

UCH-FC
Biotecnología
V 297
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CHILENOS DEL VIRUS S
DE LA PAPA PROVENIENTES DE LAS REGIONES DE
LOS RÍOS Y LOS LAGOS.**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

ESTER NOEMI VARGAS GONZALEZ

Director de Seminario de Título: Marlene Rosales V.

Profesor Patrocinante: Claudia Stange K.

Octubre, 2015
Santiago – Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

ESTER NOEMÍ VARGAS GONZÁLEZ

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA PAPA PROVENIENTES DE LAS REGIONES DE LOS RÍOS Y LOS LAGOS”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Marlene Rosales Villavicencio
Directora del Seminario de Título

Dra. Claudia Stange Klein
Prof. Patrocinante del Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Lorena Norambuena Morales
Presidenta

Dr. Patricio Arce Johnson
Evaluador



INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	ii
INDICE DE TABLAS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	2
3. HIPOTESIS.....	9
4. OBJETIVOS.....	9
4.1 Objetivo general.....	9
4.2 Objetivos específicos.....	9
5. MATERIALES Y METODOS.....	10
5.1 Colección de aislados y detección de PVS.....	10
5.2 Extracción ácidos nucleicos y detección de PVS por RT-PCR en aislados positivos a PVS por ELISA.....	11
5.3 Mejoramiento en la detección de PVS a través del diseño de nuevos partidores para amplificar la secuencia de CP en PVS	13
5.4 Análisis de las secuencias de los aislados de PVS.....	14
5.5 Diversidad nucleotídica de los aislados de PVS.....	15
5.6 Sintomatología de PVS en plantas indicadoras.....	15

6. RESULTADOS.....	16
6.1 Objetivo específico 1.....	16
6.1.1 Detección de PVS por RT-PCR en aislados positivos a PVS por ELISA a través de la amplificación de la secuencia nucleotídica de CP y proteína 11K.....	16
6.1.2 Mejoramiento en la detección de PVS a través del diseño de nuevos partidores para la amplificación de la secuencia de CP de PVS.....	18
6.1.3 Análisis de las secuencias de aislados de PVS.....	20
6.1.4 Diversidad nucleotídica de los aislados de PVS.....	26
6.2 Objetivo específico 2.....	26
6.2.1 Sintomatología de PVS en plantas indicadoras de <i>Chenopodium quinoa</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>	26
7. DISCUSION Y/O PROYECCIONES.....	32
7.1 Detección PVS mediante RT-PCR y análisis de secuencias.....	32
7.2 Sintomatología de PVS en plantas indicadoras.....	35
8. CONCLUSIONES.....	36
9 BIBLIOGRAFIA.....	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Muestras positivas serológicamente a PVS.....	11
Tabla 2 Partidores PVS-específicos.....	12
Tabla 3 Nuevos partidores PVS-específicos diseñados para el mejoramiento en la detección de PVS en aislados seleccionados.....	14
Tabla 4 Comparación del porcentaje de identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica de CP entre aislados GenBank y los aislados obtenidos pertenecientes a la raza ordinaria.....	25
Tabla 5 Comparación del porcentaje de identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica de CP entre aislados GenBank y los aislados obtenidos pertenecientes a la raza andina.....	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Organización genómica de un Carlavirus.....	5
Figura 2 Esquema de los partidores PVS-específicos y su ubicación en el genoma viral	12
Figura 3. Esquema de los nuevos partidores diseñados FS2 y RV2 en el genoma de PVS.....	14
Figura 4 Detección de PVS por RT-PCR en los aislados obtenidos, mediante la bh	
Figura 5 Detección de PVS por RT-PCR en los aislados obtenidos, mediante amplificación de la secuencia de CP con los nuevos partidores diseñados para mejorar la detección viral.....	18
Figura 6 Visualización de hibridación potencial entre los cuatro pares de partidores utilizados para amplificar la secuencia de CP de PVS a través de "Oligo analysis tool" de Operon.....	19
Figura 7 Arbol fenético elaborado con aislados de PVS basado en la secuencia nucleotídica de la CP.....	21
Figura 8 Arbol fenético elaborado con aislados de PVS basado en la secuencia aminoacídica de la CP.....	22
Figura 9 Arbol fenético elaborado con aislados de PVS basado en la secuencia nucleotídica de la proteína 11K.....	23
Figura 10 Arbol fenético elaborado con aislados de PVS basado en la secuencia aminoacídica de la proteína 11K.....	24

Figura 11 Síntomas locales en hojas de <i>Chenopodium quinoa</i> inoculadas con el aislado raza ordinaria PVS ⁰ 41242-36 Rd y aislado raza andina PVS ^A 233 CV 15 DPI.....	28
Figura 12 Síntomas en hojas sistémicas de <i>Chenopodium quinoa</i> inoculadas con el aislado raza ordinaria PVS ⁰ 41242-36 Rd y aislado raza andina PVS ^A 233 CV 20 DPI.....	28
Figura 13 Síntomas sistémicos en plantas de <i>Chenopodium quinoa</i> inoculadas con el aislado raza ordinaria PVS ⁰ 41242-36 Rd y aislado raza andina PVS ^A 233 CV 50 DPI.....	29
Figura 14 Comparación entre hoja sana y hoja infectada con PVS de <i>Chenopodium quinoa</i>	30
Figura 15 Comparación de síntomas de PVS entre plantas sana (S) y planta enferma (E) de <i>Chenopodium quinoa</i> transcurridos 20 DPI.....	30
Figura 16 Síntomas sistémicos en plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> inoculadas con el aislado raza ordinaria PVS ⁰ 41242-36 Rd transcurridos 50 DPI.....	31

ABREVIATURAS

ΔG : variación de energía libre de Gibbs

ADNc: Acido Desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

CP: Coat Protein

DPI: Dias Post Inoculación

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IgG: Inmunoglobulina G

MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus

NABP: Nucleic Acid Binding Protein

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polymerase Chain Reaction

PVA: Potato Virus A

PVS: Potato Virus S

PVS^A: PVS raza Andina

PVS^O: PVS raza Ordinaria

PVY: Potato Virus Y

RdRp: RNA dependent RNA polymerase

RT-PCR: Reverse Transcription PCR

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TGB: Triple Gene Block

1. RESUMEN

La secuencia completa (nucleótidos y aminoácidos) de la proteína de cubierta (CP) y la proteína NABP de 11 kDa (11K) de 28 aislados del *Virus S de la papa* (PVS) de dos regiones de Chile fueron analizadas y comparadas con secuencias GenBank del virus para realizar la caracterización molecular de las razas PVS. Dos de los aislados agruparon en la raza andina de PVS (PVS^A), mientras el resto se clasificó como raza ordinaria (PVS^O). Los valores de diversidad nucleotídica (π) y porcentaje de identidad de secuencia para cada raza sugieren que las mayores variaciones se encuentran en el grupo PVS^A. Los dos aislados PVS^A tienen su origen en el Archipiélago de Chiloé, pudiendo existir una relación genotipo-geográfica para este virus. Se destinó un aislado de cada raza para inocular mecánicamente plantas indicadoras de *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana tabacum* y, de esta manera, realizar el estudio de sintomatología, a modo de comprobar la caracterización molecular. Ambos aislados desarrollaron infección sistémica en el hospedero, resultado esperado para la raza andina PVS^A, pero no así para la raza ordinaria PVS^O, sugiriendo la posibilidad de una nueva variante citada en trabajos anteriores, la raza PVS^{O-CS} (CS: *Chenopodium sistémico*).

2. INTRODUCCION

La papa, *Solanum tuberosum* L., está catalogada como uno de los cultivos más importantes a nivel mundial junto al trigo y el arroz, ocupando el cuarto lugar mundial en importancia como alimento, después del maíz, trigo y arroz. Como especie, se caracteriza por entregar un buen aporte nutricional, con calorías y proteínas proporcionales a los requerimientos de un adulto promedio. El contenido de proteína de la papa es análogo a los cereales y mayor al de otros tubérculos y raíces, con respecto a su peso seco. El valor biológico de la proteína de la papa es únicamente superado por el huevo y contiene una cantidad importante de micronutrientes como la vitamina C, además de ser una buena fuente de hierro, magnesio, calcio, fósforo, potasio, folato, ácido pantoténico y riboflavina (FAO, 2008).

La papa se propaga principalmente de manera asexual a través del uso de tubérculos, tallos subterráneos engrosados por acumulación de nutrientes. De esta manera, se propagan plantando un trozo de tubérculo que tenga yema, de la cual surgirán nuevas raíces, resultando una nueva planta de papa genéticamente igual a su progenitora (Huanca, 2003). La propagación asexual reproduce clones e implica la división de las células con duplicación íntegra del núcleo y citoplasma. Por tanto, las plantas propagadas vegetativamente reproducen toda la información genética de la planta progenitora y las características específicas de una planta dada son perpetuas en la propagación de un clon. En las células vegetativas (o somáticas) pueden ocurrir cambios cromosómicos y si van seguidos por una mitosis, conducen a un cambio permanente en el clon. El concepto "tubérculo-semilla" se refiere al tubérculo que es empleado como semilla en la siembra, a diferencia de la semilla sexual de papa o también conocida como semilla botánica, la cual es producto de la unión de gametos de

plantas compatibles. La reproducción vegetativa de la papa a través de tubérculos-semilla permite establecer un cultivo vigoroso y obtener una producción genética y fenotípicamente uniforme. No obstante, el uso sucesivo de un mismo material de plantación conlleva la acumulación progresiva de patógenos que pueden afectar gravemente el rendimiento y la calidad de la producción. Por consiguiente, el uso de tubérculos-semilla sanos y fisiológicamente aptos en el momento de la plantación es un requisito básico para lograr un buen rendimiento y calidad en la producción. No obstante, la reproducción vegetativa a través de tubérculos-semillas es un proceso difícil y costoso razón por la cual en los países en desarrollo representa entre el 30% y el 60% de los costos totales del cultivo (Santos, 2003).

El tubérculo-semilla constituye el material de propagación de mayor elección. Sin embargo, es utilizado a la vez por los virus como medio de diseminación. En Chile, las enfermedades virales son uno de los problemas más importantes que afectan la producción de papas. Los virus infectan sistemáticamente los órganos vegetativos de la planta y causan una degeneración generalizada de la papa. En base a lo anterior, el primer mecanismo de control de las enfermedades virales transmitidas a través de la propagación vegetativa es la realización un diagnóstico oportuno y el uso de material libre de estos patógenos. En la agricultura moderna se utilizan métodos no convencionales para el control de enfermedades virales, que incluyen el uso de variedades resistentes, uso de semilla botánica y utilización de tubérculo-semilla certificada. Esta última conlleva el uso de diferentes tipos de técnicas de diagnóstico, como ensayos biológicos, microscopía electrónica, análisis de RNA virus-específico, hibridación de ácidos nucleicos y métodos basados en la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR). Estas últimas se agrupan dentro de las técnicas moleculares y en conjunto con las técnicas serológicas, son ampliamente utilizadas en la diagnosis.

