. Ambos podían ser transmitidos por inoculación, pero Smith encontró que ciertas solanáceas eran resistentes al virus Y, al aplicar la mezcla de virus en *Datura stramonium* era capaz de obtener virus X libre de virus Y (Hull, 2002).

Conocer la concentración a la cual ciertos virus causaban infección en las plantas y su relativa estabilidad era de gran importancia. En 1926 Sumner, obtuvo la primera enzima, ureasa, aislada, cristalizada e identificada como proteína. En 1930, investigadores de varios países intentaron aislar y purificar un virus de planta usando métodos similares a los que fueron usados para la identificación de las enzimas. Siguiendo detalladamente el estudio químico sugirieron que el agente infeccioso del TMV podría ser una proteína, descrito como líquido cristalino nucleoproteico que contenía ácido nucleico de tipo pentosa, descrito en (Hull, 2002). Luego de esto se realizaron ensayos con microscopios de alta resolución y a partir del estudio comparativo de las propiedades físico-químicas de la nucleoproteína del virus y su cobertura proteica en TMV, se concluyó que el RNA del virus debía estar retenido dentro de la cubierta proteica.

Crick y Watson sugirieron, en 1956, que la proteína de cubierta estaba constituida de numerosas subunidades idénticas dispuestas como varillas helicoidales o como una estructura esférica con simetría cúbica. Markham y Smith, en 1949, aislaron TMV y mostraron que las preparaciones que contenían dos clases de partículas, una que contenía una nucleoproteína infecciosa con el 35% de RNA y la otra aparentemente idéntica que no tenía RNA y que no era infecciosa. Los resultados claramente indicaron que el RNA del virus era importante para su actividad biológica, descrito en (Hull, 2002).

Los virus están constituidos por RNA o DNA. Generalmente el genoma viral es una única molécula lineal de ácido nucleico de cadena simple o doble, y ciertos virus tienen su material genético segmentado. Algunos virus poseen cubierta proteica externa

llamada cápsida y las subunidades que la componen se llaman capsómeros. En el proceso de infección, se sintetizan nuevos genomas virales que luego se transportan de célula en célula usando factores de la célula huésped y proteínas codificadas por el genoma viral, al conjunto del material genético y cubierta se la conoce como virión (Genovés Martínez, *et al.*, 2008).

La mayor parte de virus que afectan a las plantas son de RNA de cadena simple con polaridad positiva. En estos virus, el RNA genómico es utilizado directamente como RNA mensajero para la síntesis de las proteínas virales que se encargan de la replicación, la hebra complementaria sirve como molde de nuevas hebras positivas, que serán el material genético de la progenie viral. En los virus de RNA de polaridad negativa, la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) encargada de copiar las cadenas positivas es encapsidada en el virión, mientras que el RNA de polaridad positiva sintetizado servirá de mensajero de las proteínas virales y de molde de nuevas cadenas de RNA negativas.

En el caso de los virus de RNA de cadena doble, la RNA polimerasa RNA dependiente, es la encargada de sintetizar los RNA mensajeros de las proteínas virales y los RNAs de doble hebra de los viriones.

Los retrovirus poseen dos copias de RNA, que sirve de molde para generar DNA viral de doble hebra, que se integra en el genoma desde donde es tratado como el resto de genes. La actividad enzimática que permite este proceso es una DNA polimerasa RNA dependiente (RdDp) codificada por el virus. Finalmente los virus de DNA transcriben y traducen sus genes igual que los sistemas biológicos celulares y de esta manera sintetizan el RNA mensajero (mRNA) a partir del DNA viral mediante la enzima RNA polimerasa DNA dependiente (DdRp) de la célula (Genovés Martínez, *et al.*, 2008).

Debido al tamaño reducido de los genomas virales, los virus usan diferentes estrategias para traducir varias proteínas a partir de la misma secuencia de nucleótidos: desplazamiento y solapamiento de pauta de lectura abierta (*ORF, open reading frame*), codones de parada débiles, organización multipartita del genoma o síntesis subgenómica. La síntesis y maduración de proteínas virales funciona gracias a la maquinaria ribosomal del huésped, estas proteínas pueden ser modificadas postraduccionalmente en el interior celular y/o ser procesadas por proteasas virales en el caso de sintetizarse como poliproteínas (Genovés Martínez, *et al.*, 2008).

## **VIRUS Y EL MECANISMO NATURAL DE RESISTENCIA DE LAS PLANTAS**

Las enfermedades de plantas causadas por virus existen en todo el planeta y afectan tanto a especies cultivadas como a plantas nativas. Los virus de planta son dependientes de un hospedero y/o un vector para sobrevivir. La eficiencia y la extensión de la propagación de la infección dependen de una planta como un factor importante para permitir que el virus sea accesible a su respectivo vector(es), los cuales a su vez permitirán su dispersión hacia nuevas plantas y cultivos (Murphy, 2006).

Los virus de plantas son genética y estructuralmente, simples agentes infecciosos pero su relación obligatoria e íntima con la planta hospedera es bastante compleja. La disponibilidad de variedades resistentes es la mejor aproximación para lograr la protección de los cultivos, pero existe la posibilidad de que otros virus o cepas virales sean capaces de superar este tipo de resistencia. Otra estrategia ha sido alterar los tiempos de cultivo para evitar la migración de los vectores, disuadir a los vectores usando coberturas y también el uso de cultivos trampa. Siendo la premisa básica detrás de estas aproximaciones retrasar la introducción del virus en los cultivos permitiendo así que las plantas maduren y lleguen a un estadio de desarrollo que le permita esencialmente tolerar la infección, lo que generalmente resulta en una reducción en los niveles de acumulación del virus y de las pérdidas en la producción (Murphy, 2006).

La habilidad de los virus de planta para infectar sistemáticamente su hospedero puede ser considerado como la consecuencia de una serie de interacciones entre el genoma viral y sus productos génicos, con el huésped. Una vez que el virus entra en la célula, es capaz de expresar cada una de sus proteínas, replicar su genoma, moverse de una célula a otra, y entonces tener acceso al sistema vascular del hospedero para moverse fuera del área donde se produjo la infección inicial. En cada etapa de este proceso debe haber un nivel básico de compatibilidad entre el virus y su huésped, de otra manera el proceso de infección terminaría prematuramente. Las plantas tienen la capacidad de reconocer y activar su defensa frente a la infección de un virus. Este concepto de defensa de las plantas fue desarrollado por H.H. Flor (Flor, 1971). Él propuso que los patógenos tienen una serie de genes de avirulencia (Avr) y que sus productos proteicos pueden ser reconocidos por los productos génicos de un sistema indicador de la resistencia de la planta, es decir que las proteínas virales que son reconocidas por los productos génicos

de la resistencia de la planta y podían ser considerados como productos génicos de Avr. Estos Avr y sus productos génicos pueden desencadenar la respuesta clásica hipersensible (HR), la cual causa la formación de lesiones necróticas en la zona afectada, también los Avr pueden desencadenar otro tipo de resistencia en la planta como lesiones locales necróticas en lugar de lesiones necróticas y en algunos casos, no es visible ningún tipo de respuesta en las plantas resistentes (Schoelz, 2006).

## **DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE PLANTAS**

Hay tres situaciones básicas en las que las técnicas para el reconocimiento y la identificación de un virus son necesarias: *i)* diagnóstico de una infección viral en campo para determinar el origen de una patología, *ii)* para la detección de un virus determinado, usualmente en una situación de cuarentena o epidemiología, *iii)* y para un virus conocido; cuando lo manipulamos y purificamos.

Para evaluar las ventajas de los diferentes métodos de diagnóstico, deben ser considerados estos importantes factores: *a)* Plantear la pregunta adecuada; determinar si la planta está infectada por un virus, que virus está infectándola, o que cepa del virus está en la planta; *b)* sensibilidad, cuan pequeña cantidad de virus puede ser medida o detectada; *c)* exactitud y reproducibilidad; *d)* número de muestras que pueden ser procesadas en un tiempo dado por un operador; *e)* costo y sofisticación de los aparatos y materiales necesarios; *f)* grado requerido de experiencia del operador y *g)* adaptabilidad a las condiciones de campo.

Se debe considerar que las plantas enfermas en campo pueden estar infectadas por más de un virus. Por ello un paso previo en el diagnóstico para una enfermedad desconocida debe ser determinar si más de un virus está involucrado. Los métodos empleados para la detección y diagnóstico se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con las propiedades del virus: actividad biológica, propiedades físicas de la partícula viral, propiedades de las proteínas virales y propiedades del ácido nucleico viral (Hull, 2009).

Los métodos biológicos para la detección y diagnóstico de virus suelen consumir mucho más tiempo que los métodos ahora disponibles. Para el diagnóstico en muchas circunstancias solo la inoculación en las especies hospederas apropiadas pueden

determinar si un aislado de un virus en particular causa una enfermedad leve o severa. Este método tiene un gran inconveniente especialmente cuando es usado con virus nuevos o en condiciones de cuarentena, porque se libera la posibilidad que la producción de las plantas infectadas puede ser una fuente de inóculo para los cultivos locales incluso en condiciones de estricto confinamiento (Murphy, 2006).

## **METODOS QUE INVOLUCRAN PROPIEDADES DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL**

Las propiedades generales de un ácido nucleico viral, son si es DNA o RNA, simple (ss) o doble cadena (ds). Sin embargo, con excepción de los dsRNA, estas propiedades son usualmente poco empleadas para el diagnóstico o detección rutinarias.

La habilidad para generar copias de DNA (cDNA) de partes o de todo el genoma RNA viral ha abierto muchas nuevas posibilidades. La secuencia nucleotídica del DNA copia puede ser determinada a pesar de que esto consume mucho más tiempo como procedimiento de diagnóstico. Las cuatro aproximaciones en las cuales se usa ácidos nucleicos para la detección y diagnóstico de virus están basadas en el tipo y tamaño molecular del ácido nucleico asociado al virión, patrones de segmentación de DNA viral o cDNA, hibridación entre ácidos nucleicos, y la reacción en cadena de la polimerasa (Hull, 2009).

### **Tipo y tamaño del ácido nucleico**

La doble cadena de RNAs está asociada con el RNA viral en dos formas: por ejemplo en el caso de los reovirus y los criptovirus que tienen genomas que consisten de piezas de RNA de doble cadena (dsRNA) como forma replicativa. La detección de estos dsRNA por la técnica electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), ha sido usada frecuentemente para el diagnóstico de este tipo de agentes virales (Hull, 2009).

### **Patrones de segmentación DNA**

La segmentación de cDNAs (sintetizados a partir del RNA genómico) y también de DNA viral -con enzimas de restricción- seguido por determinación de los patrones de fragmentación mediante la técnica de PAGE; permite en algunos casos, distinguir virus en grupos particulares (Hull, 2009).

## **Procedimientos de Hibridación**

Estos procedimientos dependen del hecho de que las moléculas de cadena simple de ácido nucleico de polaridad opuesta y con suficiente similitud en su secuencia nucleotídica puedan hibridar para formar una molécula de cadena doble. El modelo de Watson y Crick para la estructura de doble cadena de DNA muestra que las dos cadenas se mantienen juntas por puentes de hidrógeno específicos (complementariedad) entre las mismas (Adenina – Timina y Citosina – Guanina). Esta interacción de pares de bases es la base de la hibridación molecular.

En regla general, en los procesos de hibridación, existen dos etapas, la separación de pares de bases (desnaturalización del ácido nucleico) y la reintegración de las pares de bases (renaturalización o hibridación). Algunos factores que afectan la desnaturalización son la temperatura, composición de ácidos nucleicos, tipo y concentración de sal en el buffer, pH del buffer, presencia de solventes orgánicos, desajuste (mismatch) de pares de bases, etc. Los factores que afectan la re-asociación incluyen la temperatura, concentración de sal, mismatch de pares de bases, tamaño de fragmento del ácido nucleico, tipo de ácido nucleico (DNA y/o RNA), concentración de ácido nucleico, presencia de varios polímeros aniónicos, etc (Hull, 2009).

En el diagnóstico de virus por hibridación, el ácido nucleico a detectar se denomina diana y el ácido empleado como herramienta de detección, se denomina sonda. En muchos de los sistemas las dianas son inmovilizadas en una matriz sólida y la sonda es aplicada en estado líquido. La sonda, que posee secuencias complementarias a la secuencia diana, puede estar marcada con compuestos radioactivos o no radioactivos que permiten detectar cuando la hibridación tiene lugar.

Existen tres tipos de indicadores no radioactivos: los que modifican directamente las bases en la sonda de DNA, los que incluyen precursores (fosfatasa alcalina) en la sonda de DNA o RNA, y los que incorporan precursores marcados (nucleótidos biotinilados) en la sonda. La detección del grupo indicador es usualmente realizada por una enzima que genera un producto coloreado o un compuesto luminiscente que reacciona con un sustrato. El producto coloreado es insoluble (excepto en los productos coloreados de la reacción de ELISA). El exceso de sonda hibridada a la diana inmovilizada en la matriz

solida es removida previa su detección, esto se hace por lavados a una temperatura seleccionada y una concentración de sal determinada (Hull, 2009).

Debido al riesgo asociado con el uso de sondas radioactivas, su aplicabilidad ha ido decreciendo en los últimos años. Por el contrario, el uso de sondas de cDNA o RNA marcadas con digoxigenina (DIG) se ha incrementado notablemente como sistema de diagnóstico no radiactivo (Narayanasamy, 2008). El esteroide hapteno digoxigenina es detectado generalmente mediante anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con enzimas o grupos fluorescentes. En este sistema ha sido adaptado para permitir la hibridación de sondas marcadas con digoxigenina con DNA o RNA usando técnicas inmunológicas. Primero, un conjugado de fosfatasa alcalina de un anticuerpo anti-digoxigenina se une a la sonda hibridada. Entonces, el anticuerpo-sonda hibridado es visualizado con sustratos cromogénicos o quimioluminiscente alcalino. El sustrato cromogénico produce una señal colorida directamente en la membrana. Sustratos quimioluminiscentes más sensibles producen una señal de luz que puede ser convenientemente grabada con películas de rayos X (Khan & Dijkstra, 2006; Eisel, *et al.*, 2008)

### **Hibridación en *Dot Blot*.**

Esta técnica es uno de los procedimientos más comúnmente empleados en proceso masivos de diagnóstico, debido principalmente a su sencillez metodológica y bajo coste. Explicada de una manera general, la hibridación *Dot Blot* sigue los siguientes pasos principales: *i*) se extraen los ácidos nucleicos de la planta a ser analizada (también pueden emplearse extractos vegetales semi-purificados), *ii*) el ácido nucleico viral es desnaturalizado por calor o si se trata de DNA por un tratamiento alcalino. *iii*) una gota del extracto es aplicado en una membrana de Nylon, *iv*) la membrana se expone a luz ultravioleta para fijar el ácido nucleico, *v*) los sitios de unión no específicos en la membrana son bloqueados por una incubación en una solución de pre-hibridación que contiene una proteína que usualmente es albumina de suero bovino junto con sal y otros compuestos, *vi*) hibridación de un ácido nucleico marcado al ácido nucleico analizado unido a un sustrato, *vii*) lavado del exceso de sonda no hibridada y la estimación de la cantidad de sonda unida por un método apropiado al tipo de marcador usado para la sonda. La etapa de pre-hibridación (pueden ser dos horas) y la etapa de hibridación

(toda la noche) se lo realiza en un recipiente adecuado para temperaturas de alrededor de 65°C (Hull, 2009).

