

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Identificación serológica y molecular del virus del mosaico rugoso PVX en cultivos de  
*Physalis peruviana* de la Sierra centro norte del Ecuador**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo**

**LUIS FERNANDO ANDRADE BELTRÁN**

**QUITO, 2019**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis la quiero dedicar a las personas más importantes en mi vida, las cuales me han apoyado en toda circunstancia y gracias a ellos soy quien soy, a mi padre, madre y hermana

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes me han sido el pilar fundamental y gracias a ellos he podido concluir mis estudios universitarios. A mi hermana Gaby quien ha sido ejemplo y siempre me ha apoyado en todo lo que he necesitado.

A mi directora disertación la Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna por la confianza brindada, no solo en mi proyecto de tesis si no que ha sido una profesora que me ayudado en toda mi carrera, además de ser mi profesora la considero una amiga.

Agradezco a todos mis profesores de la carrera, ya que, gracias a ellos, he aprendido el amor por la microbiología, ya que, la Microbiología no es solo una carrera es un mundo maravilloso.

Al personal de AGROCALIDAD por permitirme usar sus instalaciones y equipos, quiero agradecer en especial a Alex, Jayro, Hernando y David quienes me ayudaron a solventar dudas presentes.

A mis compañeros de la carrera, en especial a Tefa, Brandon, Paúl, Moni, Marcelo, David, Kelly y Anita en quienes he encontrado una amistad y apoyo en toda la carrera.

A mis amigos del colegio Pedro, Bryant, Miguel, Alex, Esteban, Diego, Bryan, Jhower, en especial a Diego y Santiago a quienes los considero mis hermanos y han estado en los momentos más tristes y alegres de mi vida.

A Dennise, la persona que en este último tiempo ha sido un apoyo importante en mi vida.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN .....	1
2.	ABSTRACT .....	2
3.	INTRODUCCIÓN .....	3
3.1.	ANTECEDENTES .....	3
3.2.	CULTIVO DE LA UVILLA .....	4
3.3.	ENFERMEDADES DEL CULTIVO .....	4
	<i>Potato Virus X</i> .....	5
	OBJETIVOS .....	6
	OBJETIVO GENERAL .....	6
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
4.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
4.1.	EQUIPOS UTILIZADOS .....	7
4.2.	MUESTREO .....	7
4.3.	ANÁLISIS SEROLÓGICO .....	9
4.3.1.	ImmunoStrip® .....	9
4.3.2.	DAS-ELISA .....	9
4.4.	ANÁLISIS MOLECULAR .....	10
4.4.1.	EXTRACCIÓN DE ARN .....	10
4.4.2.	RETROTRANSCRIPCIÓN .....	10
4.4.3.	PCR EN TIEMPO REAL .....	11
4.4.4.	VISUALIZACIÓN EN ELECTROFORESIS Y PURIFICACIÓN DE BANDAS .....	11
4.4.5.	SECUENCIACIÓN .....	12
4.4.6.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS .....	12
4.5.	POSTULADOS DE KOCH .....	12

4.5.1.	OBTENCIÓN Y CUIDADO DE LAS PLÁNTULAS .....	13
4.5.2.	INOCULACIÓN .....	14
4.5.3.	RECUPERACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES .....	15
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	16
5.1.	ANÁLISIS SEROLÓGICO .....	17
5.2.	ANÁLISIS MOLECULAR .....	20
5.2.1.	EXTRACCIÓN DE ARN.....	20
5.2.2.	PCR EN TIEMPO REAL .....	21
5.2.3.	VISUALIZACIÓN EN ELECTROFORESIS Y PURIFICACIÓN DE BANDAS.....	24
5.2.4.	SECUENCIACIÓN .....	25
5.3.	POSTULADOS DE KOCH.....	27
6.	CONCLUSIONES.....	31
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
8.	ANEXOS.....	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Fincas orgánicas.....	7
<b>Figura 2</b> Hoja de uvilla con sintomatología vírica. ....	8
<b>Figura 3</b> Recolección de muestras.....	8
<b>Figura 4.</b> Plántulas de uvilla.....	13
<b>Figura 5.</b> Preparación de suspensión de partículas virales..	14
<b>Figura 6.</b> Laceración de hojas.....	15
<b>Figura 7</b> Inoculación de suspensión viral. ....	15
<b>Figura 8</b> Prueba DAS-ELISA.....	18
<b>Figura 9.</b> Curva de amplificación en RT-PCR. ....	22
<b>Figura 10.</b> Curva de melt en RT-PCR. ....	23
<b>Figura 11</b> Gel de electroforesis de los amplicones obtenidos en la RT-PCR.....	25
<b>Figura 12</b> Alineamiento de secuencias.....	26
<b>Figura 13.</b> Preparación del ensayo.....	27
<b>Figura 14.</b> Plántulas de uvilla.....	28
<b>Figura 15.</b> Síntomas de PVX. ....	28
<b>Figura 16</b> Curva de amplificación en RT-PCR.....	29