En la actualidad, se han reportado más de 25 virus que infectan papa causando graves enfermedades en algunos casos, además de reducir significativamente el rendimiento y la calidad de los cultivos. Los virus se caracterizan por ser pequeños, parasitan obligadamente a sus hospederos, causan infecciones locales y sistémicas, se transmiten por contacto mecánico y/o vectores y presentan morfología variada. La dificultad del control sobre las enfermedades virales radica en que no poder ser controladas por métodos clásicos como los hongos y bacterias, ya que afectan tanto al patógeno como a la planta huésped. Hoy en día, para el control de las enfermedades virales se emplean métodos como el uso de variedades resistentes, uso de tuberculos-semilla certificada y uso de semilla sexual o botánica (INIA, 2008).

La producción de semilla certificada de papa en Chile es vigilada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Las normas de este programa de certificación ("Normas Generales y Específicas de Certificación de Semillas", 2000) indican que las variedades inscritas en el registro de variedades aptas para certificación deberá estar libre de los virus PLRV, PVY, PVX, y de *Erwinia* sp., lo cual tendrá que comprobarse mediante la realización de los respectivos análisis de laboratorio. Adicionalmente, el SAG ha realizado estudios de prevalencia de PVS como parte de su programa de vigilancia sanitaria. De esta forma, prospecciones realizadas en el sur de Chile durante el año 2012 revelaron que un 66.1% de los 434 predios o estaciones prospectados en las Regiones de Los Ríos-Los Lagos y la Araucanía estaban infectados con PVS (Gutiérrez, M., 2014)

Las infecciones por PVS suelen resultar asintomáticas o presentar sintomatología leve, constituyendo lo que se conoce como un virus latente. No obstante, la incidencia en un cultivo o región puede alcanzar el 100%, ya que se transmite eficientemente de forma mecánica, a través del tubérculo-semilla y a través de áfidos (*Myzus persicae*, *Aphis nasturtii*) de manera no persistente (Wardrop, 1989).

PVS pertenece al género *Carlavirus* y es uno de los virus más prevalentes en cultivos de papa en el mundo. Presenta forma filamentosa de 610-710 nm y un genoma de ARN de hebra simple y orientación positiva de cerca de 8 kb (Gil, 2012). Presenta estructuras de cap 5' y cola poli-A en el extremo 3', el genoma del virus contiene seis ORF: gen 1 corresponde a un polipéptido de 233kDa que posee motivos conservados para una helicasa, metiltransferasa y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp); los genes 2, 3 y 4 comprenden el triple bloque de genes (TGB) de 25 kDa, 12 kDa y 7kDa respectivamente, responsables del movimiento viral; el gen 5 codifica para la proteína de la cubierta (CP) de 34kDa y que se traslapa con el gen 6, codificante para una proteína de unión a ácidos nucleicos (NABP) de 11kDa (nombrada 11K en este trabajo), relevante en la transmisión por áfidos, silenciamiento de genes del hospedero y replicación viral (Matoušek, 2005) (Figura 1). PVS ha sido descrito como uno de los virus dependiente de la papa para su supervivencia y diseminación, razón por la cual se espera que en la zona de origen del tubérculo se encuentre la mayor variabilidad del virus a través de un proceso co-evolutivo (Salazar, 1995, Jones, 2009)

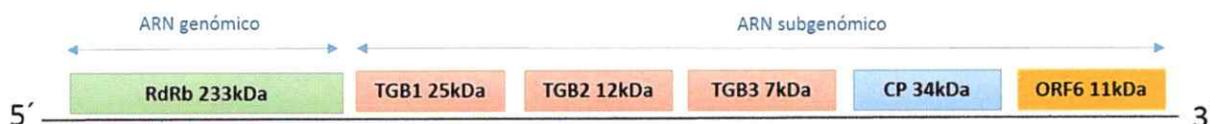


Figura 1. Organización genómica de un Carlavirus. Está compuesto por ARN genómico con cap 5' y extremo 3' poliadenilado y contiene 6 ORFs.

Se han descrito dos razas de PVS, PVS⁰ (ordinaria) y PVS^A (andina) basado en la capacidad de inducir infección sistémica en *Chenopodium quinoa* por parte de PVS^A, en lugar de las lesiones locales inducidas por PVS⁰. Aunque ambas razas inducen lesiones cloróticas locales, PVS^A difiere de PVS⁰ porque alcanza una mayor concentración en las hojas (Rose, 1983) y presenta una sintomatología más evidente, incluyendo senescencia prematura y clorosis sistémica. Por su parte, PVS⁰ produce infecciones asintomáticas en la mayoría de los cultivares de papa, aunque en algunas ocasiones puede provocar rugosidad, depresión venosa y "bronceado" (Dolby, 1987). No obstante, investigaciones recientes han revelado variantes de PVS⁰ capaces de invadir *C. quinoa* de forma sistémica pero que difieren filogenéticamente de la raza PVS^A, la cual presenta esta característica en todos los aislados reportados (Cox y cols, 2010). Esta nueva variante de PVS⁰ ha sido denominada PVS^{0-CS} (CS: *Chenopodium sistémico*) (Matoušek y cols, 2005).

Como se mencionó anteriormente, una detección viral oportuna es clave en el control de enfermedades virales. Los métodos de detección más utilizados corresponden a pruebas serológicas, uso de plantas indicadoras y pruebas moleculares. En primer lugar, el método serológico, basado en la reacción antígeno-anticuerpo, es ampliamente usado en muchos países productores de papas. Se caracteriza por ser preciso y se realiza en un breve tiempo, al contrario de las plantas indicadoras. El proceso se lleva a cabo mediante el test de ELISA, a través de anticuerpos específicos para reconocer el virus. En relación al segundo método, una planta indicadora es aquella que presenta una reacción rápida y característica a un virus, que puede no apreciarse en la planta del cultivo estudiado, en este caso, la papa. Una buena planta indicadora reacciona a los pocos días posteriores a la inoculación, formándose lesiones locales

(lugar de origen de la infección viral). En el caso de PVS, las plantas indicadoras utilizadas suelen ser *Chenopodium quinoa* y *Chenopodium amaranticolor*, con el objetivo de diferenciar razas. PVS^A invade sistémicamente la planta, provocando lesiones en hojas lejanas al punto original de infección, mientras PVS^O provoca lesiones sólo a nivel local. *Nicotiana tabacum* también es utilizada como planta indicadora, pero en este caso, sólo para confirmar la infección, ya que no hay diferencias al ocupar inóculos de razas diferentes. Infecciones por PVS muestran un amplia gama de expresión de síntomas, que abarcan desde reacciones asintomáticas a mosaicos leves, incluyendo moteados y rugosidad de las hojas. Debido al efecto sinérgico de PVS al co-infectar con otros virus, como el virus de la papa A (PVA) y virus de la papa Y (PVY), se describen reducciones de rendimiento de los cultivos de papa entre 10 y 20% a causa de este agente viral (Fraser, 1987). Finalmente, el método de detección basado en técnicas moleculares provee mayor exactitud y menor tiempo de ejecución que los dos métodos antes descritos. Mediante la extracción de ácidos nucleicos y posterior amplificación de un fragmento determinado mediante la reacción de PCR, es posible identificar la presencia de determinado virus. PVS y sus dos razas también pueden ser diferenciadas genéticamente, debido a variaciones en las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas de las proteínas TGB3 de 7kDa, CP y 11K. Una característica de PVS es que, generalmente, es asintomático en los cultivos de papa, pero debido su alta prevalencia en las zonas prospectadas, es necesario realizar estudios de caracterización biológica y genética.

El trabajo realizado por investigadores colombianos (Gil, J.F. y cols, 2012) fue uno de los primeros en reportar raza andina del virus en los Andes sudamericanos. PVS^A fue la más registrada en el análisis de variabilidad genética, al incluir 12 de 15

aislamientos secuenciados. Otros estudios en esta parte del continente han contribuido al mayor conocimiento de la secuencia completa de aislados del virus, tal como lo explica Geraldino. P y cols (2011) donde se reporta por primera vez la secuencia genómica completa de un aislado andino de Brasil, evidenciando recombinación entre razas de PVS. Sin embargo, en nuestro país, no se han efectuado estudios moleculares y biológicos con el fin de caracterizar las razas de este virus. Como respuesta, se presenta este estudio donde aislados nacionales fueron secuenciados por primera vez y dos de ellos caracterizados biológicamente al ser inoculados en plantas indicadoras. Es de esperarse, debido a nuestra ubicación geográfica y apoyado por el trabajo de Gil, J.F. y cols, (2012) que la raza andina de PVS sea prevalente por sobre la raza ordinaria.

3. HIPOTESIS

Las razas andinas de PVS son las variantes prevalentes de este virus en la zona sur del país.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar genética y biológicamente las razas de PVS provenientes de predios agrícolas de las regiones de Los Ríos y Los Lagos, basándose en análisis de la secuencia de la proteína de la cubierta viral y la sintomatología inducida por las posibles variantes del virus en hospederos herbáceos.

4.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Caracterizar las variantes genéticas de PVS a través del estudio de la secuencia nucleotídica y aminoácidica de la proteína de cubierta viral (CP) y proteína NABP (11K).

Objetivo específico 2: Caracterizar sintomatología de aislados seleccionados de PVS en hospederos herbáceos utilizados como plantas indicadoras, tales como *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana tabacum*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colección de aislados y detección de PVS

Se realizó un muestreo en un total de 339 predios de papa pertenecientes a las regiones de Los Ríos y Los Lagos, entre septiembre de 2011 y enero de 2012. Las muestras corresponden a plantas asintomáticas y plantas con síntomas de virosis, las cuales fueron analizadas previamente mediante test de ELISA en busca de PVS en los laboratorios del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) de Osorno. Posteriormente, se utilizó el antisuero Bioreba que contiene el anticuerpo IgG para los virus PVS, PVX, PVY y PLRV, con el fin de diferenciar infecciones virales mixtas de infecciones virales únicas. Por último, las muestras fueron liofilizadas para su mejor conservación. Desde esta colección analizada serológicamente, se seleccionaron al azar muestras positivas a PVS, que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Muestras positivas serológicamente a PVS. Selección para el análisis molecular.

Nº	Aislado	Comuna	Región	Código
1	63	Queilen	Los Lagos	QE
2	67	Lanco	Los Ríos	LA
3	71	Panguipulli	Los Ríos	PG
4	101	Puerto Varas	Los Lagos	PV
5	106	Los Muermos	Los Lagos	LM
6	122	La Unión	Los Ríos	LU
7	125	Quemchi	Los Lagos	QU
8	133	Paillico	Los Ríos	PA
9	165	La Unión	Los Ríos	LU
10	178	Ancud	Los Lagos	AN
11	181	Los Lagos	Los Ríos	LG
12	208	Quemchi	Los Lagos	QU
13	233	Curaco de Vélez	Los Lagos	CV
14	242	Chonchi	Los Lagos	CH
15	250	Chonchi	Los Lagos	CH
16	256	Dalcahue	Los Lagos	DA
17	300	Chonchi	Los Lagos	CH
18	310	Curaco de Vélez	Los Lagos	CV
19	331	Chonchi	Los Lagos	CH
20	335	Chonchi	Los Lagos	CH
21	351	Mariquina	Los Ríos	MA
22	387	Lanquihue	Los Lagos	LQ
23	405	Puerto Octay	Los Lagos	PO
24	419	Llanquihue	Los Lagos	LQ
25	1.2 CH	Puqueldón	Los Lagos	PU
26	3.2 CH	Puqueldón	Los Lagos	PU
27	4 CH	Puqueldón	Los Lagos	PU
28	9.2 CH	Chonchi	Los Lagos	CH

5.2 Extracción ácidos nucleicos y detección de PVS por RT-PCR en aislados positivos a PVS por ELISA.

Las muestras seleccionadas fueron sometidas a extracción de ácidos nucleicos totales según el protocolo de Bertheau (Bertheau y cols, 1998), basado en el uso de sílica en presencia de yoduro de sodio. Como el virus tiene genoma de ARN, el ADNc fue sintetizado utilizando la enzima transcriptasa MMLV (Invitrogen) y hexámeros

sintetizados al azar como partidores. La clasificación de razas y análisis molecular se realizó en base al gen de CP y de la proteína 11K, que se muestran en la Tabla 2 y Figura 2.