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

Los fragmentos de DNA de interés pueden ser enzimáticamente amplificados *in vitro* por la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). La técnica involucra la hibridación de oligonucleótidos cebadores sintéticos complementarios a la secuencia diana y la síntesis de múltiples copias de la secuencia de DNA complementario usando una DNA polimerasa estable. Como la PCR está basada en DNA, no es directamente aplicable para muchos virus de plantas que tienen genomas basados en RNA. Sin embargo, un cDNA puede ser generado de la región deseada del genoma del RNA usando oligonucleótidos y una transcriptasa reversa, lo que es usado como molde inicial para la amplificación por PCR. Este procedimiento conocido como RT-PCR ha demostrado ser una valiosa herramienta para la detección y diagnóstico de virus.

## **ASPECTOS BASICOS DE LOS VIRUS INCLUIDOS EN ESTE ESTUDIO**

### **FAMILIA BROMOVIRIDAE**

Los miembros de esta familia poseen un genoma tripartito con 8243 nucleótidos en total. Además el RNA subgenómico contiene el gen de la proteína de cubierta. Esta proteína es codificada en el extremo 3' del RNA 3.

Cada uno de los cuatro RNAs tiene una cubierta en el extremo 5' y una secuencia altamente conservada de 200 nucleótidos en el extremo 3'. Los 135 nucleótidos terminales de esta secuencia pueden ser empaquetados en estructuras de tRNA las cuales aceptan tirosina en una reacción similar a la aminoacetilación de los tRNAs (Hull, 2002).

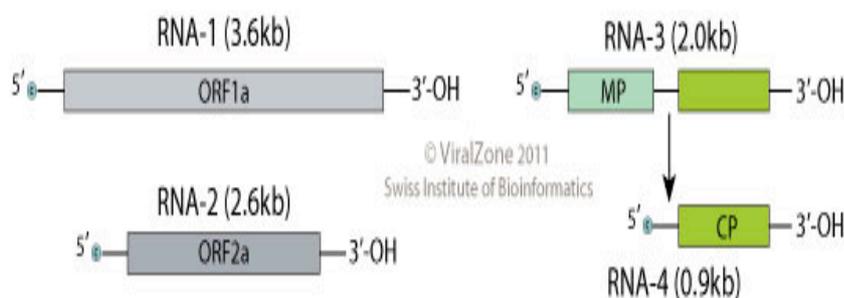
Los miembros de esta familia tienen una simetría icosaédrica, 26 – 35 nm en diámetro o partículas baciliformes cuya simetría está basada en un icosaedro. El RNA subgenómico para la proteína de cubierta esta frecuentemente encapsidado. En el género *Alfavirus*

los viriones de este género monoespecífico son baciliformes, 18 nm en diámetro y 30 – 57 nm de largo dependiendo de las especies de RNA (Hull, 2002).

## GENERO ALFAMOVIRUS

El *virus del mosaico de la alfalfa* -AMV- es miembro del género *Alfavirus* en la familia *Bromoviridae*. El AMV infecta con frecuencia y en ocasiones sin sintomatología a muchas herbáceas y algunas especies leñosas, es transmisible a más 51 familias de dicotiledóneas (Jaspars & Bos, 2005). AMV suele causar mosaicos, moteados y malformaciones en alfalfa (*Medicago sativa*), amarillamiento en hojas de guisante (*Pisum sativum*) y necrosis de tubérculo en patata (*Solanum tuberosum*) (Howard, *et al.*, 1994). Dieciséis especies de áfidos incluidos *Myzus persicae* pueden transmitir AMV (McLaughlin, 1991).

El genoma del AMV es tripartito, consiste de tres RNA de cadena simple (RNA1 a RNA3) de polaridad positiva (Hull, 2002). El RNA1 codifica una proteína 1 (P1) de 125 KDa que contiene un dominio metiltransferasa en el extremo N-terminal y un dominio helicasa en el extremo C-terminal. El RNA2 codifica la proteína 2 (P2) de 89 KDa la cual contiene un dominio polimerasa. El RNA 3 es bicistrónico y codifica la proteína de movimiento (MP) de 300 aminoácidos y la proteína de la capsida (CP). La CP es traducida a partir del mensajero subgenómico (RNA4) el cual es sintetizado durante la replicación del RNA3 (Trucco, *et al.*, 2014).



**Figura 1. Organización genómica del AMV. Composición tripartita de RNA positivo de cadena simple.**

RNA genómico sirve como RNA mensajero, RNA 1 y RNA 2 codifican respectivamente las proteínas 1 y 2, ambos relacionados en la replicación genómica y la transcripción interna del RNA4 subgenómico. Los RNA 3 y 4 son traducidos respectivamente en las proteínas de movimiento y la cápsida

## FAMILIA ALPHAFLEXIVIRIDAE

La familia *Alphaflexiviridae* pertenece al orden Tymovirales y está compuesta por seis géneros: *Allexivirus* (8 especies), *Botrexvirus* (1 especie, Micovirus), *Lolavirus* (1 especie), *Mandavirus* (1 especie), *Potexvirus* (35 especies), y *Sclerodarnavirus* (1 especie, Micovirus). Este grupo taxonómico posee viriones filamentosos entre 470 a 800 nm y 12 – 13 nm de diámetro, constituidos por subunidades de una sola CP. Son virus monopartitos con RNA de sentido positivo con tamaños de 5,4 a 9 Kb. Su primer marco de lectura abierto (*ORF*) codifica para una RdRp tipo *potex* y poseen TGB que se expresan a partir de un RNA subgenómico (ARNsg).

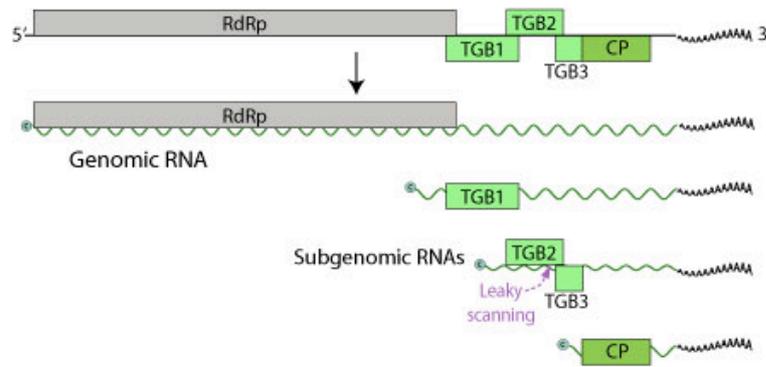
El extremo 5' tiene una cobertura de metilguanosa y su extremo 3' tiene una cola poly – A (Gil & Marín, 2010). Su genoma varía entre 6,400 a 9,300 nucleótidos (Huang, *et al.*, 2004) (Khan & Dijkstra, 2006). En el extremo 5' se encuentra una proteína replicasa tipo alfa constituida por motivos metiltransferasa, helicasa y RdRp y hacia el extremo 3' está el gen codifica la proteína de la cápsida (CP), que codifica proteína de 22 a 44 KDa (Khan & Dijkstra, 2006).

## GENERO POTEXVIRUS

Los miembros de este género han sido reportados en un amplio rango de especies de plantas herbáceas y leñosas, mono y dicotiledóneas. Muchos de estos virus tienen efectos relativamente leves en sus hospederos, son moderadamente patogénicos y suelen causar mosaicos. El citoplasma de las células infectadas del huésped es fibroso, porque existen agregados de las partículas virales frecuentemente acumulados en la membrana lo cual no es una citopatología específica de los Potexvirus (Fauquet, *et al.*, 2005). Uno de los virus representativos de este género, es el *virus X de la patata PVX*.

Los viriones de PVX son filamentosos y flexibles y tienen un tamaño aproximado de 470-580 nm. La molécula de RNA contiene cinco *ORF* y su tamaño es de 6,4 Kb. El RNA genómico es responsable de la expresión del *ORF1*, que contiene los motivos metiltransferasa, helicasa y polimerasa. Los *ORF 2, 3 y 4* son solapados y constituyen el TGB, que codifica las proteínas de 25, 12 y 8 KDa respectivamente, y que están relacionadas con el movimiento del virus célula a célula (Khan & Dijkstra, 2006). La

*ORF 5* codifica para la proteína de la capsida (CP) (Khan & Dijkstra, 2006) (King, *et al.*, 2012). El RNA genómico de PVX tiene una estructura de cubierta en el extremo 5' y una cola poly - A en el extremo 3' (Skryabin, *et al.*, 1988).



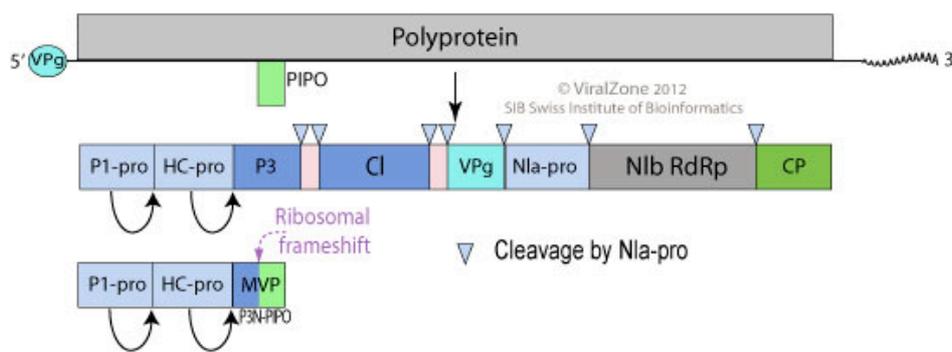
**Figura 2. Organización del genoma de un *Potexvirus* en los recuadros se indican los *ORF*.** Se ilustra la formación de los ARNsg que originan las proteínas de movimiento TGB y CP.

## FAMILIA POTYVIRIDAE

Dentro de esta familia se encuentran algunos géneros como, *Brambyvirus* (1 especie), *Bymovirus* (6 especies), *Macluravirus* (6 especies), *Potyvirus* (143 especies) y *Rymovirus* (3 especies). Es la familia de virus de plantas más numerosa. Con especies que se caracterizan por su morfología filamentosa, flexuosas y con simetría helicoidal (Khan & Dijkstra, 2006). Su RNA es de cadena sencilla con sentido positivo. Cada RNA tiene un solo *ORF* que traduce una poliproteína de 340 – 370 KDa que es procesada para dar lugar a las proteínas funcionales del virus. Su genoma es de 10 Kb rodeado por alrededor de 2000 copias de la proteína de la cápsida (CP) (Urcuqui-Inchima, *et al.*, 2001). La familia *Potyviridae* se caracteriza por inducir inclusiones cilíndricas citoplasmáticas (CI). Estas CI contienen proteínas codificadas por el genoma viral que poseen actividad adenosín trifosfatasa (ATPasa) y helicasa. Otra proteína viral, HC-Pro (*Helper component protease*) genera inclusiones amorfas (AI) asociadas con organelas degradadas de la célula con partículas virales, que tiene funciones de proteinasa y se asocia a la transmisión del vector (Khan & Dijkstra, 2006).

## GENERO POTYVIRUS

El genoma de este género contiene un solo marco de lectura abierto; que codifica una poliproteína de 340 -370 KDa (Riechmann, *et al.*, 1995) la cual es procesada por tres proteasas en siete proteínas pequeñas: P1; componente asistente (*helper component*), P3; inclusión cilíndrica (CI), Inclusión nuclear A (NIa); inclusión nuclear B (NIb), Proteína de la cápsida (CP) y dos proteínas putativas denominadas 6K1 y 6K2 (Riechmann, *et al.*, 1992).



**Figura 3. Organización del genoma de un Potyvirus. RNA genómico asociado a VPg hacia el extremo 5'' y la poly-A en el extremo 3''.**

La clasificación de los aislados de PVY se ha basado en diferentes criterios. La clasificación biológica de las cepas de PVY se ha hecho dependiendo del hospedero del cual se aislado cada cepa del virus, según esto; el tabaco y el tomate pueden ser infectados por muchas, pero no todas, las cepas de PVY (Morel, *et al.*, 2000). Históricamente se han descrito comúnmente tres grupos de PVY; basados en sus propiedades biológicas, serológicas y respuesta de resistencia. Las más comunes la cepa (PVY<sup>0</sup>), la cepa línea punteada (PVY<sup>C</sup>) y la cepa vena necrótica (PVY<sup>N</sup>) que han sido tipificadas basándose en los síntomas que inducen en líneas seleccionadas de patata que tiene diferentes genes de resistencia. (Aramburu, *et al.*, 2006).

## **IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN DE CULTIVOS ASOCIADOS A LA INFECCION POR VIRUS**

Podría decirse, que en general, las actividades humanas son una de las principales causantes de provocar nuevas interacciones entre los virus y las plantas. La intervención antropogénica incluye el cambio del uso del suelo, decrecimiento de la biodiversidad, la introducción de nuevas plantas y nuevas especies de vectores a ambientes nativos y la modificación a gran escala de las condiciones atmosféricas y climáticas. La emergencia de un nuevo agente patogénico, puede ocasionar importantes pérdidas en la producción de un cultivo por un corto o largo periodo de tiempo. Los virus que causan epidemias en los mayores cultivos de importancia agronómica, representan una amenaza seria para la seguridad alimentaria mundial. Como patógenos intracelulares estrictos, no pueden ser controlados usando tratamientos químicos o tratamientos que eviten la infección viral (tratamiento profiláctico), pues implican la destrucción de las plantas infectadas (Nicaise, 2014).