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Codificación, fecha y lugar de muestreo .....	16
<b>Tabla 2</b> Determinación del punto de corte y de las absorbancias de los controles positivos y negativos.....	17
<b>Tabla 3</b> Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVX.....	18
<b>Tabla 4</b> Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVY .....	19
<b>Tabla 5</b> Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVS.....	19
<b>Tabla 6</b> Concentración y calidad de ARN de las muestras reactivas para PVX.....	20
<b>Tabla 7</b> Valores obtenidos por qPCR de las muestras reactivas para PVX.....	22
<b>Tabla 8</b> Número de acceso <i>GenBank</i> y porcentaje de cobertura de las muestras positivas de PVX .....	26
<b>Tabla 9</b> Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVX.....	29
<b>Tabla 10</b> Registro de temperatura y humedad del invernadero en los ensayos de postulados de Koch.....	30

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Microfotografía del tejido vegetal infectado por PVX (Walker, 2015).....	37
<b>Anexo 2.</b> Codificación de los equipos utilizados .....	37
<b>Anexo 3.</b> Interpretación de resultados de InmunoStrip® .....	38
<b>Anexo 4.</b> Región diana (101pb) de los primers usados, región (5' 6102 – 6202 3') de la coat protein.....	39
<b>Anexo 5.</b> Secuencia consenso T024 .....	39
<b>Anexo 6.</b> Secuencia consenso C030.....	39
<b>Anexo 7.</b> Homodímeros del forward primer .....	39
<b>Anexo 8.</b> Homodímeros del reverse primer .....	41
<b>Anexo 9.</b> Heterodímeros entre reverse primer y forward primer .....	42

## 1. RESUMEN

En los últimos años la exportación de cultivos orgánicos se ha incrementado, entre ellos destaca la uvilla (*Physalis peruviana*), fruta apreciada en otros países por su sabor y su alto contenido de antioxidantes. Sin embargo, como todo cultivo es susceptible al ataque de patógenos. Las enfermedades ocasionadas por microorganismos, especialmente por virus son poco estudiadas en el país y la información es escasa. El presente estudio busca determinar la presencia del *Potato virus X* (PVX) o virus X de la papa, causante del mosaico rugoso en hojas de uvilla. Diez fincas fueron visitadas en la región sierra centro norte del país, donde se tomaron hojas que presentaban síntomas típicos de virosis, clorosis, mosaico y enrollamiento. Las hojas fueron transportadas al Laboratorio de Fitopatología de AGROCALIDAD en Tumbaco, para verificar la presencia del virus. Se realizó una detección serológica usando ImmunoStrip® y la prueba DAS-ELISA de la compañía Agdia®, las cuales fueron positivas para el virus en dos fincas. La técnica RT-qPCR, también confirmó la presencia del virus y al analizar la curva de fusión (*melt*) se identificaron dos variantes del virus. Los amplicones obtenidos fueron enviados a secuenciar y fueron identificados así también, como PVX. Finalmente, para verificar que el virus obtenido es el agente causal del mosaico rugoso en plantas de uvilla, se realizaron postulados de Koch. después de 15 días de la infección, síntomas similares aparecieron y mediante ensayos posteriores se demostró que PVX es el agente causal del mosaico rugoso en uvilla, siendo el primer registro en Ecuador.

Palabras claves: *Physalis peruviana*, PVX, mosaico rugoso, DAS-ELISA, RT-qPCR.

## 2. ABSTRACT

In recent years, the export of organic crops has increased, among them the Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) stands out, a fruit that is appreciated in other countries for its flavor and high content of antioxidants, however, this crop is susceptible to many diseases. The diseases that are produced by microorganisms are little studied in the country having a lack of information of it, the present study seeks to determine the presence of Potato virus X (PVX) who is the cause of the rough mosaic in Cape gooseberry leaves, in order to achieve this, leaves that showed symptoms of viral disease (yellowing, mosaic and rolling of leaves) were taken from 10 farms of the northern sierra which were transported to the Laboratory of Phytopathology of AGROCALIDAD, where a DAS-ELISA and ImmunoStrip® tests were carried out to verify the virus occurrence in leaves. Two farms presented the virus. The existence of the virus was confirmed by the RT-qPCR technique, in addition the analysis of the melt curve allowed to identify the two variants of the virus. The obtained amplicons were sequenced and identified as PVX. Finally, to verify that the virus is the causative agent of the rough mosaic, Koch postulates were performed. A viral particles suspension was mechanically inoculated. After 15 days of infection, PVX was shown to be the causative agent of the rough mosaic.