Tabla 2. Partidores PVS-específicos

Partidor	Secuencia 5'-3'	Posición	Región	Ta (°C)	Fragmento	Origen
CP1 (F)	CACCTTTAGGTTACAGG	7168-7185	CP	50,0	669 pb	Cox y cols, 2010
CP3 (R)	AATCYGAAGGTGGCCTATT	7829-7811	CP	52,3		
CP2 (F)	GCAGGGACYGTKGAGTTC	7679-7696	CP	55,8	496 pb	
CP4 (R)	CACAACTTCAACTGGCAA	8149-8167	CP	51,3		
F102 (F)	GGGGCTCATACGCAGACCCACAC	7921-7943	11K	65,3	485 pb	Salari y cols, 2011
R102 (R)	TCTGACTTTGCACCATGGGTGG	8405-8384	11K	59,9		

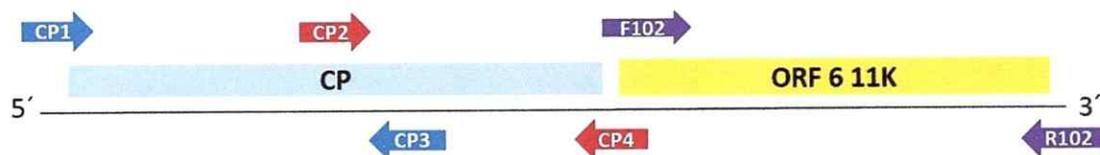


Figura 2. Esquema de los partidores PVS-específicos y su ubicación en el genoma viral. Los amplicones de 669 pb y 496 pb al ser concatenados, forman en conjunto la secuencia completa del gen de CP de 890 pb aprox

La reacción de PCR tuvo un volumen final de 25 μ l, conteniendo 5 pmol de partidores forward y reverse y 3 μ l de cDNA. El programa de termociclador consistió en una denaturación inicial de 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, la

correspondiente temperatura de annealing previamente ajustada para cada par de partidores (55°C para CP1-CP3 y 58°C para CP2-CP4 y FR102) por 30 s y 72°C por 1 min, seguido de una extensión final de 72°C por 3 min. Las reacciones fueron llevadas a cabo en el termociclador Veriti de Applied Biosystems. Finalmente, los productos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% con tinción Red gel en buffer TAE 1X.

5.3 Mejoramiento en la detección de PVS a través del diseño de nuevos partidores para amplificar la secuencia de CP de PVS.

Debido a problemas de diseño de los partidores CP1, CP2, CP3 y CP4 usados en primera instancia para amplificar la secuencia de CP de PVS (Cox y cols, 2010), fue necesario diseñar nuevos partidores para ese ORF. Basado en la secuencia de CP completa, se utilizó la plataforma web del programa Primer3 (Ye y cols, 2012) para diseño de partidores. Una vez generados los partidores FS2 (F) y RV2 (R), se utilizó la aplicación web mFOLD (Zuker, 2003) en busca de formación potencial de estructura secundaria y análisis termodinámico de los partidores. Finalmente, las secuencias fueron analizadas en BLASTn para comprobar la especificidad. Los partidores obtenidos y la forma de combinarlos con otros ya descritos, se muestran en la Tabla 3. Como criterios para el diseño, se buscó obtener partidores con el mejor porcentaje de GC, mínima auto-complementariedad y máxima sensibilidad posible, como características principales.



Tabla 3. Partidores FS2 y RV2, diseñados para el mejoramiento en la detección de PVS. Los nuevos partidores aparecen destacados en gris, mientras aquellos ya utilizados, aparecen sin destacar (CP1 y CP4).

Partidor	Secuencia 5'-3'	Posición	Región	Ta (°C)	ΔG (kcal/mol)	Fragmento
FS2 (F)	GAGCAAATGGCACAAATCA	7553-7571	CP	51,5	0,1	464 pb
CP4 (R)	CACAAACTTCAACTGGCAA	8149-8167	CP	51,3	-----	
CP1 (F)	CACCTTAGGTTACAGG	7168-7185	CP	50,0	-----	856 pb
RV2 (R)	GCCAATCGCTCATTCTGTT	8023-8004	CP	53,8	0,3	

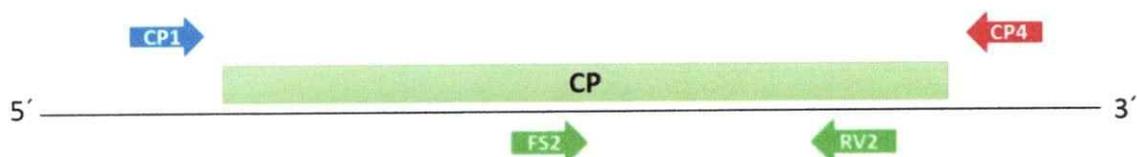


Figura 3. Esquema de los nuevos partidores diseñados, FS2 y RV2 y su ubicación en el genoma de PVS. Mejoramiento en la detección de PVS en los aislados obtenidos.

5.4 Análisis de las secuencias de aislados de PVS

Los productos de PCR, obtenidos de manera directa o clonados, fueron purificados, secuenciados (Macrogen, Corea) y editados con el programa Geneious® Pro (v5.6.5, Biomatters) para así obtener la secuencia completa de los genes de CP y 11K. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple, tanto nucleotídico como aminoacídico, que incluyó todas las secuencias obtenidas del estudio y secuencias de referencia tanto de CP como de proteína 11K provenientes de GenBank. A través del programa Geneious® Pro se realizó el alineamiento global, estableciéndose un costo en la matriz de similitud del 65%, un costo para los gap de 12 y un costo para la extensión de 3. Para establecer las relaciones entre los aislados, se utilizó el modelo Tamura-Nei

para calcular las distancias genéticas y el método UPGMA para la construcción del árbol fenético. Las relaciones fenéticas son similares a las relaciones filogenéticas, pero no consideran historia evolutiva, agrupando los aislados en base a criterios moleculares, independiente a su parentesco. Adicionalmente, se utilizó el herramienta online Clustal Omega (Sievers y cols, 2011), el cual compara secuencias a través del cálculo de los porcentajes de identidad, con el propósito de comparar los aislados en base a un aislado de referencia de GenBank, para ambas razas (en caso de CP).

5.5 Diversidad nucleotídica π de los aislados de PVS.

Se realizó un análisis genético global de las secuencias para calcular la diversidad nucleotídica (π) de los genes de CP y 11K, comparando el valor obtenido para ambas razas de PVS mediante el programa DnaSP (Librado y cols, 2009). El concepto de diversidad nucleotídica hace referencia al número promedio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas de a pares y al azar. Por lo tanto, una forma de estimar la variabilidad genética es a través del cálculo de π .

5.6 Sintomatología de PVS en plantas indicadoras.

Se realizó la inoculación mecánica en las plantas indicadoras *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana tabacum* con un aislado perteneciente a cada una de las razas de PVS. El inóculo de raza ordinaria se obtuvo desde tejido fresco de una planta enviada desde Temuco, cuyo código es 41242-36 Rd, mientras que como inóculo de raza andina se utilizó tejido liofilizado de la muestra 233-CV. Cada muestra se inoculó en triplicado, incluyendo el control negativo. Posteriormente, para verificar si la infección ocurrió, se

analizó vía RT-PCR, tanto en la hoja inoculada (infección local) como en hojas distantes (infección sistémica).

El buffer fosfato 0,05M pH 8 utilizado para inocular contiene Na_2HPO_4 0,046M y NaH_2PO_4 8,5mM. En un mortero con pistilo, se maceraron entre 2 a 4 g de material vegetal infectado con PVS mezclado con 3 mL de buffer fosfato y una pequeña porción de carborundum como abrasivo. La inoculación se realizó a los 14 DPI, en las primeras hojas verdaderas (no cotiledones) y acorde al protocolo de inoculación de Hiruki, (Hiruki, 1975) donde se establecen condiciones controladas de 24 hrs de oscuridad previas y ambiente a 27°C durante la inoculación y todo el crecimiento posterior de la planta indicadora. Las hojas se limpiaron con agua destilada y se aplicó el macerado con algodón.

6. RESULTADOS

6.1 Objetivo específico 1: Caracterizar las variantes genéticas de PVS a través del estudio de la secuencia nucleotídica y aminoácídica de la proteína de cubierta viral (CP) y proteína NABP (11K).

6.1.1 Detección de PVS por RT-PCR en aislados positivos a PVS por ELISA a través de la amplificación de la secuencia nucleotídica de CP y proteína 11K.

Los resultados de los análisis efectuados por RT-PCR para la detección de PVS muestran que, del total de los aislados analizados, todos resultaron positivos al virus. En la Figura 4, donde se observa una imagen con algunos de los aislados como ejemplo de las amplificaciones, se aprecian bandas nítidas, indicando una carga viral adecuada para el análisis posterior.

Durante el proceso de amplificación, los partidores mostrados en la Tabla 2 presentaron problemas en la amplificación. Para la mayoría de los aislados, sólo una re-amplificación fue necesaria para obtener una banda adecuada y luego secuenciar dicho fragmento. No obstante, en los aislados 106, 122, 233, 256 y 3.2CH no fue posible amplificar el fragmento pequeño de la secuencia de CP (496 pb) y en el análisis de secuencia, dos de aquellos aislados resultaron ser los únicos representantes de la raza andina del virus dentro del total, por lo tanto, debían ser secuenciados por completo y no parcialmente. Debido a lo anterior, se analizaron los partidores potencialmente defectuosos mediante los programas Primer3, mFold y la plataforma online "Oligo analysis tool" (Eurofins MWG Operon), mostrando problemas de diseño, debido a que tenían alta probabilidad de formar dímeros entre ellos. Por lo tanto, se procedió a elaborar nuevos partidores en base a la secuencia de CP obtenida desde el alineamiento con los aislados propios y de GenBank.