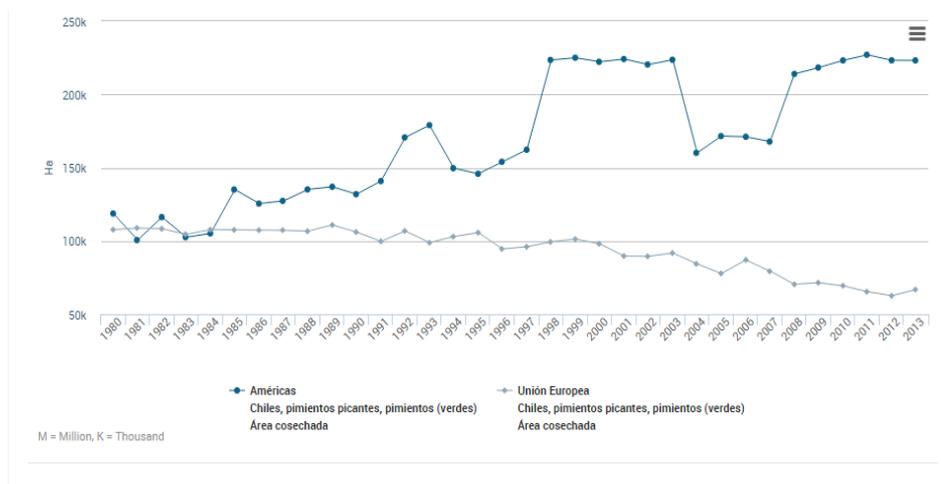
El manejo de las enfermedades virales es muy importante para los agricultores, horticultores, silvicultores, procesadores de alimentos, etc. Las enfermedades virales en diferentes cultivos causan enormes pérdidas alrededor de todo el planeta en términos de cantidad/ calidad de los productos. A pesar de que es muy complicado tener una idea clara del impacto financiero que las infecciones virales causan a la agricultura, se ha estimado que las pérdidas de rendimiento, a nivel mundial, que pueden atribuirse a los virus de plantas oscilan en \$ 30 mil millones anuales (Sastry & Zitter, 2014).

Es importante tener en cuenta que las enfermedades de los cultivos perennes y frutales no solamente conllevan a la pérdida del cultivo sino también la pérdida de tiempo y el costo de llevar a las plantas a la edad productiva. También deben considerarse las pérdidas de trabajar con otros cultivos que podrían haber crecido en la tierra durante ese tiempo, o sea, el valor de la tierra con y sin producción.

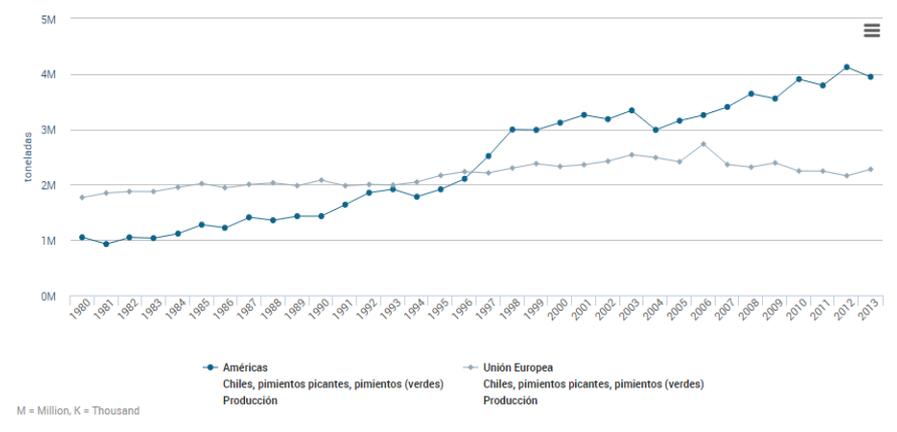
## **IMPORTANCIA DE CULTIVO DE PIMIENTO**

El pimiento es miembro de la familia *Solanaceae*. Es diploide y esta cercanamente relacionado con el cultivo de la patata, tomate, berenjena, tabaco y petunia. Muchos miembros de la familia Solanácea si bien tiene el mismo número de cromosomas ( $n = 12$ ), difieren drásticamente en el tamaño del genoma.

El pimiento es uno de los más viejos cultivos domesticados en el Hemisferio Occidental (Aguilar-Meléndez , *et al.*, 2009). Es la especia más cultivada en todo el mundo y considerado como ingrediente principal culinario. El pimiento tiene una amplia variedad de usos incluyendo la industria farmacéutica, agentes colorantes naturales y cosméticos, también como planta ornamental y como ingrediente activo en la mayoría de repelentes. Provee muchas vitaminas esenciales, minerales y nutrientes esenciales requeridos en la dieta básica humana (Marín, *et al.*, 2004). El cultivo de pimiento se considera como una fuente de ingresos para los pequeños productores en muchos países en desarrollo (Green & Kim, 1991). Hasta el 2013 en las Américas y la Unión Europea la producción de pimiento se incrementó en cerca de 6 millones de toneladas y la superficie cultivada en aproximadamente 290000 hectáreas (Estadísticas de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas-FAO) (Figuras 4 y 5). En la última década la producción mundial de pimiento se incrementó en un 40% (Kim, *et al.*, 2014).



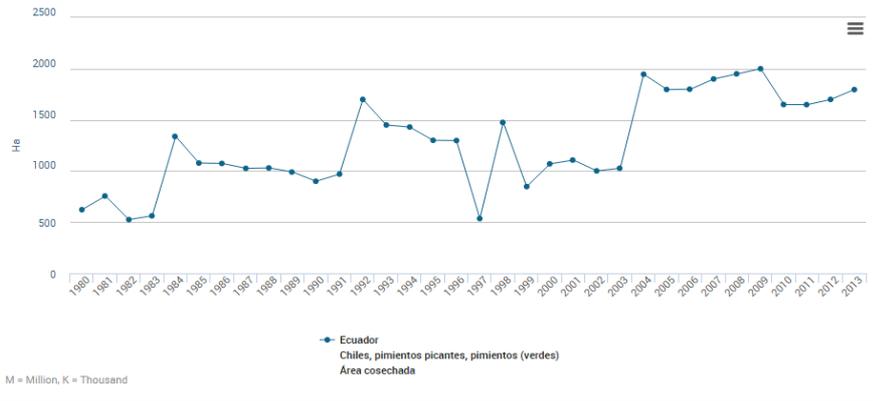
**Figura 4. Área cosechada de chiles, pimientos picantes, pimientos verdes en las Américas y la Unión Europea en las tres últimas décadas. 223´191 Ha en las Américas y 66´829 Ha en la Unión Europea.**



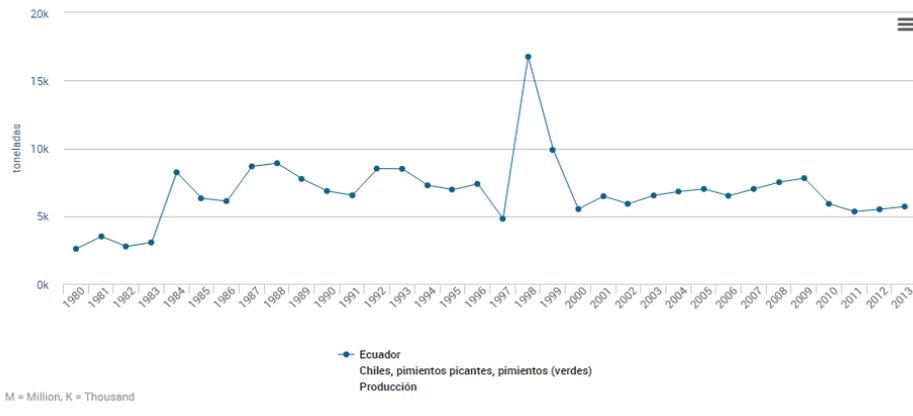
**Figura 5. Toneladas producidas de chiles, pimientos picantes, pimientos verdes en las Américas y la Unión Europea en las tres últimas décadas, 3'948'382 toneladas en las Américas y 2'227'590 toneladas en la Unión Europea**

## IMPORTANCIA DE CULTIVO DE PIMIENTO EN ECUADOR

En Ecuador el pimiento tiene gran demanda en el mercado nacional e internacional. Generalmente se cultiva en campo abierto, la variación de los factores de producción es muy alta, pues el cultivo es susceptible a plagas y enfermedades lo que ha causado como efecto colateral el uso de agroquímicos, elevando los costes de producción. En Ecuador la producción de pimiento en el 2013 fue estimada en 5,700 toneladas producidas en 1,700 Ha (FAO, 2015) (Figuras 6 y 7). A pesar de que el 90% de la producción total es destinada al consumo interno, actualmente está bajo consideración permitir la importación de pimiento fresco a los Estados Unidos desde Ecuador (Ferguson, 2015). Para permitir su importación, la fruta tendría que ser producida de acuerdo a un enfoque de sistemas que deben incluir requisitos como las inspecciones de pre-cosecha, plantas de producción, y los procedimientos de empaque. Además el producto deberá estar acompañada por un certificado fitosanitario emitido por la Organización Nacional de Protección de plantas (*NPPO, National plant protection organization*) de Ecuador, indicando que el envío fue producido y preparado para la exportación de acuerdo con los requerimientos establecidos. Lo que si bien garantiza la protección contra la introducción de pestes en los procesos de exportación, pone en evidencia la necesidad de implementar programas de control fitosanitario, inexistentes en este momento en Ecuador.



**Figura 6. Área cosechada de chiles, pimientos picantes, pimientos verdes en Ecuador en las tres últimas décadas, 1,796 Ha en el 2013.**



**Figura 7. Toneladas producidas de chiles, pimientos picantes, pimientos verdes en Ecuador en las tres últimas décadas, 5,700 toneladas en el 2013.**

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo de final de Máster es la detección y caracterización de tres aislados virales presentes en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) procedentes de Ecuador.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar mediante ensayos de hibridación molecular con sondas específicas la presencia de AMV, PVX y PVY en zonas productoras de Ecuador.
- Confirmar los resultados positivos procedentes del ensayo de hibridación molecular mediante RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para cada virus.
- Caracterizar, mediante análisis bioinformático de las regiones genómicas obtenidas, los aislados identificados en Ecuador.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **MUESTRAS DE PIMIENTO**

Se recolectaron hojas de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) del tipo puntón *lamuyo* variedad *martha*, que mostraban síntomas similares a los asociados con infecciones virales. Las muestras analizadas procedían de plantas de cultivos comerciales situados en la parroquia Natabuela del cantón Antonio Ante en la provincia de Imbabura en Ecuador.

### **ANÁLISIS MOLECULAR**

Se recolectaron hojas laterales y apicales de plantas sintomáticas de pimiento que se mantuvieron a 4°C hasta su liofilización. Una vez liofilizadas las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al IBMCP (UPV-CSIC). A partir de estas muestras se extrajo el RNA total, que se utilizó en pruebas de hibridación por *Dot Blot* y amplificación por RT-PCR, tal como se describe en los siguientes apartados.

#### **Extracción de RNA total de pimiento**

Para la extracción de RNA total, se usó material vegetal previamente pulverizado con nitrógeno líquido, 100 mg de este pulverizado fueron homogenizados en 1ml de *Trizol* (TRI REAGENT™) y se dejaron reposar durante 5 minutos. A continuación se transfirió el contenido a un tubo *ependorf* y se añadió cloroformo (0,2 ml de cloroformo por cada ml de *Trizol*); se agitó durante 15 segundos en un vórtex y se dejó reposar durante unos minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó la mezcla a 12,000 g/15 minutos a 4°C [Centrifuga, *ependorf* 5424R], y se recuperó el sobrenadante con cuidado de no tomar la interfase. A la fase acuosa se le añadió isopropanol (0,5 ml de isopropanol por cada ml de *Trizol*), manteniendo la relación 1:1 con la fase acuosa resultante de la centrifugación y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se centrifugó a 12,000g/10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 20 µl de agua destilada. El RNA se almacenó a -20°C para evitar su degradación.

### **Hibridación molecular *Dot Blot***

EL RNA extraído se sometió a un ensayo de hibridación *Dot Blot*, método simplificado de análisis en el que la muestra de RNA total se deposita directamente sobre la membrana de nylon para ser sometido a un proceso de hibridación (Mandic, *et al.*, 2008) usando como sondas transcritos específicos marcados con digoxigenina complementarios a la secuencia los genes que codifican para la proteína de la cápside, respectivamente para cada virus: AMV, PVX y PVY.

### **Aplicación de RNA a la membrana**

Para permitir la hibridación se requiere la previa desnaturalización de las posibles estructuras secundarias y terciarias que pueden formar parte del RNA viral. Por ello, las muestras de RNA total (5 µl) procedentes de la extracción se mezclaron con una solución desnaturalizante (3 volúmenes de 20X SSC, 2 volúmenes de formaldehído) en proporciones 1:1 y se incubaron durante 5 minutos a 85°C. A continuación se aplicaron 3 µl de cada muestra en la membrana, se esperó hasta la absorción completa y se fijaron covalentemente a la membrana de nylon por irradiación con luz ultravioleta generada (0,18 Jules) por un trans-iluminador [VILBER LOURMAT®] durante 3 minutos. En la membrana también se añadieron RNAs de cada uno de los virus a analizar, como controles positivos.

### **Pre-hibridación, hibridación y lavados de membrana**

Para evitar uniones inespecíficas de la sonda con la membrana, esta se bloqueó durante 2 horas con una solución de pre-hibridación [50% formamida, 5X SSC (NaCl 150 mM; Citrato sódico pH 7,0; SLS 0,1%; SDS 0,02% y 2% de agente bloqueante (Blocking reagent, ROCHE®1096176)] en un horno de hibridación con rotación a 68°C [STUART® SI30H]. Posteriormente se procedió a la hibridación con sondas de RNA marcadas con digoxigenina. En este caso las sondas empleadas consistían en una cadena simple de RNA de cada virus (AMV, PVX, PVY) de polaridad negativa complementaria a la forma de polaridad positiva que se acumula mayoritariamente en plantas infectas. Para ello la solución de pre-hibridación se sustituyó por una solución de hibridación (solución de pre-hibridación fresca + 0,25 µg de sonda por ml de solución), y la membrana se incubó durante 12 horas a 65°C en el horno de hibridación. A continuación la membrana se lavó con 2X SSC y SDS al 0,1% durante 5 minutos a

temperatura ambiente y luego lavados con 0,1X SSC y SDS al 0,1% a 68°C durante 15 minutos, con el fin de eliminar los restos de sonda no unidos específicamente al RNA.

### **Revelado de la membrana**

Finalizados los lavados la membrana se incubó durante 5 minutos en tampón T1 (ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM pH 7,5) más 0,3% *Tween* 20, seguido de 30 minutos de tampón T2 (tampón 1 más 1% de agente bloqueante). Tras el bloqueo, la membrana se incubó durante 60 minutos con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina disuelto en tampón T2 (dilución 1:10.000). Tras 2 lavados con tampón T1 + 0,3% de *Tween* 20 (de 15 minutos cada uno), la membrana se equilibró durante 5 minutos en tampón T3 (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM), para eliminar los restos de la solución de lavado. Finalmente la membrana se incubó con el sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina CSPD [ROCHE 1655884], diluido en tampón T3 (dilución 1:100) durante 5 minutos en oscuridad. Para la detección de la señal quimioluminiscente, la membrana se expuso a películas auto-radiográficas (*Amersham*) durante 5 – 15 minutos y se revelaron automáticamente. Todos los pasos de revelado se llevaron a cabo en oscuridad y temperatura ambiente.

### **Análisis por RT-PCR**

Para confirmar los resultados obtenidos por hibridación molecular, las muestras de RNA extraídas se analizaron por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) usando el kit “*Superscript III one-step RT-PCR system*” con los oligonucleótidos y en las condiciones que se describen debajo.

En este análisis el RNA del virus se copia a una cadena de cDNA, que se amplifica exponencialmente en los sucesivos ciclos. Dos juegos de oligonucleótidos fueron diseñados en este estudio para la amplificación por RT-PCR del RNAs de cada virus; basados en el alineamiento de las secuencias de los genes que codifican la CP de cada virus; obtenidos a partir del sitio web NCBI, (Tabla 1 referencias provistas en GenBank con el número de acceso de cada cepa).

Los oligonucleotidos (AMV-S y AMV-R), (PVY-S y PVY-R), (PVX-S y PVX-R), fueron usados para la amplificación por RT-PCR para la detección de los virus en las hojas de pimiento.

**Tabla 1. Pares de oligonucleótidos diseñados para la reacción de la cadena de la polimerasa de transcripción reversa basados en las secuencias de genes de las proteínas de cubierta de los virus AMV, PVX y PVY.**

PARES DE OLIGONUCLEOTIDOS	SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS	LOCALIZACIÓN	TAMAÑO DEL PRODUCTO (bp)
AMV-S	5'-CGCTCTCGAGAAGTTCGGGTTTGGAG-3'	1,537-1,562 <sup>a</sup>	240
AMV-R	5'-TCTCGTCGACGATCAAGATCGTCAGC-3'	1,754-1,780 <sup>a</sup>	....
PVY-S	5'-GAATTCGAATACCCACTGAAACC-3'	1,8989-1,9012 <sup>b</sup>	220
PVY-R	5'-AAGCTTCTAGCCCTCACTGGTGTTC-3'	1,9182-1,9207 <sup>b</sup>	....
PVX-S	5'-GGTCTGGAATCCCACTGGTCAACCA-3'	5,041-5,066 <sup>c</sup>	340
PVX-R	5'-GGCATTGTCAGCTGTGTACTGCTGT-3'	5,390-5,416 <sup>c</sup>	....

<sup>a</sup> Localización de la secuencia basado en una secuencia de AMV-425L (GenBank referencia N° J02006)

<sup>b</sup> Localización de la secuencia basado en una secuencia del genoma completo de PVY (GenBank referencia N° AJ890330)

<sup>c</sup> Localización de la secuencia basado en una secuencia del genoma completo de la proteína de cubierta PVX 3ORF's (GenBank referencia N° Z23256)

La RT-PCR fue desarrollada como se describe a continuación; las temperaturas que se siguieron para el régimen de amplificación fueron:

temperatura inicial retrotranscripción a 50°C por 45 minutos

desnaturalización a 94°C por 3 minutos

40 ciclos de:

desnaturalización a 94°C por 15 segundos,

anillamiento 50°C por 20 segundos,

extensión 70°C por 20 segundos,

extensión final a 68°C durante 1 minuto.

Se usó un termociclador [*eppendorf*, Vapo Protect Mastercycler Pros]; como control negativo se sometió a RT-PCR, junto con el resto de muestras, una disolución sin RNA molde.

## **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Los productos de la reacción de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v en tampón TAE 1X (Tris HCl 40 mM pH 7, acetato sódico 20 mM; EDTA 1mM). El gel con los productos de la reacción fue sometido un voltaje de 100 voltios durante 20 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) y se visualizó con luz UV  $\lambda = 260$  nm.

## **RECUPERACIÓN DE LOS cDNAs DE INTERÉS**

Las bandas amplificadas por RT-PCR (que correspondían al cDNA de regiones específicas de cada uno de los virus analizados) fueron extraídas y purificadas con un kit comercial [GenJET gel extraction, Thermo Scientific™, Waltham, MA]. Para ello se cortaron las bandas del gel con ayuda de un bisturí y se introdujeron en un *ependorf* con buffer de unión a la columna (100  $\mu$ l de buffer por cada 100  $\mu$ g de gel). Para fundir la agarosa, se incubó la mezcla a 50°C durante 10 minutos y se agitó periódicamente hasta quedó líquida y transparente. A continuación se cargó la mezcla en una columna (provista en el kit) que contiene un filtro que retiene los ácidos nucleicos, se centrifugó a 12.000 g/1 minuto. Se desechó el filtrado y se lavó la columna con un buffer de lavado. Seguidamente se centrifugó 2 veces a 12.000g/1 minuto para eliminar los restos del buffer de lavado. Después se cambió el tubo colector por un *ependorf* limpio y se añadió a la columna el buffer de elución, tras un minuto de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó a 12.000g/1 minuto. El eluido, que contenía el cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso para evitar su degradación.

## **LIGACIÓN DE LOS cDNAs EN UN VECTOR DE CLONACIÓN**

Se construyó un plásmido recombinante para su inserción posterior en bacterias mediante la ligación del cDNA purificado (proveniente de PVX, AMV y PVY en cada caso) a un plásmido comercial abierto llamado Plásmido pTz57R (Fermentas). El plásmido posee en sus extremos una Timina desapareada (extremos cohesivos) que establece puentes de hidrógeno con los fragmentos de cDNA, debido a que éstos poseen una Adenina desapareada en los extremos gracias a la actividad adenina terminal transferasa de la *Taq Pol*.

Para llevar a cabo la ligación se preparó una mezcla con 0,5 $\mu$ l de plásmido, 0,5 $\mu$ l de tampón de ligación, 0,5 $\mu$ l de DNA ligasa (Promega) (que tras la unión mediante puentes

de hidrógeno establece puentes disulfuro entre nucleótidos de una misma cadena) y 3,5µl de cDNA. La mezcla se incubó 1h a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C durante toda la noche.

## **TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE**

El plásmido recombinante se introdujo en células competentes de *E. Coli* (cepa DH5α) mediante electroporación. Para ello la mezcla procedente de ligación se introdujo en una cubeta de electroporación junto con 50µl de células competentes de *E. Coli* DH5α y se sometió a un pulso eléctrico de alto voltaje. Inmediatamente después del pulso eléctrico se añadieron 400µl de medio LB a la cubeta para que las células se recuperaran del estrés aplicado. Después se traspasó el contenido de las cubetas a tubos *eppendorf* y las muestras se incubaron 30 minutos a 37°C. Por último se sembraron las bacterias en medio sólido selectivo (placas Petri con medio LB más ampicilina (50µg/ml), a las que previamente se les añadió 35µl de X-gal) con el fin de que sólo crecieran aquellas bacterias que hubieran incorporado el plásmido (recombinante o no), y se incubó a 37°C durante 16 h. La cantidad de muestra a añadir a la placa no está estandarizada, pues depende de la eficacia de transformación, desconocida en nuestro caso. Por ello se hicieron dos réplicas por muestra. Al día siguiente se observaron las placas para identificar las colonias que habían incorporado el plásmido recombinante en función de su color, blanco (plásmido con inserto) o azul (plásmido sin inserto) respectivamente.

## **SELECCIÓN DE CLONES PARA SECUENCIACIÓN**

Las colonias blancas (compuestas por bacterias que incorporaron el plásmido recombinante) fueron seleccionadas como candidatas para secuenciación. Para asegurar que dichos clones poseían el plásmido recombinante, se tomaron 3 colonias de cada placa y se cultivaron en medio líquido (3ml de LB más ampicilina - 50µg/ml) en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una purificación de DNA plasmídico o Miniprep mediante un kit comercial [GenJET Plasmid, Thermo Scientific™, Waltham, MA]. Una vez purificado, el DNA plasmídico se analizó por digestión con enzimas de restricción que cortaban en el sitio de clonación múltiple a ambos lados del inserto. Las enzimas empleadas fueron *EcoRI* y *Pst I*. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%), empleándose como control de

digestión, DNA plasmídico sin digerir. Aquellas muestras que liberaron un inserto de 415-418 pb fueron seleccionadas para enviar a secuenciar.

### **ANÁLISIS BIOINFORMÁTICA**

Los clones seleccionados fueron secuenciados en el servicio de secuenciación del IBMCP. Las secuencias de AMV, PVY y PVX fueron comparadas con las secuencias de las bases de datos en el NCBI con el programa BLAST. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos inferidas a partir de ellas fueron alineadas usando los programas *Clustal Omega* y *FigTree1.4.2*. La relación filogenética de los virus de AMV, PVY y PVX con cada una de sus secuencias de los genes que codifican la proteína de la cápside de cada cepa; fue deducida usando métodos alineamiento múltiple, mejoramiento de alineamiento, construcción de árboles filogenéticos y visualización de los árboles genéticos usando dendogramas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### MUESTRAS DE PIMIENTO

Las muestras de hojas de pimiento (*Capsicum annuum*) colectadas en Ecuador; mostraban síntomas que coincidían al menos en parte con los descritos para infecciones con *el virus del mosaico de la alfalfa* (AMV), *virus Y de la patata* (PVY) y *virus X de la patata* (PVX).

El AMV ha sido reportado en pimiento en la mayoría de los estados de EEUU (Abdalla & Ali, 2012) y en México (Creamer, *et al.*, 2003). Los síntomas causados por este virus, en pimiento, pueden ser variados como mosaicos o moteados severos que varían de color amarillo hasta blanco y llegan a cubrir grandes áreas de la lámina foliar (Figura 10), patrones de líneas cloróticas y necrosis de nervaduras. Por otra parte, las plantas jóvenes infectadas muestran enanismo y producen pequeños frutos deformes (Figura 10) o, en casos más severos, no los producen (Goldberg, 2012; Cerkauskas, *et al.*, 2004).

El *virus Y de la patata* (PVY) posee una distribución global aunque es más común en regiones cálidas, los síntomas más comunes en pimiento son el aclaramiento sistémico de las venas, el cual se transforma en un mosaico o moteado, color verde oscuro en las hojas, en algunas ocasiones se observa necrosis en el pecíolo y las nervaduras (Figura 8 y 9), tallo y yemas apicales, defoliación y la muerte de la planta (Arteaga, *et al.*, 2003). Este virus puede causar serios daños si se trata de una infección causada por razas necrogénicas (Conti, y otros, 2000); este tipo de síntomas fue descrito en plantas de pimiento en Perú (Delgado Junchaya & Cedano Saavedra, 2010).

El *virus X de la patata* (PVX) tiene una gran variedad de plantas hospedadoras entre las cuales se encuentra el pimiento (CABI, 2014). El PVX solo induce síntomas medios de mosaicos en solanáceas pero causa severos retrasos en el crecimiento en plantas infectadas con el virus Y de la patata (PVY) (Khurana SM & Singh, 2000).

Las muestras colectadas se procesaron y sometieron a análisis con el objeto de identificar y caracterizar a los agentes causales de estas alteraciones en el desarrollo.



**Figura 8. Plantas enfermas de pimiento, en los círculos rojos se observa necrosis en los peciolo.**



**Figura 9. Planta enferma de pimiento, moteados amarillos, líneas cloróticas, necrosis en nervaduras, fruto pequeño.**



**Figura 10. Planta enferma de pimiento, moteado de color amarillo hasta blanco.**  
Se observa manchas cloróticas sintomáticas causadas por infección viral.

### **HIBRIDACIÓN MOLECULAR *DOT BLOT***

La hibridación *Dot Blot* fue realizada para confirmar la presencia de AMV, PVX y PVY que, según los síntomas observados y estudios previos realizados con una polisonda (Pallas Benet, *et al.*, 2010) capaz de reconocer al menos 15 virus diferentes, dato no mostrado), podían estar presentes en las hojas de plantas de pimiento procedentes de Ecuador.

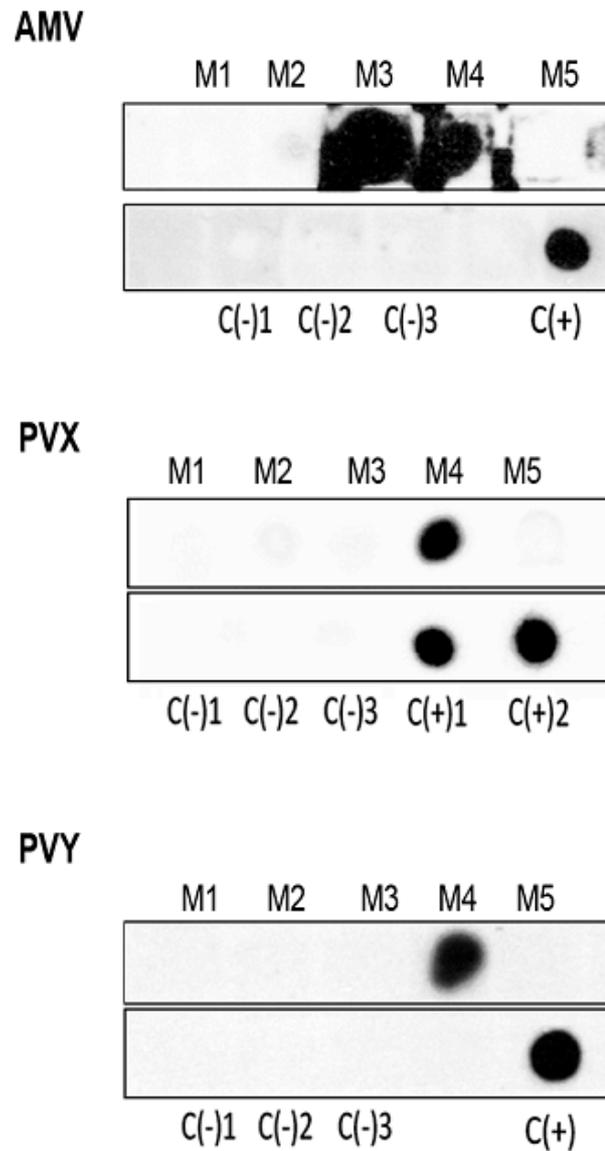
Los RNA totales extraídos de las plantas a analizar fueron aplicados sobre membranas de nylon y se hibridaron toda la noche con una ribosonda marcada con digoxigenina específica para cada virus (complementarias a una región del RNA que codifica para la proteína de la capsida).