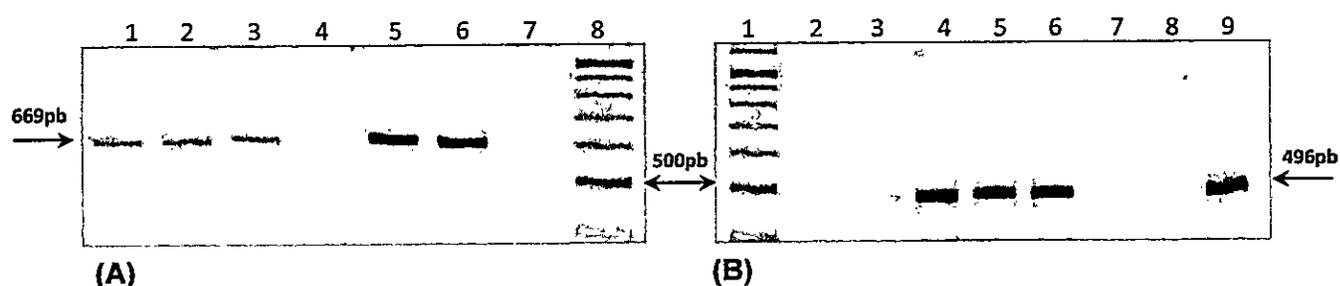


Figura 4. Detección de PVS por RT-PCR en los aislados obtenidos, mediante la amplificación de la secuencia de CP. Los fragmentos de 669 pb y 496 pb conforman en conjunto la secuencia completa de la proteína de cubierta viral. (A) CP1-CP3 de 669 pb. Carril 1: aislado 119, carril 2: aislado 104, carril 3: aislado 331, carril 4: aislado 604, carril 5: muestra 419, carril 6: control positivo, carril 8: control negativo, carril 9: marcador molecular GeneRuler 100 pb. (B) CP2-CP4 de 496 pb. Carril 1: marcador molecular GeneRuler 100 pb, carril 2: aislado 651, carril 3: aislado 331, carril 4: aislado 419, carril 5: aislado 405, carril 6: aislado 106, carril 7: aislado 604, carril 8: control negativo, carril 9: control positivo.

6.1.2 Mejoramiento en la detección de PVS a través del diseño de nuevos partidores para la amplificación de la secuencia de CP de PVS.

Dos nuevos partidores fueron diseñados ya que no fue posible amplificar el fragmento pequeño de la secuencia de CP (496 pb) en cinco aislados ya citados. Se identificaron problemas de diseño en los partidores utilizados en primera instancia para detectar PVS basándose en la secuencia de CP (CP1, CP2, CP3 y CP4). Los nuevos partidores, FS2 y RV2, se utilizaron con los partidores CP4 y CP1 respectivamente, generando amplicones de 464 pb y 856 pb (Tabla 3). De la misma manera en que los antiguos partidores utilizados para amplificar la secuencia de CP generaban dos fragmentos que en conjunto formaban la secuencia completa, los nuevos amplicones de 856 pb y 464 pb (Figura 5) generan la secuencia completa de CP (890 pb aprox.) al ser concatenados.

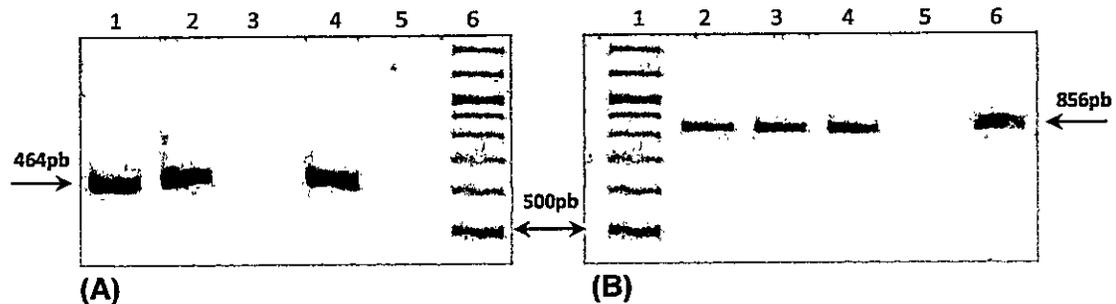


Figura 5. Detección de PVS por RT-PCR en los aislados obtenidos, mediante la amplificación de la secuencia de CP con los nuevos partidores diseñados para mejorar la detección viral. (A) FS2-CP4 de 464 pb. Carril 1: aislado 233, carril 2: aislado 178, carril 3: aislado 604, carril 4: control positivo, carril 5: control negativo, carril 6: marcador molecular GeneRuler 100 pb. (B) CP1-RV2 de 856 pb. Carril 1: marcador molecular GeneRuler 100 pb, carril 2: aislado 233, carril 3: aislado 419, carril 4: aislado 178, carril 5: control negativo, carril 6: control positivo.

Adicionalmente, los valores de ΔG para evaluar la tendencia de los dos nuevos partidores diseñados (FS2 y RV2) a formar estructuras secundarias fueron calculados a través de mFold, mostrando un valor de energía libre positivo para ambos. Mientras más positivo es el valor de la energía libre de Gibbs, menos probable es la formación de estructura secundaria entre los partidores, ya que la reacción no es espontánea. Sin embargo, donde mayores problemas presentaron los partidores CP1, CP2, CP3 y CP4 (usados en primera instancia para amplificar la secuencia de CP) fue al visualizarlos en "Oligo analysis tool" de Operon, donde mostraron alta susceptibilidad de formar dímeros entre ellos, destacándose en líneas de cruces remarcadas en amarillo (Figura 6A). En cambio, los nuevos oligos diseñados, al ser analizados junto a su par respectivo, mostraron ser menos favorables a la formación de dímeros (Figura 6B), visualizándose solo una línea de cruces en el caso del par CP1-RV2 y ninguna en el par FS2-CP4.

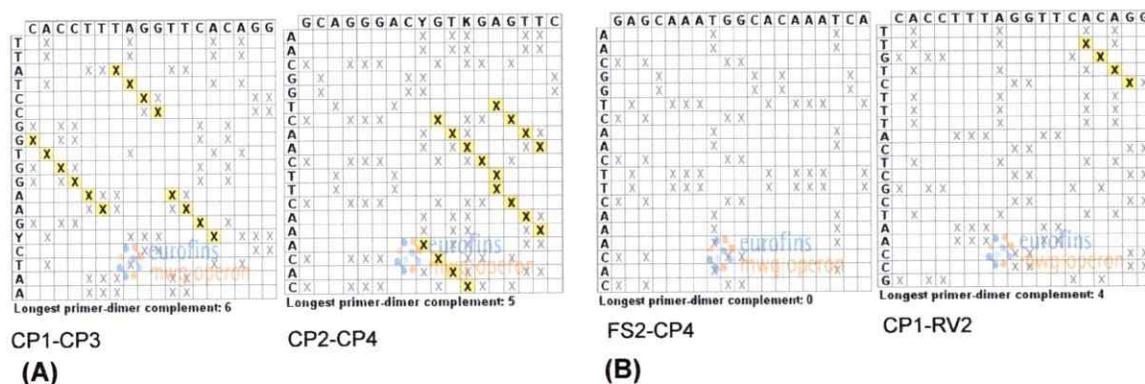


Figura 6. Visualización de hibridación potencial entre los cuatro pares de partidores utilizados para amplificar la secuencia de CP de PVS a través de "Oligo analysis tool" de Operon. (A) Pares CP1-CP3 (669 pb) y CP2-CP4 (496 pb) y (B) Pares conformados con los nuevos partidores diseñados para mejorar la detección de PVS, FS2-CP4 (464 pb) y CP1-RV2 (856 pb). La formación de dímeros se visualiza como una línea de cruces remarcada en amarillo.

6.1.3 Análisis de secuencias

Un total de 45 aislados fueron analizadas en base a la CP, incluyendo 17 aislados obtenidos desde GenBank (identificados según número de accesoión y donde ninguno es de origen chileno) y los 28 aislados nacionales resultantes de este estudio. Una vez secuenciados cada uno de los aislados, se establecieron relaciones fenéticas, similar a las relaciones filogenéticas, pero que no consideran historia evolutiva. Tanto para la secuencia de CP como la secuencia de proteína 11K, los arboles fenéticos resultantes agruparon los aislados en base a criterios moleculares, independiente a que fueran grupos emparentados previamente. El árbol fenético obtenido para el gen de CP mostró los aislados en dos grupos principales acorde a las razas descritas previamente, PVS^O (ordinaria) y PVS^A (andina). Dos de los aislados nacionales, 233 y 3.2CH, agruparon en PVS^A, mientras que el resto lo hizo en PVS^O. Tanto el alineamiento nucleotídico (Figura 7) como aminoacídico (Figura 8) mostraron correlación en el agrupamiento de razas de PVS. Como outgroup se utilizó un aislado del Virus Y de la papa (PVY), un potyvirus, cuyo número de accesoión es AB714135.

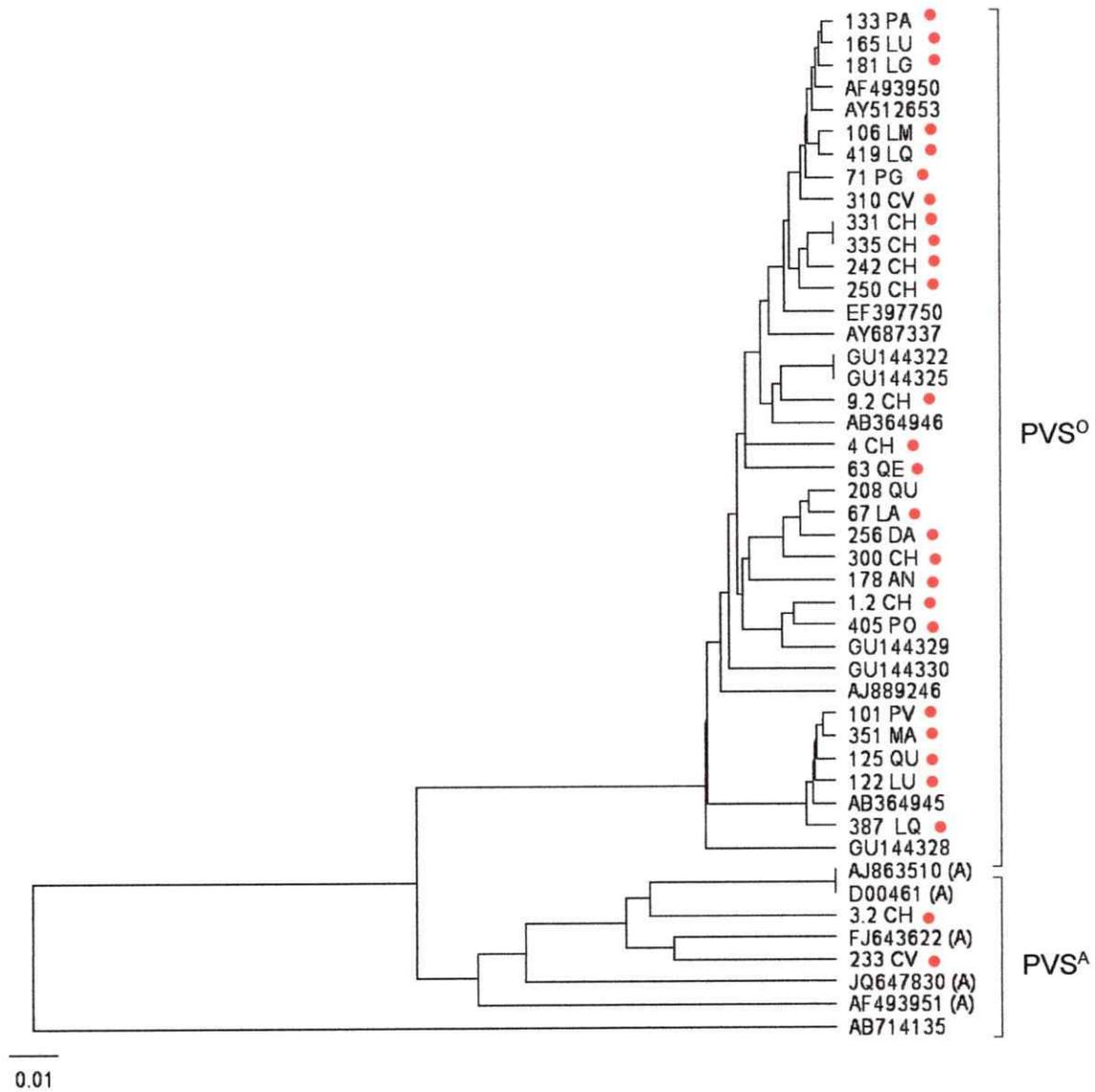


Figura 7. Arbol fenético con la secuencia nucleotídica de CP de los aislados de PVS. Los aislados identificados con una (A) corresponden a raza andina PVS^A, mientras el resto es raza ordinaria PVS^O. Como outgroup se utilizó el virus de la papa PVY (AB714135). Los aislados nacionales están identificados con un punto rojo.