En este trabajo se emplearon muestras de cinco plantas de pimiento de la parroquia Natabuela de la provincia de Imbabura de Ecuador. En cada una de las hibridaciones se usaron los respectivos controles positivos y negativos para cada virus. Los resultados obtenidos están representados en las Figura 11 respectivamente para AMV, PVX y PVY.

Con la sonda específica para el *virus del mosaico de la alfalfa* AMV, se identificó como positivas a dos muestras (M3 y M4), El resto de las muestras analizadas fueron

claramente negativas (Figura 11). En análisis con la sonda específicas para *virus X de la patata* PVX, permitió identificar como positiva a la muestra (M4), en este caso se usó una muestra de tomate (*Solanum betaceum*) infectada con PVX como control positivo. El resto de muestras fueron negativas para la presencia de este virus (Figura 11). Cuando la hibridación se realizó con la sonda específica para el *virus Y de la patata* (PVY), se pudo identificar como positivas únicamente a la muestra (M4). El resto de muestras mostraron reacciones negativas en este ensayo (Figura 11).

La especificidad, sensibilidad y eficiencia de las sondas son relevantes en la implementación de metodologías diagnósticas. La sensibilidad define la proporción del total de verdaderos positivos identificados entre las plantas infectadas, además de plantear los límites de detección de un virus y los puntos de corte que establecen el umbral de la señal para la asignación de presencia o ausencia del patógeno en las muestras analizadas (Du, *et al.*, 2007). Por otro lado de acuerdo a (Romero, *et al.*, 1995) el límite de detección depende de la especie de virus y la concentración de virus en la muestra. En este sentido es oportuno considerar que la técnica de hibridación molecular por *Dot Blot* se basa en la siembra directa de RNA en membranas con carga positiva y posterior hibridación. Esta técnica, si bien permite el tratamiento de muchas muestras a la vez con un coste significativamente bajo, puede generar (en casos muy específicos) resultados poco fiables cuando es utilizada con propósitos diagnósticos directo de plantas de campo (Wen, *et al.*, 2009). La hibridación *Dot Blot* puede generar serias dificultades relacionadas con la preservación, preparación de ácidos nucleicos debido a la degradación de RNA que puede muchas veces causar resultados falsos negativos (Khan, *et al.*, 2008). Por esta razón, en general la detección de un agente viral mediante ensayos de hibridación, suele complementarse con un ensayo más sensible y específico. Para cumplir esta premisa, en este trabajo, los RNAs extraídos a partir de las muestras de pimiento se reanalizaron mediante la técnica de RT-PCR.



**Figura 11. Hibridación molecular *Dot Blot* con sondas específicas para detección de AMV, PVX y PVY.** En la figura observamos que las muestras M3 y M4 fueron positivas para la detección de AMV, la muestra M4 fue positiva en la detección de PVX, La muestra M4 fue también positiva en la detección de PVY. En todos los casos se usaron controles negativos C (-); y sus respectivos controles positivos C (+)

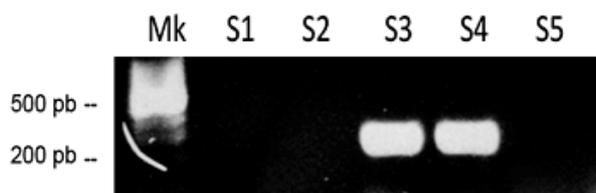
## **RT-PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su variante RT-PCR, destinada a detectar cantidades mínimas de ARN, se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de gran número de virus en diversas especies vegetales (Umaña Castro, 2010). El ensayo de la reacción de cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) fue empleado en este caso como método de confirmación monoespecífica de la infección causada por los virus de AMV, PVX y PVY en las plantas de pimiento. Los oligonucleótidos específicos se diseñaron basados en regiones de las secuencias de RNA que codifican para las proteínas de cubierta de los virus descritos (Tabla 1).

### **Detección de AMV, PVX y PVY**

En lo que respecta al análisis del AMV y tal como se observa en la Figura 12, cuando los productos de amplificación por RT-PCR se analizaron en geles de agarosa fue posible identificar fragmentos de ~250 pares de bases, correspondientes a la amplificación de una región del genoma de este virus. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por hibridación, y permite confirmar la presencia de AMV en estas plantas (M3 y M4). La presencia del *virus Y de la patata* (PVY) en las muestras sintomáticas, también fue analizada por esta técnica. Los amplicones obtenidos como producto del ensayo de RT-PCR mostraron un tamaño que coincidió con el esperado de alrededor de ~250 pares de bases, la muestra M4 fue positiva en este caso (Figura 12). Para continuar con la confirmación de la presencia de virus en las muestras se realizaron pruebas de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para la detección del PVX. Se obtuvieron amplicones de alrededor de ~350 pares de bases, provenientes de una región específica de los genes que codifican para las proteínas de la capsida de acuerdo al set de oligonucleótidos utilizados para el ensayo (Tabla 1). Lo que confirma que esta muestra de pimiento (M4) estaba también infectada por PVX (Figura 12).

### AMV



### PVX



### PVY



**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de AMV - PVX y PVY mediante RT-PCR.** En la figura se muestra la amplificación positiva de las muestras M3 y M4 de alrededor de ~250 pb para parte del gen que codifica para la CP de AMV, además se muestra la amplificación positiva de la muestra M4 de alrededor de ~350 pb para parte del gen que codifica para la CP de PVX, finalmente se indica la amplificación positiva para la muestra M4 de alrededor de ~250pb para parte del gen que codifica para la CP de PVY.

El PVX es considerado como un virus leve causante de un mosaico tenue en plantas solanáceas y causante de pérdidas del alrededor del 10 a 20% de producción. A pesar de esto la severidad de los síntomas y la caída del rendimiento se incrementan en gran medida cuando se dan lugar infecciones mixtas con otros virus como; por ejemplo PVY

(Koenig & Lesemann, 1989). Existen investigaciones que sustentan la interacción de la infección causada por PVX con una de las proteínas de movimiento del bloque de tres genes (triple Gene Block, TGB) (Hwang, *et al.*, 2015). En nuestro caso podemos inferir que los síntomas mas severos, observados en la muestra M4 podrían ser producto de la infección combinada de PVX y PVY.

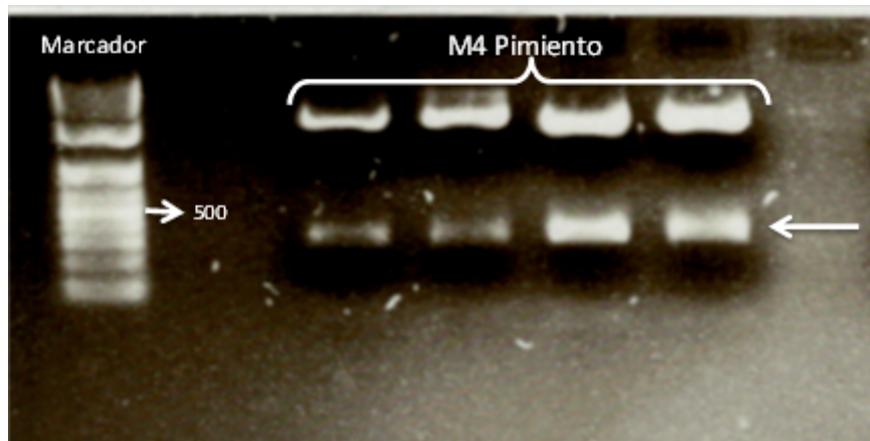
## **LIGACIÓN TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS CLONES RECOMBINANTES**

Los cDNAs de los virus amplificados a partir del RNA de AMV, PVX y PVY se extrajeron del gel y se purificaron para proceder a su clonación en bacterias. Los fragmentos amplificados por RT-PCR (con una A en cada extremo producto de la actividad adenina terminal transferasa del enzima Taq Pol) se ligaron en el vector plasmídico PTZ57R (abierto y con una timina no apareada en cada extremo) en una reacción de ligación catalizada por la enzima DNA-ligasa. El producto de ligación se empleó para transformar mediante electroporación de células competentes de *E.coli* (cepa DH5 $\alpha$ ). Las bacterias transformadas se seleccionaron por crecimiento diferencial en medio LB con ampicilina (ya que el plásmido PTZ57R posee un gen de resistencia a ampicilina), y este cultivo selectivo permite por tanto sólo el crecimiento de células que hayan sido transformadas.

Para discriminar las células transformadas con plásmidos autoligados que no contengan el inserto de interés de las transformadas con plásmidos recombinantes, se utilizó el sistema LacZ. El plásmido PTZ57R incorpora el gen LacZ, codificante del enzima  $\beta$ -galactosidasa, que metaboliza el sustrato X-gal dando como producto un compuesto que forma un precipitado azul. El gen LacZ en el plásmido, se encuentra truncado por el sitio de inserción del fragmento clonado, de manera que si la ligación se produce correctamente, el enzima  $\beta$ -galactosidasa no puede sintetizarse y por tanto X-gal no se metaboliza. En consecuencia, las bacterias que posean el plásmido recombinante serán de color blanco, mientras que aquellas que poseen el plásmido sin inserto serán de color azul debido al producto formado tras la reacción. Gracias a este sistema, se identificaron colonias blancas, con la seguridad de que éstas poseen el plásmido recombinante. Estas colonias se cultivaron en medio líquido para proceder a la purificación del plásmido recombinante. El DNA plasmídico purificado de cada uno de los clones se sometió a una digestión con enzimas de restricción que cortan el DNA de manera específica a cada uno de los lados del inserto clonado para confirmar su presencia y comprobar su

tamaño, se usaron las enzimas *EcoRI* y *PstI*. Las digestiones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa-TAE (2%). La Figura 13 ofrece una muestra representativa de algunos de los productos de digestión, en este caso se muestran clones del cDNA del PVY obtenidos a partir de la muestra M4. La banda superior de ~953 pb observada corresponde al plásmido linearizado, las bandas inferiores de ~250 pb corresponden al cDNA codificante del PVY.

Los clones con insertos de tamaño apropiado se enviaron a secuenciar; para confirmar la validez de la secuencia obtenida se secuenciaron 3 clones por cada uno de los virus analizados en pimiento.



**Figura 13. Análisis de los productos de digestión de los cDNAs plasmídicos de los clones obtenidos de PVY.**

Electroforesis en gel de agarosa-TAE (2%) de los productos de digestión. Las muestras incluidas corresponden a clones que supuestamente incorporaban plásmidos con inserto (según el color blanco de las colonias). La muestra analizada es M4 de pimiento.

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Una vez obtenidas las secuencias, fue necesario eliminar fragmentos que correspondieran al vector de clonación, así como elegir la secuencia consenso a utilizar para el análisis de homología. En la (Figura 14) se muestran las secuencias consenso de cDNA codificantes para la proteína de la capsida de los virus *AMV*, *PVY* y *PVX* respectivamente, que se emplearon para realizar los estudios informáticos posteriores.

Para iniciar el análisis bioinformático, se realizó en primer lugar la traducción “*in silico*” de las secuencias de nucleótidos consenso disponibles, a secuencias de aminoácidos mediante la herramienta *TRANSLATE* del programa *ExpASy*. Las secuencias de *AMV*, *PVY* y *PVX* consenso fueron comparadas con las secuencias de las bases de datos en el NCBI usando el programa *BLASTP*, que permitió identificar secuencias de las bases de datos que se asemejan a las secuencias consenso analizadas por encima de un determinado umbral. Las Figuras 15, 16, y 17 muestran las secuencias de aminoácidos obtenidos que codifican para las proteínas de la capsida de cada virus analizado en las muestras de pimiento de Ecuador.

A continuación se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos obtenidos, mediante el uso de la aplicación *Clustal-Omega* con los parámetros establecidos por defecto. Este programa realiza alineamientos 2 a 2 con todas las secuencias reconocidas como *input*, y otorga a cada pareja un porcentaje de homología. Los alineamientos de parejas son computados con un método todos contra todos y las similitudes se representan en una matriz (Tablas 2, 3, 4). Esta matriz luego es convertida en una matriz de distancias, donde la longitud de la distancia refleja la distancia evolutiva entre cada par de secuencias. A partir de esta matriz, se crea un árbol filogenético utilizando un algoritmo de *clustering neighbour-joining* para determinar el orden en que los pares de secuencias serán alineados progresivamente en cada punto de ramificación empezando por los pares de secuencia más cercanos.

**Secuencias consenso de los cDNAs codificantes para la capsida de los virus AMV, PVX y PVY**

**>Ecuador AMV**

GAGAAGTTCGGGTTTGAGTTGGTCTTCACAGCTCCTACCCATGCGGGAATGCAAAATCAAAATTTCAAGCATTCTATGCCG  
TAGCCCTCTGTCTGGACTTCGATGCGCAGCCTGAGGGATCTAAAAATCCCTCATACCGATTCAACGAAGTTTGGGTCGAGAG  
AAAGGCGTTCCCGCAGCAGGGCCCCCTCCGAGTTTGATTACTGTGGGGCTGCTCGACGAAGCTGACGATC

**>Ecuador PVX**

TTTTACATGTCCGCGCAGGGGCATAGGCTGACCGCTCCGGTCAGTTCTGAAAAAGTGTACATAGTATTAGGTCTATCATTTG  
CTTTAGTTTCAATTACCTTTCTGCTTTCTAGAAATAGCTTACCCACGTCGGTGACAACATTCACAGCTTGCCACACGGAGG  
AGCTTACAGAGACGGCACAAAGCAATCTTGTACAACCTCCCAATCTAGGGTCACGAGTGAGTCTACACAACGAAAGAAC  
GCAGCATTGTGCTGCCGTTTTGCTACTGACTTTGCTGATCTATGGAAGTAAATACATATCTCAACGCAATCATACTTGCTT  
GTGGTAAACAATCATAGCAGTCATTAGCTAGCTGTGA

**>Ecuador PVY**

TTGAATACCCACTGAAACCAATTGTTGAGAATGCAAAACCAACAATTAGGCAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGA  
AGCGTATCCGAAATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCAGGATATGGTTTAGTTTGTGATATGTTTGTGGAAGTTTGC  
CTCGCTACGCCTTTGACTTTTTTGAAGTCACATCACGAACACCCGGAGGGCTAG

**Figura 14. Secuencias nucleotídicas consenso de los cDNAs que codifican para las proteínas de la capsida de los virus AMV, PVX y PVY respectivamente en las muestras de pimiento analizadas.**

## Secuencias de aminoácidos que codifican la proteína de la capsida del virus de AMV

```

>Ecuador
XEKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Argentina | gb | AGV15827.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Italia | emb | CBX36147.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEVDD
>Italia | emb | CCA89319.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQDFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Iran | gb | AGO50978.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNHNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>EEUU | gb | AFH14525.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>EEUU | gb | AAQ18915.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Italia | emb | CCQ19219.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAIALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Brasil | gb | ACO92345.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLEETDD
>Arabias | gb | AGL92228.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Egipto | gb | ADQ27870.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEGSKIPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>España | emb | CCD41768.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFDEADD
>Italia | emb | CAB60711.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGIENQNFNHSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Canada | gb | ABC47120.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAHAEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Canada | gb | ABC47118.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAHAEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Canada | gb | ABC47119.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAHAEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>EEUU | gb | AFH14530.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAQPEVSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLIXVGLLDEADD
>Italia | emb | CAB60715.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFDDADD
>Italia | emb | CAB60716.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFDDADD
>Arabias | gb | AGL92227.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Holanda | gb | AAD04693.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSRNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFDDADD
>Canada | gb | ABC47123.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVAFCLDFDAHAEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLLDEADD
>Italia | emb | CAB60714.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFNADD
>España | gb | ABS01285.1 |
EKFGFELVFTTPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFDEVDD
>Canada | gb | ABC47122.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDAHAEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGALRSLITVGLLDEADD
>Holanda | gb | AAD04695.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVKLFDDADD
>Canada | gb | ABC47124.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVAFCLDFDAHAEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRRLITVGLLDEADD
>Italia | emb | CAB60712.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFDSYAVALCLDFDAQPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLVAEADD
>EEUU | gb | AAZ31241.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDALPEGSRNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFDEPD
>Italia | emb | CAB60710.1 |
EKFGFELVFTPTHAGIENQNFNHSYAVALCLDFDALPEGSKNPSYRFNEVWVERKAFPRAGPLRSLITVGLFDDADD
>Italia | emb | CDF76724.1 |
EKFGFELVFTAPTHAGMQNQNFKHSYAVALCLDFDDVPEGSKNPSYRFNEVWIERKAFPRAGPLRSLITVGLFDDADD

```

**Figura 15.** Secuencias de aminoácidos que codifican para la proteína de la capsida del virus AMV (predichas por traducción *in silico*) obtenidas como resultado del análisis bioinformático en el programa BLAST.

## Secuencias de aminoácidos que codifican la proteína de la capsida del virus de PVX

### >Ecuador

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALVSIITFLLSRNSLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAILYNSPNLGSRVSLHNGKN  
AAFAAVLLLTLLIYGSKYISQRNHTCACGNNHSSH-

### >Iran | gb | ACJ68407.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALVSIITFLLSRNSLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAILYNSPNLGSRVSLHNGKN  
AAFAAVLLLTLLIYGSKHISQRNHTCACGNNHSSH

### >Rusia | gb | ABS87400.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALVSIITFLLSRNNLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAILYNSPNLGSRVSLHNGKN  
AAFAAVLLLTLLIYGSKHISQRNHTCACGNNHSSH

### >Canada | gb | AAF13451.1 |

MSAHGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALVSIITFLLSRNSLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAILYHSPNLGSRVSLHNGKN  
AAFAAVLLLTLLIYGSKYISQRNHTCACGNNHSSH

### >Colombia | gb | AJO26064.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALVSIITFLLSRNNLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAILYNSPNLGSRVSLHNGKN  
AAFAAVLLLTLLIYGSKHISQRNHTCACGNNHSSH

### >Iran | gb | AIL49072.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALVSIITFLLSRNSLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKVILYNSPNLGSRVSLHNGKN  
AAFAAVLLLTLLIYGSKHISQRSHTCACGNNHSSH

### >Reino Unido | gb | AAF89749.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALISITFLLSRNNLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAVLYNSPNFGSRTSLNNGKN  
AAFAVLLLSLLIYGSRCLSQRNHLACGNNHSSH

### >Reino Unido | emb | CAA80776.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALISITFLLSRNNLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAILYNSPNFGSRTSLNNSKN  
AAFAAVLLLSLLIYGSRCLSQRNHLACGNNHSSN

### >Peru | gb | AIS39938.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSFALISITFLLSRNNLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAVLYNSPNFGSRTSLNNGKN  
AAFAVLLLSLLIYGSRCLSQRNHLACGNNHSGH

### >Peru | gb | AIS39934.1 |

MSAQQGHRLTAPVNSEKVYIVLGLSLALISITFLLSRNNLPHVGDNIHSLPHGGAYRDGTKAILYNSPNFGSRTSLNNGKN  
AAFAAVLLLSLLIYGSRCLSQRNNLCACGNNHSSH

**Figura 16. Secuencias de aminoácidos que codifican para la proteína de la capsida del virus PVX (predichas por traducción *in silico*) obtenidas como resultado del análisis bioinformático en el programa BLAST.**

## Secuencias de aminoácidos que codifican la proteína de la capsida del virus de PVY

>Ecuador  
RIPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>ReinoUnido | gb | ABW04874.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Espana | emb | CAI65378.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Espana | emb | CAI65383.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Espana | emb | CAI65374.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Espana | emb | CAI65380.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Colombia | gb | ADX05582.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Canada | gb | AAD27622.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Brasil | gb | ABF81826.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>ReinoUnido | gb | ABO15921.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Espana | emb | CAI65382.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Espana | emb | CAI65385.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>EEUU | gb | AAB50250.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>ReinoUnido | gb | ABO15903.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Colombia | gb | AGL72196.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Francia | gb | AFO84405.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Francia | dbj | BAG12052.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Serbia | gb | AJT60331.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Francia | gb | AIL49994.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>ReinoUnido | emb | CAB51932.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Holanda | gb | AFO84354.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Francia | gb | AIL49959.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>ReinoUnido | gb | AAK61859.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Colombia | gb | ADX05581.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>EEUU | gb | AFO84393.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Brasil | gb | AIL50117.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

>Francia | gb | AIL50013.1 |  
PLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSRTPVRA

Figura 17. Secuencias de aminoácidos que codifican para la proteína de la capsida del virus PVY (predichas por traducción *in silico*) obtenidas como resultado del análisis bioinformático en el programa BLAST.

## ANÁLISIS DE SECUENCIA Y DENDOGRAMA FILOGENÉTICO

Las secuencias consenso de aminoácidos que codifican para las proteínas de la capsida de cada virus AMV, PVX y PVY respectivamente; presentes en pimiento de Ecuador se colocaron en grupos de acuerdo a los dendogramas filogenéticos generados por el programa *FigTree1.4.2* (Figura 18, 19 y 20). La secuencia consenso de AMV (Figura 18) se colocó en un grupo en el que se encuentran principalmente secuencias descritas en el continente Americano; EEUU (accesión N° AFH14525, AFH14530, AAQ18915), Argentina (accesión N° AGV15827), Brasil (accesión N° ACO92345). Además se pueden destacar un subgrupo de secuencias descritas en Canadá (accesión N° ABC47118, ABC47119, ABC47120, ABC47122, ABC47123, ABC47124) disponibles en NCBI GenBank. Respecto al porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos del gen de la capsida del *virus del mosaico de la alfalfa* AMV; la secuencia consenso analizada de Ecuador guarda una similitud superior al 99% con la secuencia descrita en Argentina y una similitud superior al 95% en las secuencias descritas en Brasil, EEUU y Canadá (Tabla 2).

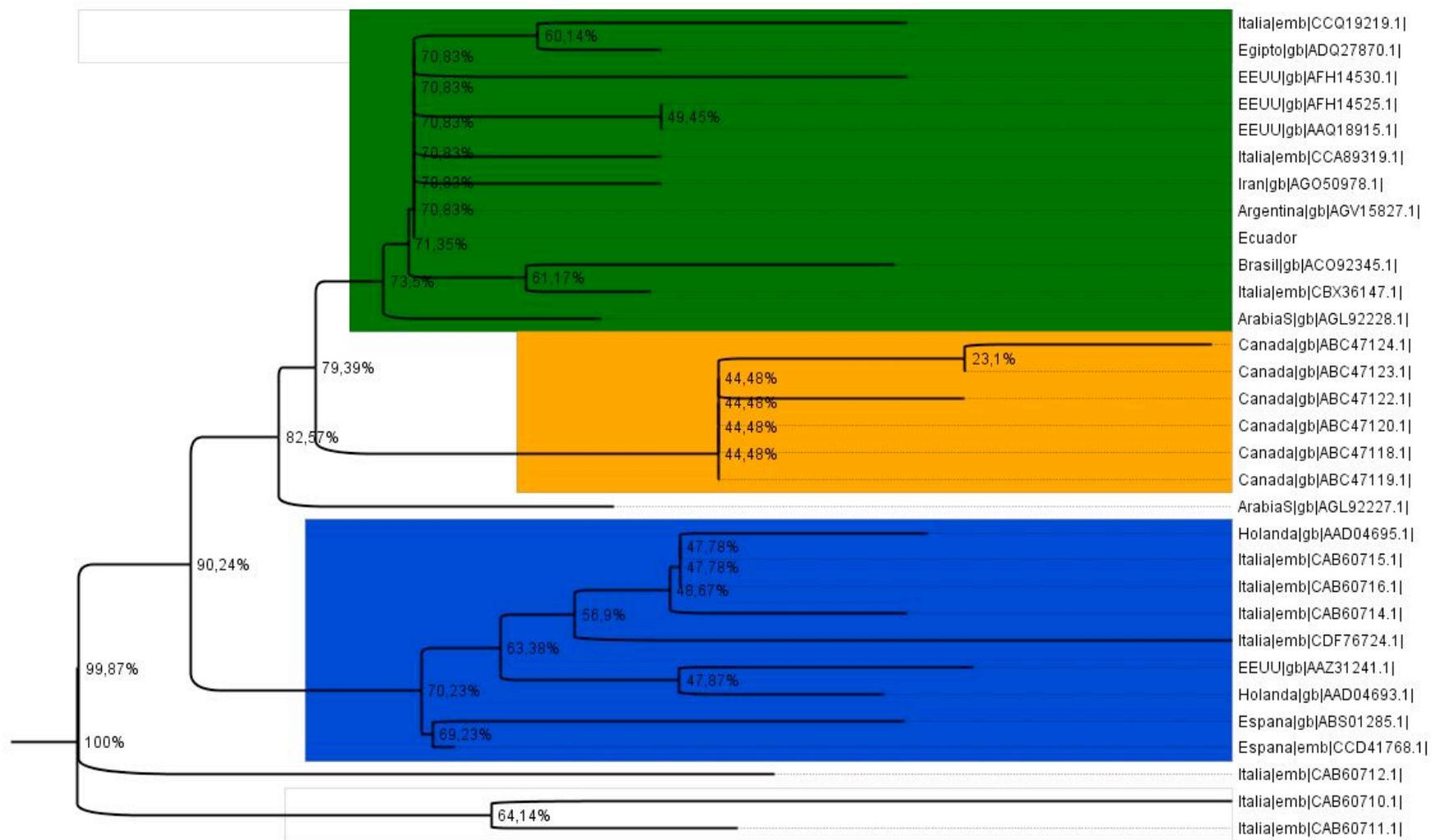
En el caso de las secuencias consenso de PVX, y en referencia al dendograma filogenético generado (Figura 19), se relacionaron con secuencias descritas en el continente Americano que corresponden a Canadá (accesión N° AAF13451); en otro subgrupo una secuencia descrita en Colombia (accesión N° AJO26064). Otro subgrupo que se describe en el dendograma filogenético es en el que se encuentran secuencias descritas en Perú (accesión N° AIS39938, AIS39934); Respecto de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de la capsida del *virus X de la patata* PVX de los aislados de Ecuador, tienen una similitud superior al 95% con secuencias descritas en Canadá y Colombia (Tabla 3).

Respecto de la secuencia consenso de PVY obtenido de las muestras de pimiento de Ecuador, de acuerdo al dendograma filogenético generado (Figura 20); se ubica en un grupo entre los cuales se puede destacar los países americanos de Brasil (accesión N° AIL50117, ABF81826), Colombia (accesión N° ADX05581; AGL72196; ADX05582), EEUU (accesión N° AFO84393; AAB50250), Canadá (accesión N° AAD27622). En cuanto a la comparación de la similitud de secuencia de aminoácidos del gen de la capsida del virus; el porcentaje de similitud superior al 99% a todas las secuencias descritas del continente americano usados para este experimento *in silico*. (Tabla 4).