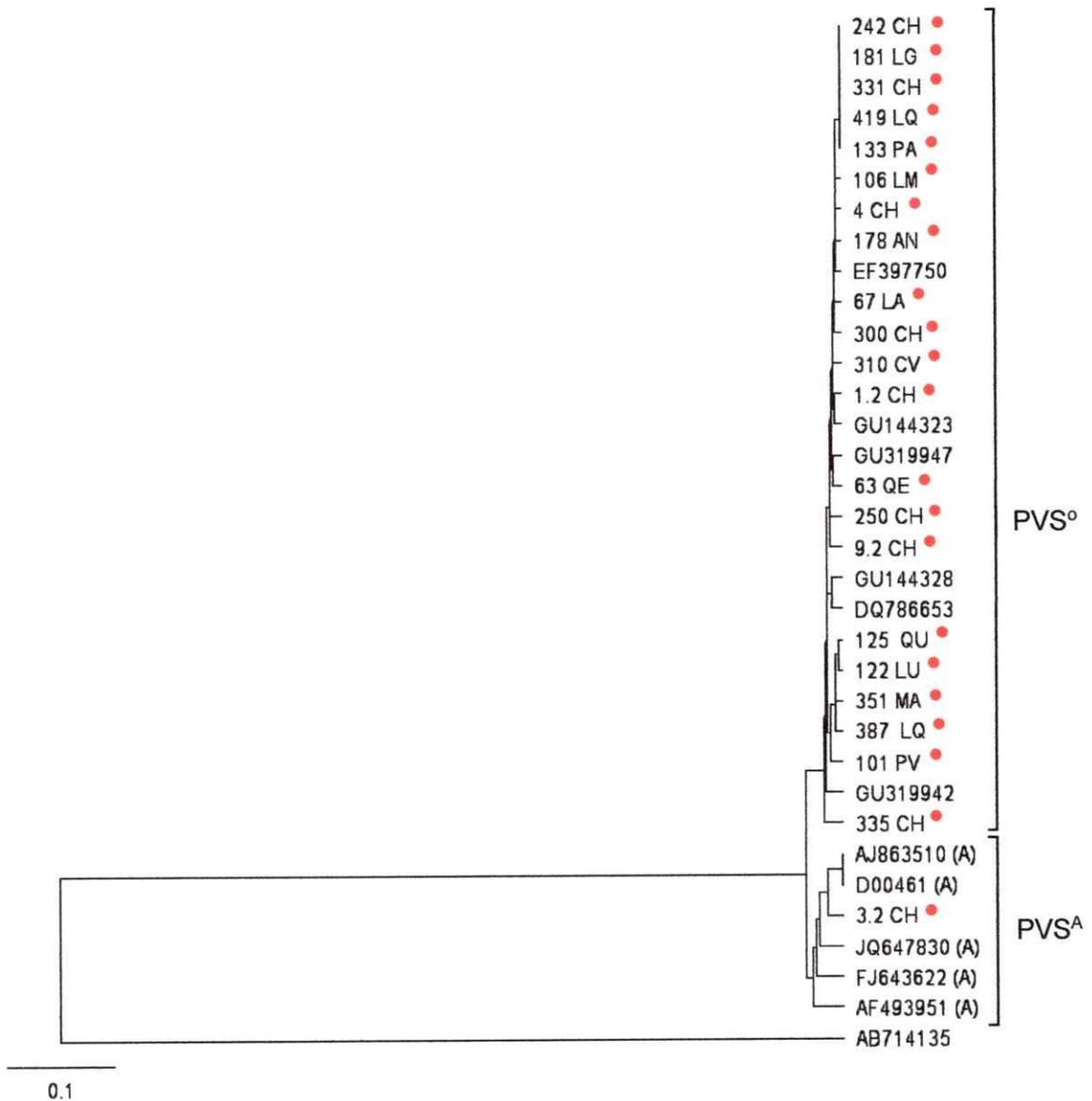


Figura 8. Arbol fenético con la secuencia aminoacídica de CP de los aislados de PVS. Los aislados identificados con una (A) corresponden a raza andina PVS^A, mientras el resto es raza ordinaria PVS°. Como outgroup se utilizó el virus de la papa PVY (AB714135). Los aislados nacionales están identificados con un punto rojo.

En cuanto al gen 11K, se seleccionaron algunos aislados de entre los 28 utilizados para el análisis de CP. El agrupamiento por razas se mantuvo solo en los aislados obtenidos de GenBank, no así en las muestras propias, tanto en el alineamiento de nucleótidos (Figura 9) como de aminoácidos (Figura 10). Los aislados 233 y 3.2CH que previamente se agruparon con las accesiones de la raza PVS^A, se agruparon con el resto de PVS^O. Como outgroup también se utilizó el aislado AB714135 (PVY).

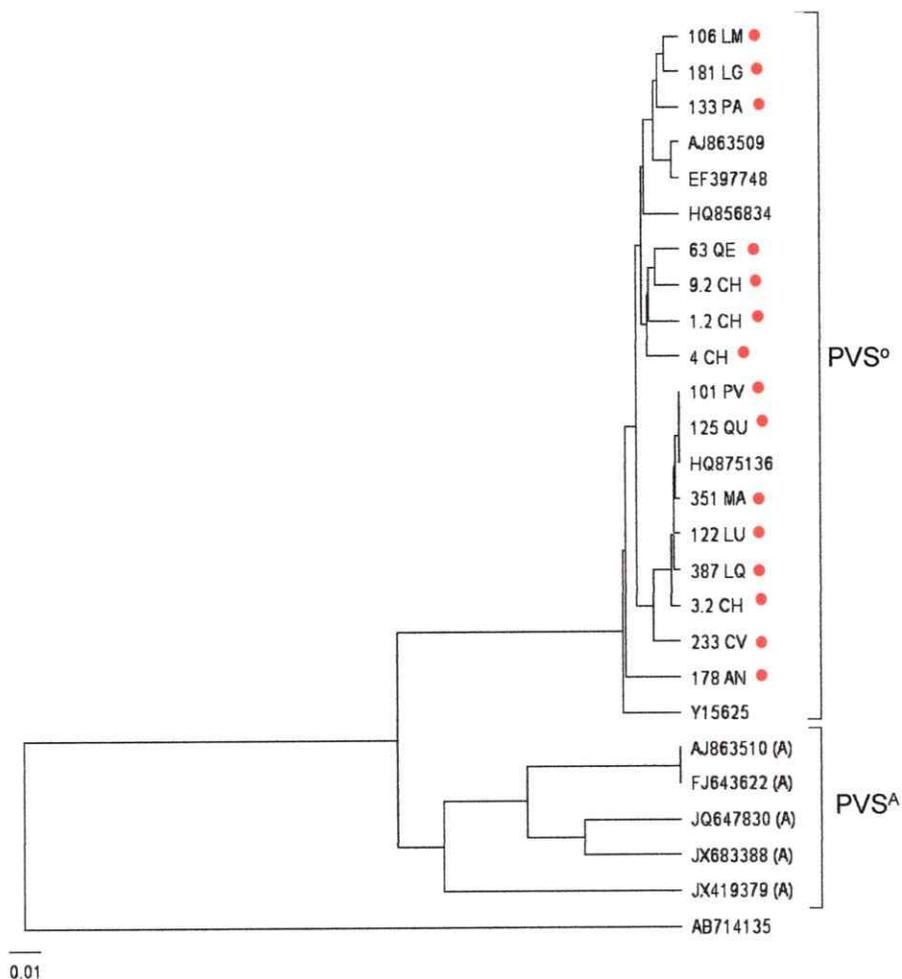


Figura 9. Arbol fenético con la secuencia nucleotídica de proteína 11K de los aislados de PVS. Los aislados identificados con una (A) corresponden a raza andina PVS^A, mientras el resto es raza ordinaria PVS^O. Como outgroup se utilizó el virus de la papa PVY (AB714135). Los aislados nacionales están identificados con un punto rojo.

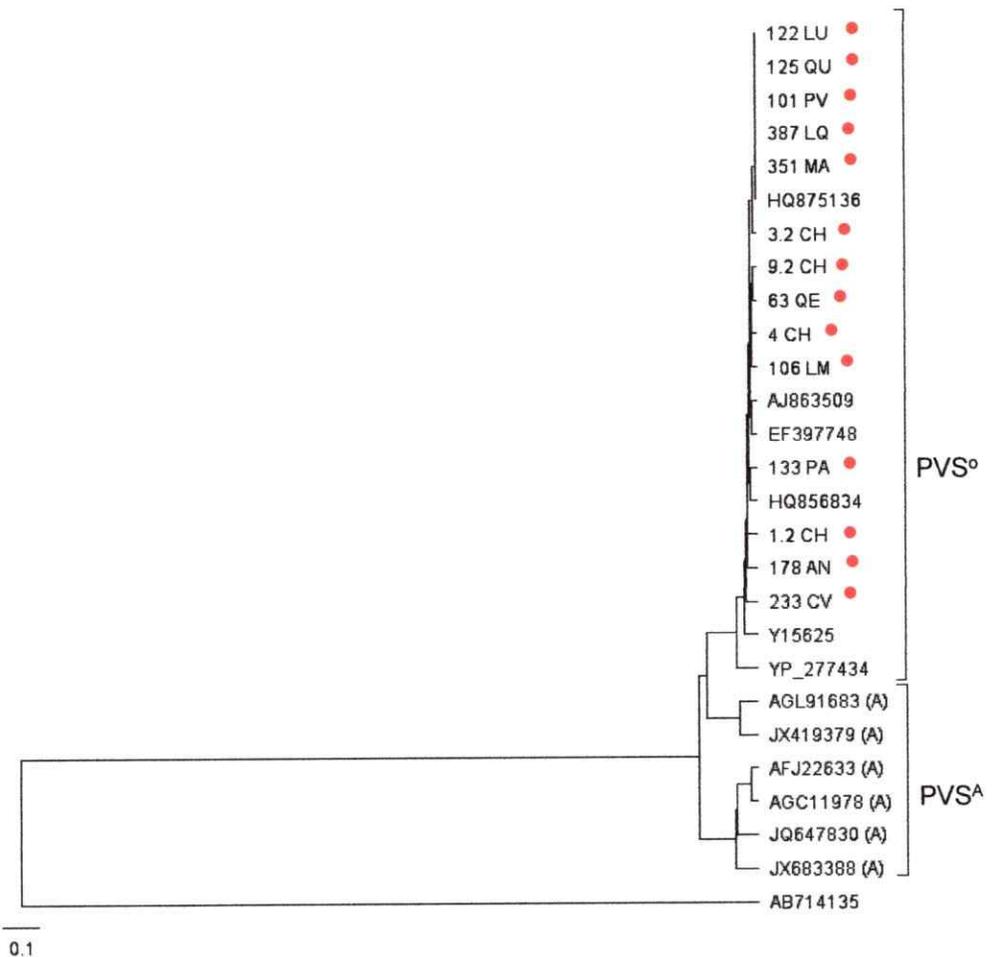


Figura 10. Arbol fenético con la secuencia aminoacídica de proteína 11K de los aislados de PVS. Los aislados identificados con una (A) corresponden a raza andina PVS^A, mientras el resto es raza ordinaria PVS^o. Como outgroup se utilizó el virus de la papa PVY (AB714135). Los aislados nacionales están identificados con un punto rojo.