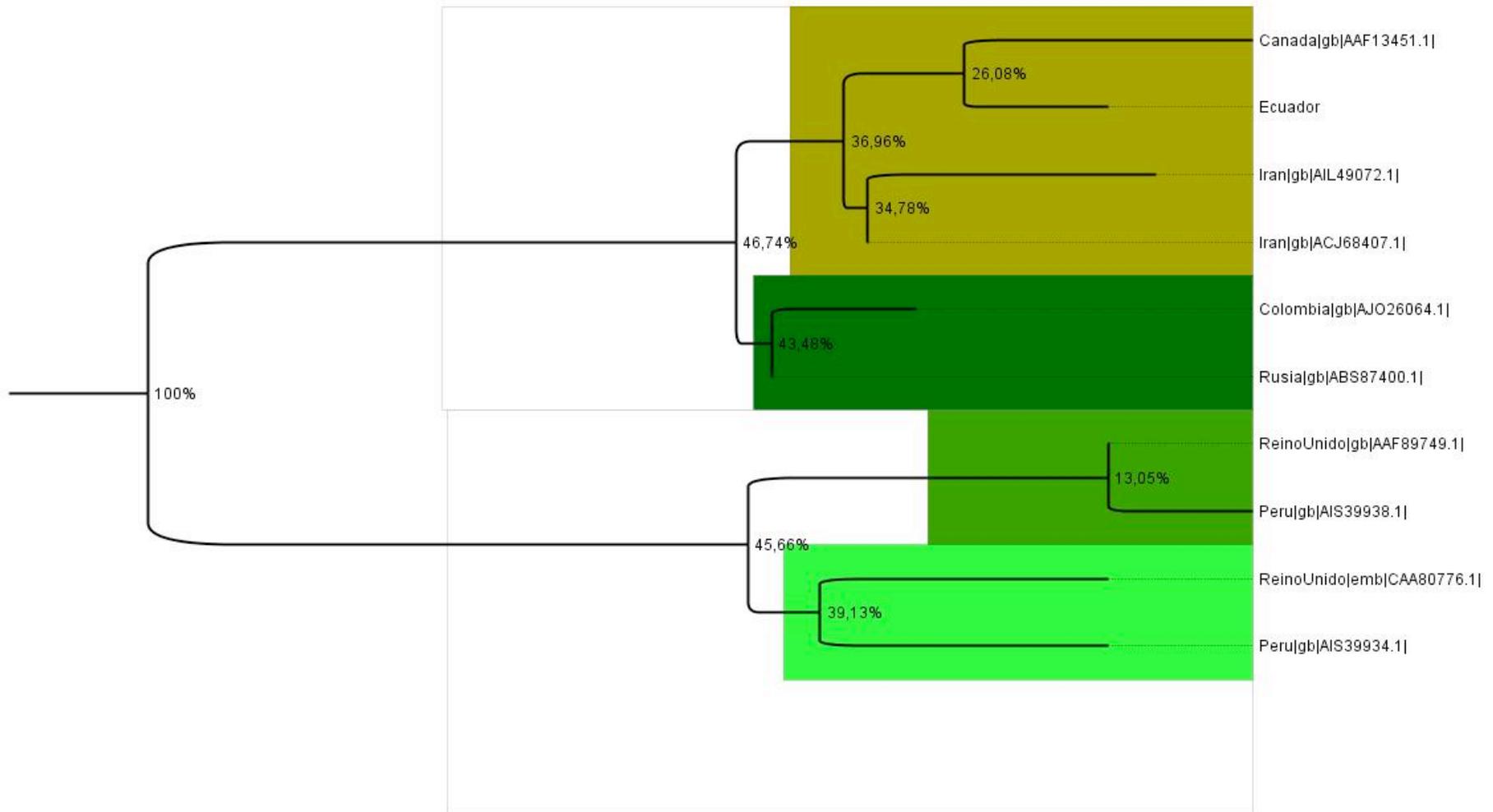
## CONCLUSIONES

De este estudio puede extraerse las siguientes conclusiones:

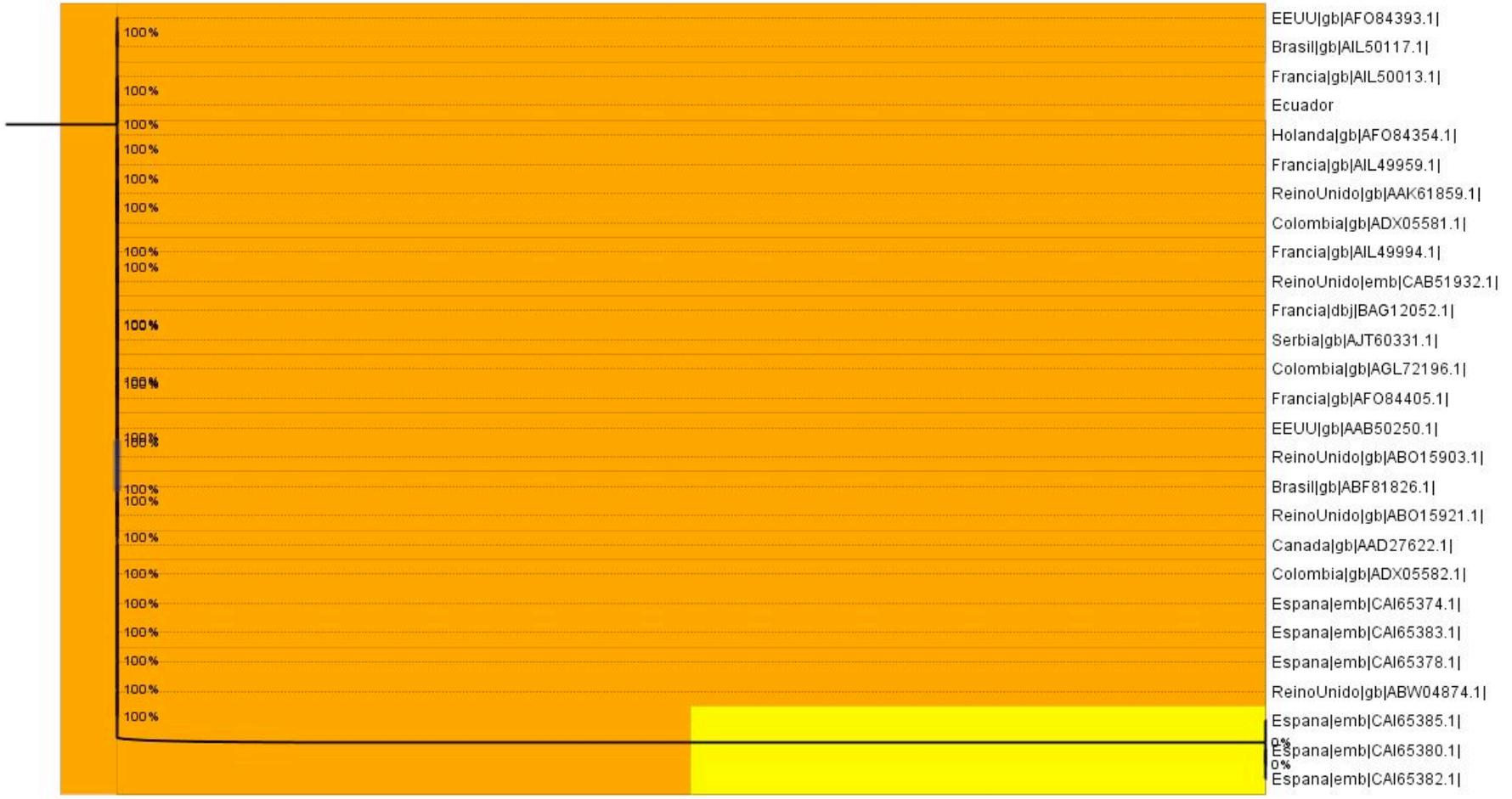
1. Fue posible confirmar la presencia de aislados de AMV, PVX y PVY en cultivos comerciales de pimiento en la provincia Antonio Ante de la Provincia de Imbabura de Ecuador.
2. El análisis de parte de la secuencia de la proteína de la cápsida de los virus detectados indicó que poseían altos niveles de homología con agentes virales descritos previamente en el continente Americano.
3. Este trabajo constituye la primera descripción fehaciente de AMV, PVX y PVY en plantas de pimiento en Ecuador.
4. La estrategia de trabajo empleada en este estudio servirá como paso inicial para la puesta en marcha de controles fitosanitarios en Ecuador.



**Figura 18.** Dendrograma filogenético que representa la relación entre la secuencia consenso de aminoácidos de la proteína de la capsida de *Alfalfa mosaic virus* (AMV) de Ecuador y otras secuencias conocidas de AMV basado en la matriz de similitud de secuencias generado por *Clustal Omega*.



**Figura 19.** Dendograma filogenético que representa la relación entre la secuencia consenso de aminoácidos de la proteína de la capsida de *Virus X de la Patata (PVX)* de Ecuador y otras secuencias conocidas de PVX basado en la matriz de similitud de secuencias generado por *Clustal Omega*.



**Figura 20. Dendrograma filogenético que representa la relación entre la secuencia consenso de aminoácidos de la proteína de la capsida de *Virus Y de la Patata (PVY)* de Ecuador y otras secuencias conocidas de PVY basado en la matriz de similitud de secuencias generado por *Clustal Omega*.**

**Tabla 5. Comparación del porcentaje de identidad de parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la capsida de la cepa del virus del mosaico de la alfalfa (AMV) consenso analizada en este trabajo.**

	Italia	EEUU	España	Holanda	Italia	Holanda	España	Italia	Italia	Canada	Canada	Canada	Canada	Canada	Canada	Italia	Italia	Italia	ArabiaS	EEUU	Brasil	Italia	Egipt	ArabiaS	EEUU	EEUU	Iran	Italia	Ecuador	Argentina	Italia	GenBank accesión Nº
Italia	-	92.11	92.21	94.81	94.81	94.81	94.81	96.10	96.10	89.61	90.91	92.21	92.21	92.21	90.91	92.21	89.61	90.91	92.21	90.91	90.91	90.91	92.21	92.21	92.21	92.21	92.21	92.21	93.51	93.51	92.21	CDF76724.1
EEUU	92.11	-	96.10	94.81	94.81	97.40	97.40	96.10	96.10	90.91	92.21	93.51	93.51	93.51	92.21	90.91	90.91	90.91	94.81	92.21	93.51	92.21	93.51	93.51	93.51	93.51	93.51	93.51	94.81	94.81	94.81	AAZ31241.1
España	92.21	96.10	-	94.87	94.87	94.87	97.44	96.15	96.15	91.03	92.31	93.59	93.59	93.59	92.31	92.31	91.03	91.03	94.87	92.31	93.59	92.31	93.59	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	96.15	ABS01285.1	
Holanda	94.81	94.81	94.87	-	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	91.03	92.31	93.59	93.59	93.59	92.31	93.59	91.03	91.03	94.87	92.31	92.31	92.31	93.59	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	93.59	AAD04695.1	
Italia	94.81	94.81	94.87	97.44	-	97.44	97.44	98.72	98.72	91.03	92.31	93.59	93.59	93.59	92.31	93.59	92.31	91.03	94.87	92.31	93.59	92.31	93.59	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	93.59	CAB60714.1	
Holanda	94.81	97.40	94.87	97.44	97.44	-	97.44	98.72	98.72	91.03	92.31	93.59	93.59	93.59	92.31	93.59	91.03	91.03	94.87	92.31	92.31	92.31	93.59	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	93.59	AAD04693.1	
España	94.81	97.40	97.44	97.44	97.44	97.44	-	98.72	98.72	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	93.59	93.59	93.59	97.44	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	96.15	CCD41768.1	
Italia	96.10	96.10	96.15	98.72	98.72	98.72	98.72	-	100.00	92.31	93.59	94.87	94.87	94.87	93.59	94.87	92.31	92.31	96.15	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	94.87	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	94.87	CAB60715.1
Italia	96.10	96.10	96.15	98.72	98.72	98.72	98.72	100.00	-	92.31	93.59	94.87	94.87	94.87	93.59	94.87	92.31	92.31	96.15	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	94.87	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	94.87	CAB60716.1
Canada	89.61	90.91	91.03	91.03	91.03	91.03	93.59	92.31	92.31	-	96.15	97.44	97.44	97.44	98.72	87.18	89.74	91.03	93.59	92.31	92.31	92.31	93.59	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	93.59	ABC47124.1	
Canada	90.91	92.21	92.31	92.31	92.31	92.31	94.87	93.59	93.59	96.15	-	98.72	98.72	98.72	97.44	88.46	91.03	92.31	94.87	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	94.87	ABC47122.1	
Canada	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	97.44	98.72	-	100.00	100.00	98.72	89.74	92.31	93.59	96.15	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	96.15	ABC47120.1	
Canada	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	97.44	98.72	100.00	-	100.00	98.72	89.74	92.31	93.59	96.15	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	96.15	ABC47118.1	
Canada	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	97.44	98.72	100.00	100.00	-	98.72	89.74	92.31	93.59	96.15	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	96.15	ABC47119.1	
Canada	90.91	92.21	92.31	92.31	92.31	92.31	94.87	93.59	93.59	98.72	97.44	98.72	98.72	98.72	-	88.46	91.03	92.31	94.87	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	94.87	ABC47123.1	
Italia	92.21	90.91	92.31	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	87.18	88.46	89.74	89.74	89.74	88.46	-	89.74	94.87	91.03	88.46	88.46	88.46	89.74	89.74	89.74	89.74	89.74	91.03	91.03	89.74	CAB60710.1	
Italia	89.61	90.91	91.03	91.03	92.31	91.03	93.59	92.31	92.31	89.74	91.03	92.31	92.31	92.31	91.03	89.74	-	93.59	92.31	92.31	93.59	92.31	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	94.87	93.59	AGO50978.1	
Italia	90.91	90.91	91.03	91.03	91.03	91.03	93.59	92.31	92.31	91.03	92.31	93.59	93.59	93.59	92.31	94.87	93.59	-	93.59	93.59	93.59	93.59	94.87	94.87	94.87	94.87	94.87	96.15	96.15	94.87	CAB60711.1	
ArabiaS	92.21	94.81	94.87	94.87	94.87	94.87	97.44	96.15	96.15	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	91.03	92.31	93.59	-	94.87	94.87	94.87	96.15	97.44	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	96.15	AGL92227.1
EEUU	90.91	92.21	92.31	92.31	92.31	92.31	94.87	93.59	93.59	92.31	93.59	94.87	94.87	94.87	93.59	88.46	92.31	93.59	94.87	-	94.87	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	96.15	AFH14530.1
Brasil	90.91	93.51	93.59	92.31	93.59	92.31	94.87	93.59	93.59	92.31	93.59	94.87	94.87	94.87	93.59	88.46	93.59	93.59	94.87	94.87	-	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	97.44	ACO92345.1	
Italia	90.91	92.21	92.31	92.31	92.31	92.31	94.87	93.59	93.59	92.31	93.59	94.87	94.87	94.87	93.59	88.46	92.31	93.59	94.87	94.87	94.87	-	97.44	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	96.15	CCQ19219.1	
Egipt	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	89.74	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	97.44	-	97.44	97.44	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	97.44	ADQ27870.1
ArabiaS	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	89.74	93.59	94.87	97.44	96.15	96.15	96.15	97.44	-	97.44	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	97.44	AGL92228.1
EEUU	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	89.74	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	-	100.00	97.44	97.44	98.72	98.72	97.44	AFH14525.1
EEUU	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	89.74	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	100.00	-	97.44	97.44	98.72	98.72	97.44	AAQ18915.1
Iran	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	89.74	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	97.44	AGO50978.1	
Italia	92.21	93.51	93.59	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	89.74	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	96.15	97.44	97.44	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	97.44	CCA89319.1	
Ecuador	93.51	94.81	94.87	94.87	94.87	94.87	97.44	96.15	96.15	94.87	96.15	97.44	97.44	97.44	96.15	91.03	94.87	96.15	97.44	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	98.72	98.72	98.72	-	100.00	98.72		
Argentina	93.51	94.81	94.87	94.87	94.87	94.87	97.44	96.15	96.15	94.87	96.15	97.44	97.44	97.44	96.15	91.03	94.87	96.15	97.44	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	98.72	98.72	100.00	-	98.72	98.72	AGV15827.1	
Italia	92.21	94.81	96.15	93.59	93.59	93.59	96.15	94.87	94.87	93.59	94.87	96.15	96.15	96.15	94.87	89.74	93.59	94.87	96.15	96.15	97.44	96.15	97.44	97.44	97.44	97.44	97.44	98.72	98.72	-	CBX36147.1	