Utilizando Clustal Omega se obtuvo un alto porcentaje de identidad entre los aislados de ambas razas comparados con las secuencias de referencia PVS en GenBank para cada una de ellas. Los aislados de raza ordinaria se compararon con tres aislados raza ordinaria de Genbank GU144329, AB364946 y EF397750 (Tabla 4A), arrojando valores de identidad entre 73,53% y 98,38% en nucleótidos y desde 64,35%

a 99,3% en aminoácidos. Mientras, los dos aislados que resultaron agrupar con la raza andina fueron comparados con los aislados raza andina GenBank AF493951, AJ863510 y FJ643622 (Tabla 4B) cuyos valores de identidad de secuencia fluctuaron entre 65,67% y 72,7% en nucleótidos y 94,9% y 97,27% en aminoácidos.

Tabla 4. Comparación del porcentaje de identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica de CP entre aislados GenBank y los aislados obtenidos pertenecientes a la raza andina de PVS.

Aislado	GU144329		AB364946		EF397750	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa
63	74.68	89.83	73.92	66.43	94.23	97.91
67	75.78	90.07	73.87	66.19	93.84	98.61
101	74.31	89.36	73.87	65.71	94.08	97.55
106	75.52	90.31	73.53	66.43	93.84	98.61
122	74.31	89.83	74.45	66.43	95.01	97.55
125	73.55	87.50	75.77	64.35	96.08	97.79
133	75.98	90.54	75.80	66.67	95.25	99.30
178	75.78	90.31	76.95	66.43	96.29	98.95
181	75.64	90.54	76.41	66.67	96.41	99.30
242	75.78	90.31	75.72	66.43	97.23	98.95
250	75.26	90.07	76.06	66.67	97.46	98.26
300	75.89	90.07	74.91	66.19	98.26	98.26
310	75.52	89.60	75.34	65.71	96.42	97.56
331	75.87	90.54	75.72	66.67	97.69	99.30
335	75.00	90.09	75.95	66.51	97.92	98.26
351	73.96	89.13	75.83	65.71	97.81	97.20
387	74.19	89.13	73.76	65.71	93.84	97.20
419	75.64	90.54	75.83	66.67	98.15	99.30
1.2 CH	77.18	90.54	76.18	65.95	98.38	98.26
4 CH	75.42	90.09	75.60	65.79	95.60	98.21
9.2 CH	75.72	89.60	75.20	66.91	95.36	97.56

Tabla 5. Comparación del porcentaje de identidad de secuencia nucleotídica y aminoacídica de CP entre aislados GenBank y los aislados obtenidos pertenecientes a la raza ordinaria de PVS.

Aislado	AF493951 (A)		AJ863510 (A)		FJ643622 (A)	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa
3.2 CH	67.74	94.90	72.70	97.27	72.45	96.94
233	65.67	95.24	69.82	95.90	71.87	96.94

6.1.4 Diversidad nucleotídica π de los aislados de PVS.

Entre ambas razas, el mayor valor de π se observó en PVS^A, específicamente en la raza andina. Para el gen de la proteína 11K, el grupo PVS^A arrojó un valor de 0,1, mientras el grupo PVS^O obtuvo 0.04. En el gen de CP, π fue 0.3 para el grupo PVS^A y 0,2 para PVS^O. Ya que el índice de diversidad nucleotídica es un cálculo que permite estimar la variabilidad genética de determinadas secuencias, mientras mayor es el valor, mayor diversidad presenta la secuencia, al ser comparada con otra en cuanto a los sitios distintos que ambas presenten.

6.2 Objetivo específico 2: Caracterizar sintomatología de aislados seleccionados de PVS en hospederos herbáceos utilizados como plantas indicadoras, tales como *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana tabacum*.

6.2.1 Sintomatología de PVS en plantas indicadoras de *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana tabacum*.

La inoculación del virus se realizó con los aislados 233 CV correspondiente a la raza andina y el aislado 41242-36 Rd, correspondiente a raza ordinaria. En términos generales, PVS^O se caracteriza por desarrollar infección localizada, es decir, sólo en la

hoja que ha sido infectada por el virus, mientras PVS^A lo hace de forma sistémica, en donde hojas lejanas al origen de la infección desarrolla los síntomas característicos. Aunque ambas razas inducen lesiones cloróticas locales, PVS^A difiere de PVS^O porque alcanza una mayor concentración en las hojas.

La observación de síntomas fue cuantitativa, centrándose la atención en clorosis parcial o total, formación de mosaico foliar, puntos necróticos y deformación foliar. Todos los ejemplares inoculados, tanto de *Ch. quinoa* y *N. tabacum*, mostraron síntomas de virosis, con una buena eficiencia de inoculación. Mientras que las plántulas de *Ch. quinoa* inoculadas con la muestra 41242-36 Rd rápidamente evidenciaron síntomas de infección local en primera instancia y luego de infección sistémica, los ejemplares de *Ch. quinoa* inoculados con la muestra de raza andina 233 CV tardaron 5 días más aprox. en mostrar los síntomas característicos de la infección sistémica y de forma menos severa. Fue posible observar, en ambos casos, deformación foliar, mosaico y necrosis sistémica. Los controles negativos no mostraron síntomas hasta el final de la evaluación.

Las plántulas de *N. tabacum* inoculadas con el aislado PVS 233 y 41242-36 Rd también exhibieron síntomas de virosis pero que fueron evidentes recién a los 30 DPI y se apreciaron con claridad a los 50 DPI. En este caso, los síntomas fueron sistémicos.

Los síntomas descritos se muestran en Figuras 10-15, abarcando desde la aparición temprana de ellos en hojas locales a los 15 DPI hasta la infección sistémica a los 50 DPI. En la Figura 13, se presenta la comparación entre un ejemplar sano de *Ch. quinoa* y uno enfermo por inoculación del aislado 41242-36 Rd, ya que provocó los síntomas más severos.

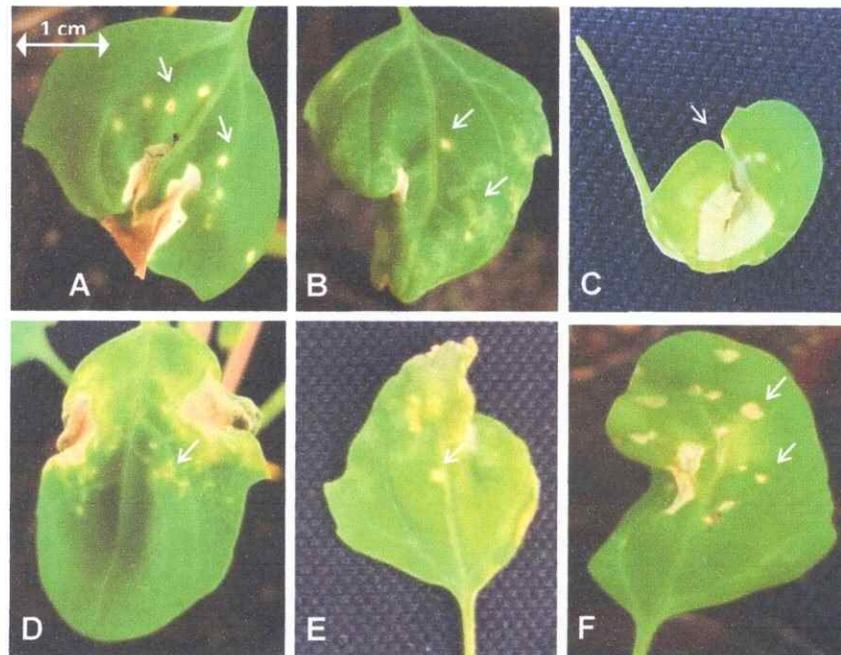


Figura 11. Síntomas locales en hojas de *Ch. quinoa* inoculadas con el aislado raza ordinaria PVS^o 41242-36 Rd (A, B, C, D y F) y aislado raza andina PVS^A 233 CV (E) 15 DPI. C corresponde al caso más severo de malformación foliar, mientras A y F corresponde a puntos necróticos. Todas las hojas muestran lesiones cloróticas locales. Los síntomas son indicados con flechas.

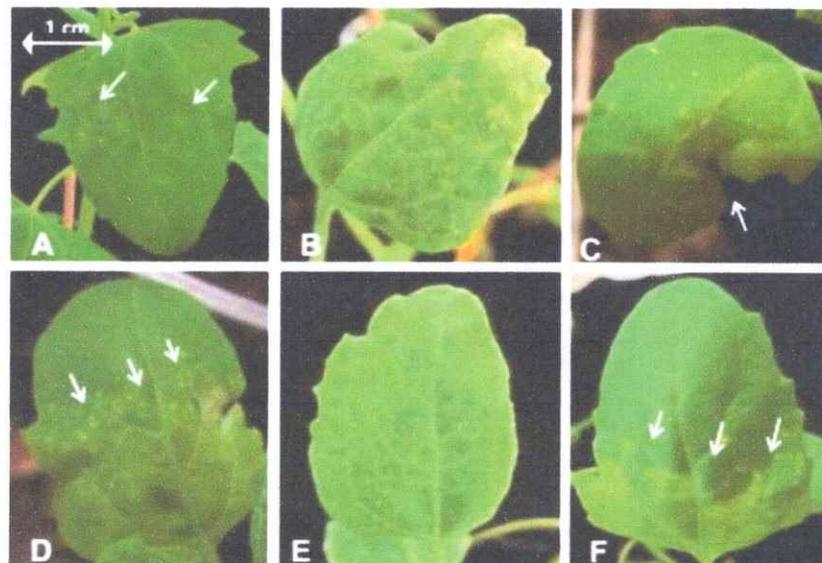


Figura 12. Síntomas en hojas sistémicas de *Ch. quinoa* inoculadas con el aislado raza andina PVS^A 233 CV (A) y raza PVS^o 41242-36 Rd (B, C, D, E, F) 20 DPI. Se aprecia mal formación foliar (C), clorosis (A) e inicio de mosaico (B, D y F). Los síntomas son indicados con flechas.