**Tabla 6. Comparación del porcentaje de identidad de parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la capsida de la cepa del *virus X de la patata*(PVX) consenso analizada en este trabajo.**

	Canada	Iran	Ecuador	Colombia	Iran	Rusia	ReinoUnido	Peru	ReinoUnido	Peru	GenBank accesión Nº
Canada	-	95.65	97.39	95.65	97.39	96.52	87.83	86.96	87.83	87.83	AAF13451.1
Iran	95.65	-	96.52	96.52	98.26	97.39	87.83	86.96	87.83	87.83	AIL49072.1
Ecuador	97.39	96.52	-	96.52	98.26	97.39	88.70	87.83	88.70	88.70	
Colombia	95.65	96.52	96.52	-	98.26	99.13	89.57	88.70	89.57	89.57	AJO26064.1
Iran	97.39	98.26	98.26	98.26	-	99.13	89.57	88.70	89.57	89.57	ACJ68407.1
Rusia	96.52	97.39	97.39	99.13	99.13	-	90.43	89.57	90.43	90.43	ABS87400.1
ReinoUnido	87.83	87.83	88.70	89.57	89.57	90.43	-	99.13	95.65	95.65	AAF89749.1
Peru	86.96	86.96	87.83	88.70	88.70	89.57	99.13	-	94.78	94.78	AIS39938.1
ReinoUnido	87.83	87.83	88.70	89.57	89.57	90.43	95.65	94.78	-	96.52	CAA80776.1
Peru	87.83	87.83	88.70	89.57	89.57	90.43	95.65	94.78	96.52	-	AIS39934.1

**Tabla 7. Comparación del porcentaje de identidad de parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la capsida de la cepa del virus *Y de la patata* (PVY) consenso analizada en este trabajo.**

	ReinoUnido	Espana	Espana	Espana	Colombia	Canada	Brasil	ReinoUnido	EEUU	ReinoUnido	Colombia	Francia	Francia	Serbia	Francia	ReinoUnido	Holanda	Francia	ReinoUnido	Colombia	EEUU	Brasil	Francia	Ecuador	Espana	Espana	Espana	GenBank accesión Nº
ReinoUnido	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	ABW04874.1
Espana	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	CAI65378.1
Espana	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	CAI65383.1
Espana	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	CAI65374.1
Colombia	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	ADX05582.1
Canada	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AAD27622.1
Brasil	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	ABF81826.1
ReinoUnido	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	ABO15921.1
EEUU	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AAB50250.1
ReinoUnido	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	ABO15903.1
Colombia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AGL72196.1
Francia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AFO84405.1
Francia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	BAG12052.1
Serbia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AJT60331.1
Francia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AIL49994.1
ReinoUnido	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	CAB51932.1
Holanda	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AFO84354.1
Francia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AIL49959.1
ReinoUnido	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AAK61859.1
Colombia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	ADX05581.1
EEUU	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AFO84393.1
Brasil	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	100.00	98.57	98.57	98.57	AIL50117.1
Francia	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	100.00	98.57	98.57	98.57	AIL50013.1
Ecuador	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	-	98.57	98.57	98.57	
Espana	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	-	100.00	100.00	CAI65380.1
Espana	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	100.00	-	100.00	CAI65382.1
Espana	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	100.00	100.00	-	CAI65385.1

## BIBLIOGRAFÍA

Abdalla, O. A. & Ali, A., 2012. First Report of Alfalfa mosaic virus Associated with Severe Mosaic and Mottling of Pepper (*Capsicum annuum*) and white clover (*Trifolium repens*) in Oklahoma. *Plant Disease*.

Aguilar-Meléndez , A., Morrell, P. L., Roose , M. L. & Kim, S. C., 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico.. *Am J Bot*, 96(6), pp. 1190-1202.

Aramburu, J., Galipienso, L. & Matas, M., 2006. Characterization of potato virus Y isolates from tomato crops in northeast Spain. *European Journal of Plant Pathology*, Volumen 115, pp. 247-258.

Arteaga, M. L. y otros, 2003. Compendium of pepper diseases. En: *The APS Press*. s.l.:s.n.

Berna, A., Briand, J. P., Garaud, C. S. & Colburn, T. G., 1986. Kinetics of Accumulation of the Three Non-structural Proteins of Alfalfa Mosaic Virus in Tobacco Plants. *J. gen. Virol.*, Issue 67, pp. 1135-1147.

CABI, 2014. *Invasive Species Compendium*. [En línea] Available at: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/43759>

[Último acceso: 02 Diciembre 2015].

Cerkauskas, R. y otros, 2004. Pepper Diseases, Alfalfa Mosaic Virus AVRDC. *The World Vegetable Center*.

Creamer, R. y otros, 2003. Compendium of pepper diseases. *The American Phytopathological Society Press*.

Delgado Junchaya, M. A. & Cedano Saavedra, C. E., 2010. Problemática de virosis en especies *Capsicum* en el norte del Perú. *Serfi*.

Du, Z. y otros, 2007. Highly sensitive fluorescent labeled probes and glass slide hybridization for the detection of plant RNA viruses and a viroid. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 5(39), pp. 326-334.

Eisel , D. y otros, 2008. *DIG Application Manual for Fliter Hybridizaion*. s.l.:ROCHE.

FAO, 2015. *FAOSTAT, ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICA*. [En línea]

Available at: <http://faostat3.fao.org/compare/S>

[Último acceso: 05 Octubre 2015].

Fauquet, C. M. y otros edits., 2005. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth Report ed. s.l.:Elsevier.

Ferguson, C., 2015. Importation of Fresh Peppers From Ecuador Into the United States. *The daily Journal of the United States Government*, 24 April, 80(79), pp. 22930-22933.

Flor, H. H., 1971. Current status of gene-for-gene concept. *Phytopathol*, Volumen 9, pp. 275-296.

Genovés Martínez, A., Pallás Benet, V. & Navarro Bohigues, J. A., 2008. *Análisis funcional y localización subcelular de las proteínas implicadas en el movimiento intra e intercelular del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV)*. Valencia: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.

Gil, J. F. & Marín, M., 2010. *DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LA PAPA EN COLOMBIA, CON ENFASIS EN EL VIRUS MOP-TOP (PMTV, POMOVIRUS)*. Medellín: s.n.

Godefroy, T., Gagey, M. J., Berna, A. & Garaud, C., 1986. A Non-structural Protein of Alfalfa Mosaic Virus in the Walls of Infected Tobacco Cells. *J. gen. Virol.*, Issue 67, pp. 2233-2239.

Goldberg, N., 2012. Extension Plant Pathology.

Green, S. K. & Kim, J. S., 1991. *Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: A Literature Review*, s.l.: s.n.

Howard, R. J., Garland, J. A. & Seaman, W. L. edits., 1994. *Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada*. Canadian Phytopatological ed. s.l.:s.n.

Huang, Y. L. y otros, 2004. Critical residues for GTP methylation and formation of the covalent m7GMP-enzyme intermediate in the capping enzyme domain of bamboo mosaic virus. *Journal Virology*, 78(3), pp. 1271-1280.

Huisman, M. J., Sarachu, A. N., Alblas, F. & Bol, J. F., 1985. Alfalfa mosaic virus temperature-sensitive mutants. II. Early functions encoded by RNAs 1 and 2. *Virology*, 141(1), pp. 23-9.

Huisman, M. J. y otros, 1986. Alfalfa mosaic virus temperature-sensitive mutants. III. Mutants with a putative defect in cell-to-cell transport. *Virology*, 154(2), pp. 401-404.

Hull, R., 2002. *Matthews' Plant Virology*. Fourth ed. Orlando: Academic Press.

Hull, R., 2009. *Comparative Plant Virology*. s.l.:Elsiever.

- Hwang, J. y otros, 2015. Plant Translation Elongation Factor 1BB Facilitates Potato Virus X (PVX) Infection and Interacts with PVX Triple Gene Block Protein 1. *Plos One*, 5(10).
- Jaspars, E. M. & Bos, L., 2005. *Description of Plant Viruses*. [En línea] Available at: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=229> [Último acceso: 23 Septiembre 2015].
- Kamer, G. & Argos, P., 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res*, 12(18), pp. 7269-7282.
- Khan, J. A. & Dijkstra, J., 2006. *Handbook of Plant Virology*. New York: The Haworth.
- Khan, M. S. y otros, 2008. Detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) in minute amounts of potato (*Solanum tuberosum* L.) leaf tissue by hybridization techniques and, together with potato viruses, multiplex RT-PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Volumen 3, pp. 97-105.
- Khurana SM, P. & Singh, M. N., 2000. Yield loss potential of potato viruses X and Y in Indian Potatoes. *Journal Indian Potato Assoc*, Volumen 15, pp. 27-29.
- Kim, S. y otros, 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics Open*, 46(3), pp. 270-279.
- King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J., 2012. *Virus Taxonomy*, San Diego, CA: s.n.
- Koenig, R. & Lesemann, D. E., 1989. *Association of Applied Biologists*. [En línea] Available at: <http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=354> [Último acceso: 05 Noviembre 2015].
- Lustig, A. & Levine, A. J., 1992. One Hundred Years of Virology. *Journal of Virology*, Agosto, 66(8), pp. 4629-4631.
- Mandic, B. et al., 2008. Incidence and genetic diversity of Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid in stone fruits in Serbia. *European Journal Plant Pathol*, February, Volume 120, pp. 167-176.
- Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. & Gil, M. I., 2004. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem*, 52(12), pp. 3861-3869.
- McLaughlin, M. R., 1991. A greenhouse method for aphid inoculation of alfalfa mosaic virus in white clover by co-culture of virus, vector, and clover. *Miscellaneous*

publication - *Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University*, Volumen 132, p. 318.

Morel, C. y otros, 2000. Biological and molecular characterization of two tomato strains of potato virus Y (PVY). *Biotic Stresses, Acta physiologiae Plantarum*, 22(3), pp. 336-343.

Murphy, J. F., 2006. Applied Aspects of Induced Resistance to Plant Virus Infection. En: G. Loebenstein & J. Peter Carr, edits. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. s.l.:Springer, pp. 1-3.

Narayanasamy, P., 2008. *Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management*. Coimbatore: Springer.

Nassuth, A., Alblas, F. & Bol, J. F., 1981. Localization of Genetic Information Involved in the Replication of Alfalfa Mosaic Virus. *J. gen. Virol.*, Issue 53, pp. 207-214.

Nicaise, V., 2014. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 5, pp. 1-12.

Pallas Benet, V., Sánchez Navarro, J., Aparicio Herrero & Herranz Gordo, 2010. España.

Riechmann, J. L., Cervera, M. T. & García, J. A., 1995. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal General Virology*, 76(4), pp. 951-956.

Riechmann, J. L., Laín, S. & García, J. A., 1992. Review article, Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, Volumen 73, pp. 1-16.

Romero, D. J., Cambra, M. & Duran Villa, N., 1995. A simple imprint-hybridization method for detection of viroids. *Journal Virology Methods*, 55(1), pp. 37-47.

Rybicki, E., 2012. *ViroBlogy, Virology-related and hopefully educational posts*. [En línea]

Available at: <https://rybicki.wordpress.com/2012/02/06/a-short-history-of-the-discovery-of-viruses-part-1/>

[Último acceso: 9 Septiembre 2015].

Sarachu, A. N. y otros, 1983. Replication of temperature-sensitive mutants of alfalfa mosaic virus in protoplasts. *Virology*, Volumen 125, pp. 64-74.

Sarachu, A. N., Huisman, M. J., Vloten-Doting L, v. & Bol, J. F., 1985. Alfalfa mosaic virus temperature-sensitive mutants. I. Mutants defective in viral RNA and protein synthesis. *Virology*, Febrero, 141(1), pp. 14-22.

- Sastry, K. S. & Zitter, T. A., 2014. Management of Virus and Viroid Diseases of Crops in the Tropics. En: *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*. s.l.:Springer, pp. 149-405.
- Schoelz, J. E., 2006. Viral Determinations of Resistance versus Susceptibility. En: G. Loebenstein & J. Peter Carr, edits. *Natural Resistance Mechanisms of Plant to Viruses*. s.l.:Springer, pp. 13-14.
- Skryabin, K. G. y otros, 1988. Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *Febs Letters*, 240(1), pp. 33-40.
- Stussi, C., Garaud, J. C., Berna, A. & Godefroy, T., 1987. In situ Location of an Alfalfa Mosaic Virus Non-structural Protein in Plant Cell Walls: Correlation with Virus Transport. *J. gen. Virol.*, Issue 68, pp. 1779-1784.
- Trucco, V., Bejerman, N., Lenardon, S. & Giolitti, F., 2014. Complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) in Argentina. *Virus Genes*, 48(3).
- Umaña Castro, R., 2010. *Diagnóstico de CBCVd(Cocadviroide) y CVd-VI(Apscaviroide) en plantaciones citrícolas del Uruguay mediante técnicas de detección basadas en Hibridación molecular no isotópica*. Montevideo: s.n.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. & Bernardi, F., 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74(1-2), pp. 157-175.
- Wen, X. X. y otros, 2009. Probe binding to host proteins: a cause for false positive signals in viroid detection by tissue hybridization.. *Virus Research*, 145(1), pp. 26-30.