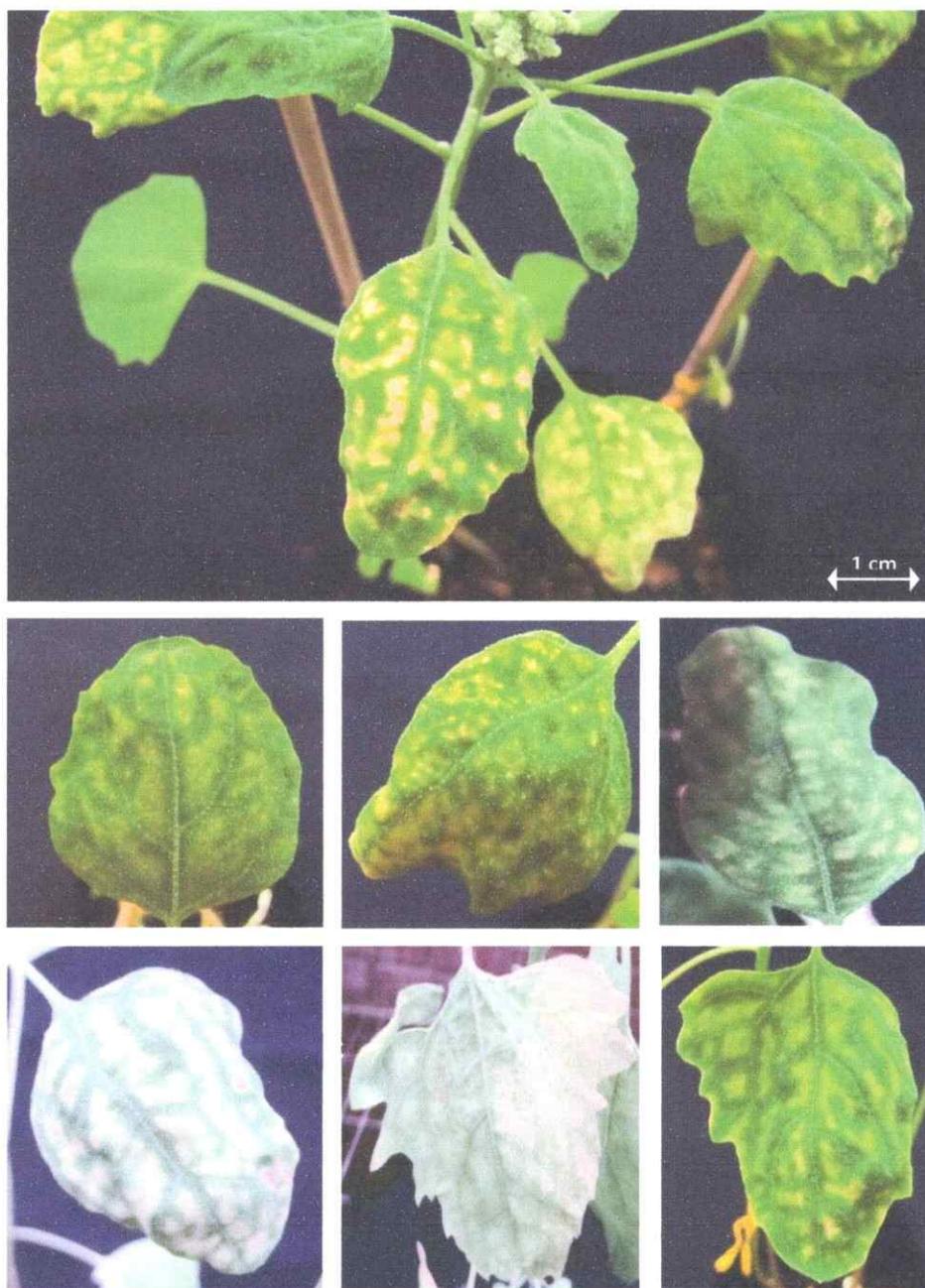


Figura 13. Síntomas sistémicos en plantas de *Ch. quinoa* inoculadas con el aislado raza ordinaria PVS° 41242-36 Rd transcurridos 50 DPI. Se aprecia mal formación y mosaico en todas las imágenes.

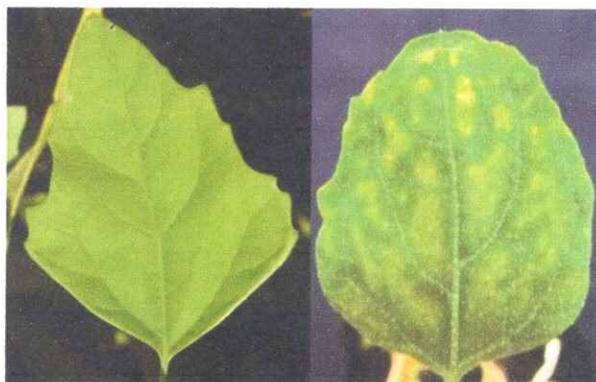


Figura 14. Comparación entre hoja sana (izquierda) y hoja infectada con PVS (derecha) de *Ch. quinoa*. En la hoja sana se aprecia una coloración homogénea, bordes estrellados típicos, mientras que en la hoja enferma, se aprecia la clorosis, formación de mosaico, depresión venosa y deformación foliar.

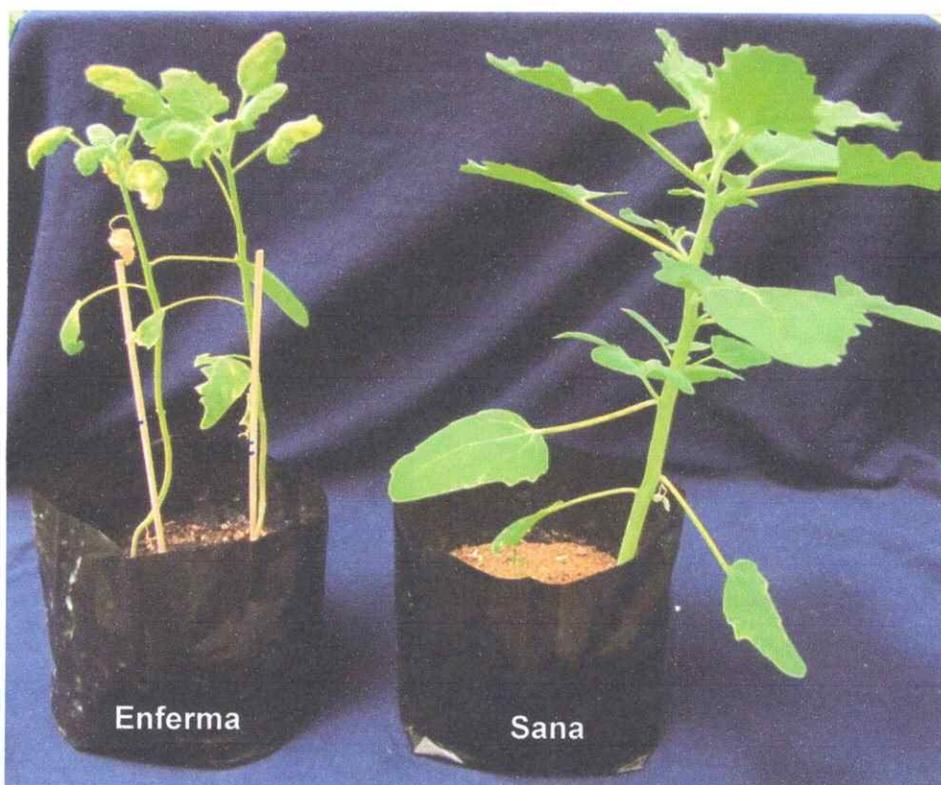


Figura 15. Comparación de síntomas de PVS entre plantas sana y planta enferma de *Ch. quinoa* transcurridos 20 DPI. La inoculación fue con el aislado raza ordinaria PVS^o 41242-36 Rd.

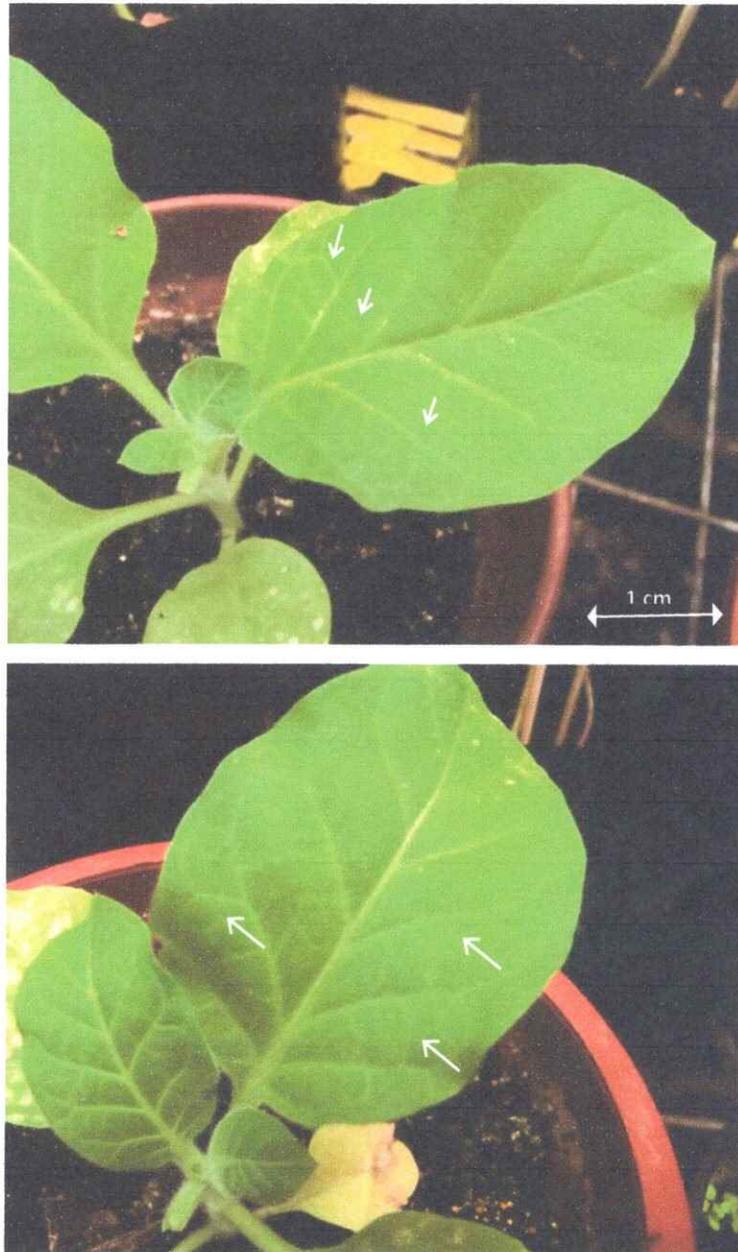


Figura 16. Síntomas sistémicos en plantas de *N. tabacum* inoculadas con aislado raza ordinaria PVS^o 41242-36 Rd transcurridos 50 DPI. Los síntomas son indicados con flechas.

7. DISCUSIÓN

7.1 Detección PVS mediante RT-PCR y análisis de secuencias.

Mediante este trabajo fue posible comprobar las ventajas que implica la detección viral mediante métodos moleculares. El total de los aislados incluidos en el análisis que fueron previamente catalogadas como PVS positivas mediante el test de ELISA, arrojaron el mismo resultado mediante RT-PCR, permitiendo validar el resultado. Sin embargo, el método molecular representa una ventaja frente al método serológico, ya que es más sensible frente a cargas virales bajas y constituye un punto de partida para una serie de análisis posteriores que permiten caracterizar adecuadamente la secuencia blanco, en este caso un virus. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas como los programas Geneious, Clustal Omega y DnaSP, determinar el agrupamiento de las muestras en las dos razas principales establecidas para este Carlavirus. Las variaciones en la secuencia de genes específicos como la CP y proteína 11K permitieron diferenciar genéticamente PVS⁰ y PVS^A. Debido a nuestra ubicación geográfica y cercanía con Los Andes, se esperaba que la raza andina predominara en el análisis de secuencias. Sin embargo, en este trabajo, sólo dos aislados resultaron ser PVS^A, mientras los 26 aislados restantes correspondieron a PVS⁰. Los dos aislados que agruparon con el resto de PVS^A fueron 233 y 3.2CH, ambos procedentes de la Isla de Chiloé, pudiéndose atribuir al aislamiento geográfico del archipiélago importancia en este hecho.

Tanto el alineamiento nucleotídico como aminoacídico resultaron en el mismo agrupamiento de razas de PVS, tanto en la CP como la proteína 11K obtenidas de GenBank. No obstante, los resultados que incluyeron aislados chileno fueron disímiles. Mientras en el árbol fenético construido con las secuencias de CP fue posible apreciar

la agrupación de dos de las muestras con la raza andina, en el mismo árbol construido con las secuencias de la proteína 11K, la agrupación de todas las muestras fue en el grupo de raza ordinaria. Este resultado indica que las razas de PVS, al menos en Chile, es aconsejable identificarlas según la secuencia nucleotídica como aminoacídica de CP, en desmedro de la proteína 11K. Lo anterior sugiere que la secuencia del gen 11K podría ser más conservada que el gen de CP, posiblemente relacionado a su función de proteína unidora de nucleótidos. Sin embargo, Salari y cols (2011) propone que tanto la secuencia completa de CP como parte de la proteína 11K (282 pb) pueden emplearse para diferenciar razas de PVS y establecer porcentajes de identidad de secuencia. Por ejemplo, se cita un rango entre un 94% y 100% entre los aislados para la proteína 11K. Basándose en los resultados obtenidos, se podría afirmar que las mayores diferencias en la secuencia que originaron el surgimiento de dos razas distintas de PVS se encuentran en la proteína de cubierta, a diferencia de los aislados europeos del trabajo de Salari. Debido a esto, para los análisis de porcentaje de identidad sólo se utilizaron las secuencias de CP. Como proyección, se sugiere considerar la existencia de aislados recombinantes, para los cuales sería necesario la secuenciación de todo el genoma viral si el objetivo es una caracterización molecular.

En cuanto a la comparación de secuencias basada en el cálculo del porcentaje de identidad, los porcentajes de identidad de secuencia a nivel nucleotídico (73,53% - 98,38% en PVS^O y 65,67% - 72,7% en PVS^A) y nivel aminoacídico (64,35% - 99,3% en PVS^O y 94,9% - 97,27% en PVS^A). Aunque en ambos casos, el porcentaje para la secuencia de nucleótidos es en promedio menor que para la secuencia de aminoácidos, los valores indican mayor diversidad dentro de la raza andina que dentro de la raza ordinaria. Cabe destacar el hecho de la gran diferencia entre el porcentaje de identidad

de la raza andina entre nucleótidos y aminoácidos, sugiriendo una posible degeneración del código genético. El trabajo realizado por investigadores colombianos (Gil, J.F. y cols, 2012) da cuenta de que PVS^A fue la más registrada en el análisis de variabilidad genética, al incluir 12 de 15 aislamientos secuenciados. Una posible proyección sería definir si en cada una de las regiones analizadas, ambas razas se presentan por igual o en distinta proporción. Este mismo estudio reportó por primera vez un aislado de raza ordinaria en los Andes suramericanos y en el que se presentan mayores valores de variación entre aislados PVS de un mismo país (76% a 99%). Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis la cara contraria al reporte colombiano, ya que en el análisis en el sur de Chile, la raza prevalente fue PVS^O y sólo se encontraron aislados PVS^A en el archipiélago de Chiloé. Un caso similar ocurrió en el trabajo de Salari y cols (2011), donde se encontró que todos los aislados iraníes analizados correspondían a PVS^O.

Para analizar la estructura genética de los grupos PVS^O y PVS^A, se estimó el índice de diversidad nucleotídica (π) del gen de CP y la proteína 11K. El mayor valor fue para la raza andina, sugiriendo esto que el grupo PVS^A presenta mayor variación genética que el grupo PVS^O. Al calcular el índice dentro de PVS^A, el gen de CP mostró tener mayor variación en su secuencia nucleotídica que el gen de la proteína 11K, hecho que se condice con los resultados de Clustal Omega. El trabajo de Lin, Y. (2012) reportó valores de π para la CP de 0,04 para PVS^O y 0,1 para PVS^A, confirmando los valores obtenidos en este análisis.



7.2 Sintomatología de PVS en plantas indicadoras

El uso de *Ch. quinoa* y *N. tabacum* mostró ser exitoso en la detección viral, en especial en este virus que ha mostrado ser asintomático en algunos casos o mostrar síntomas discrepantes entre su clasificación biológica y molecular. Los resultados fueron acordes a la descripción de síntomas en la literatura (Lambert y cols, 2012) donde el aislado 233 (PVS^A) mostró infectar de forma sistémica la planta indicadora *Ch. quinoa*. Sin embargo, el aislado 41242-36 Rd agrupado previamente con aislados de la raza ordinaria en los análisis de secuencia, produjo infección sistémica, siendo un posible ejemplo de la variante PVS^{O-CS} (Matoušek y cols, 2005). Por su parte, *N. tabacum* es un indicador útil para mostrar síntomas de infección, pero no es capaz de evidenciar distintas razas.

A su vez, las condiciones para la inoculación mostraron ser las ideales, ya que previamente se había ensayado otras, sin obtener buenos resultados. La concentración de 0,05 M del buffer de inoculación, tratamiento de oscuridad 24 hrs. previas a la inoculación y la temperatura ambiente de 27°C se establecen como condiciones óptimas para futuras inoculaciones de PVS. En la elección de la planta indicadora ideal, se debe tomar en cuenta el patógeno con el cual se trabajará y las condiciones experimentales bajo las cuales se realizará el ensayo.

Finalmente, el origen del inóculo viral mostró ser importante a la hora de realizar la transmisión mecánica del virus. La inoculación desde tejido fresco resultó ser más eficiente que desde tejido liofilizado, evidenciando síntomas en menor tiempo y con más severidad.

8. CONCLUSIONES

La hipótesis planteada resultó ser lo opuesto, ya que la raza ordinaria de PVS resultó ser la variante prevalente del virus en la zona sur del país. La mayor prevalencia de la raza PVS^O en las muestras, que se caracteriza por presentar lesiones locales, refuerzan la importancia del uso de material de siembra libre de virus, para reducir sustancialmente la incidencia de este agente viral en el cultivo de la papa en Chile.

La detección viral mediante el método molecular resulta ser una buena herramienta para ser complementada o bien reemplazar a la detección serológica, ya que de forma eficiente y exitosa es posible identificar la presencia de virus en las muestras analizadas y permite posteriores estudios de análisis de secuencia y diversidad genética. Entre ambas razas, el mayor valor de π se observó en PVS^A.

Las razas de PVS pueden ser identificadas en base a la secuencia de su proteína de cubierta, tanto de nucleótidos como de aminoácidos. Contrario al caso de la proteína 11kDa, cuyos resultados no fueron concluyentes al momento de la identificación de razas.

El uso de plantas indicadores es un buen método de detección viral de PVS, ya que los síntomas son visibles y notorios en distintos niveles a medida que transcurre el tiempo post inoculación. De hecho, en este estudio fue posible descubrir una nueva variante de PVS, PVS^{O-CS}, que agrupó con la raza ordinaria en el análisis molecular pero mostró síntomas de infección sistémica en *Ch. quinoa*, acorde a la raza andina.

Emplear tanto la detección molecular como la identificación biológica al momento de realizar prospecciones en busca de agentes virales, constituye una buena

aproximación ya que la exactitud del análisis vía RT-PCR puede ser complementada con evidencia de síntomas en plantas indicadoras.

9. BIBLIOGRAFIA

Bertheau, Y., Frechon, D., Toth, I. K., and Hyman, L. J. (1998). DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). Pages 39-59 in: Methods for the Detection and Quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on Potatoes.

Cox, B.A and R.A. Jones. Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus S* isolates and distinguishing its biologically distinct strains. (2010). Arch. Virol. 155: 1163-1169.

Dolby, C.A, Jones, R.A.C. (1987). Occurrence of the andean strain of potato virus S in imported potato material and its effects on potato cultivars. Plant Pathol 36:381-388.

Fraser, R. Biochemistry of Virus-Infected Plants. (1987). Research Studies Press.

Gil, J.F. Detección serológica y caracterización molecular de *Potato virus S* (PVS, *Carlavirus*) en cultivos de papa de Colombia. (2012). Rev. Biolo.Trop. Vol.61 (2): 565-575.

Gutiérrez, M. Avances en el conocimiento de la situación actual de las enfermedades causadas por virus en la zona sur. (2014). Informativo proyecto FIA PYT- 2011-0065. Laboratorio Regional Osorno, SAG.

Hiruki, C. Factors affecting bioassay of Potato Virus S in *Chenopodium quinoa*. (1975). Phytopathology 65: 1288-1292.

Huanca, L. W. Métodos de reproducción asexual y su aplicación. (2003). Versión Online: www.monografias.com/trabajos-pdf4/propagacion-asexual-plantas-y-su-aplicacion/propagacion-asexual-plantas-y-su-aplicacion.pdf

Jeffries, C.J. Potato FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germoplasm. (1998). No 19.

Lambert, S. J., Scott, J. B., Pethybridge, S. J., and Hay, F. S. Strain characterization of Potato virus S isolates from Tasmania, Australia. (2012). Plant Dis. 96:813-819.

Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

Lin, Yu-Hsuan. (2012). Biological and molecular properties of *Potato virus S* (PVS) and the effect of PVS on Late Blight resistant potato genotypes. Tesis doctoral. Washington State University. Department of Plant Pathology.

Matoušek, J. Complete nucleotide sequence and molecular probing of *Potato virus S* genome. (2005). Acta Virol. 49:195-205.

Rose, D.G. Some properties of an unusual isolate of potato virus S in North America. (1983). *Potato Res.* 26, 49-62.

Salari, K., Massumi, H., Heydarnejad, J., Pour, A.H., Varsani, A. Analysis of Iranian Potato virus S isolates. (2011). *Virus Genes* 43: 281-288.

Salazar, L.F. Potato viruses and their control. (1995). Potato Center, Lima, Perú.

Santos, J. Antecedentes sobre densidades de plantación y uso de tubérculos-semillas partidos en el cultivo de papa. (2003) INIA Remehue.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. (2011). *Molecular Systems Biology* 7: 539.

Wardrop, E.A. Aphid transmission of *Potato virus S*. (1989). *Am. Pot. J.* 66:449-459.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. (2012). *BMC Bioinformatics* 13: 134.

Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. (2003). *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406-3415.