Keywords: *Physalis peruviana*, PVX, rough mosaic, DAS-ELISA, RT-qPCR.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. ANTECEDENTES

*Physalis peruviana* conocida comúnmente como uvilla, es una planta herbácea (Fischer, Almanza y Miranda, 2014), de origen andino, siendo Colombia, Ecuador, Perú y Australia los principales países productores (Olivares-Tenorio, Dekker, Verkerk, y van Boekel, 2016). Este cultivo es muy resistente a condiciones adversas, debido a que se desarrolla a gran altitud (entre los 1000 a 3200 metros sobre el nivel del mar) y toleran suelos ácidos (Góngora y Rojas, 2006).

Su fruta es muy apetecida debido a que, su fruto es rico en antioxidantes por lo cual, es usada en el tratamiento de enfermedades como asma, hepatitis, dermatitis, reumatismo y es utilizada también como diurético (Carrillo, Aller, Cruz, Giampieri, y Alvarez, 2015).

En los últimos años, el cultivo de *Physalis peruviana* en el Ecuador ha experimentado un gran incremento. El alto valor nutricional de los frutos y su delicado sabor agridulce (Muniz et al., 2014), son características que fomentan la producción y posterior exportación de este producto, brindando excelentes perspectivas en los mercados internacionales (Rotta de la, 2014). Según datos del Banco Central del Ecuador (2018), la exportación de uvilla ha incrementado notablemente, en el 2017 el país exportó un total de 174,46 toneladas de este fruto, lo que favoreció directamente a la economía de pequeños y medianos productores de uvilla.

Gracias a la importancia comercial adquirida por esta fruta, un correcto manejo del cultivo optimizará la exportación de dicho producto. Evitar enfermedades mejorará el rendimiento de su producción y para ello, la identificación de los agentes causales es de suma importancia. La literatura describe que este cultivo es susceptible a enfermedades ocasionados por hongos, bacterias, virus y nematodos (Góngora y Rojas, 2006; Zapata, Saldarriaga, Londoño, y Díaz, 2002).

En las variedades comerciales de uvilla cultivadas en Colombia, se han identificado los virus PVX (*potato virus X*), PVY (*potato virus Y*), tomovirus y topovirus (Gutiérrez, Alzate, y Montoya, 2015), pero en Ecuador no se evidencian reportes de la presencia de éstos o de otros virus. Los productores del país confunden este patógeno con deficiencias de nutrientes y desestiman su importancia.

### 3.2. CULTIVO DE LA UVILLA

*Physalis peruviana* es una planta herbácea conocida como uvilla, aguaymanto, uchuva entre otros nombres comunes en español, según el país donde se cultiva (Arias Vargas, Gómez Mejía, Suarez Holguín, y Rendón Sierra, 2015;) y además, *goldenberry* en inglés. Existen más de 80 variedades muy ricas en antioxidantes, por lo cual es muy apetecida en el mercado europeo y asiático (Cedeño, 2004; Nawirska-Olszańska, Stępień, Biesiada, Kolniak-Ostek, y Oziembłowski, 2017; Pássaro y Diego, 2014; Puente, Pinto-Muñoz, Castro, y Cortés, 2011). La uvilla es una angiosperma que pertenece a la familia de las *Solanaceae*. El género *Physalis* contiene alrededor de 90 especies siendo uno de los más abundantes dentro de esta familia, solo sobrepasado por los géneros *Solanum* y *Lycianthes* (Pássaro y Diego, 2014). El cultivo de uvilla se adapta a varios ambientes, crece a una humedad relativa entre 70 a 80% y en temperaturas desde los 13°C hasta los 29°C. A temperaturas altas la producción mejora, mientras que a temperaturas bajas el tamaño de la planta supera los 150 cm y su producción disminuye. Soporta tierras con un pH ácido 5.5 y 7.0, y una pluviosidad entre 1000 y 2000 mm (Carrillo-Perdomo et al., 2015; Kopp, Kondrák, y Bánfalvi, 2015; Zapata et al., 2002).

### 3.3. ENFERMEDADES DEL CULTIVO

La uvilla es una planta susceptible a enfermedades tanto abióticas como bióticas, entre las afectaciones abióticas tenemos daños causados por las heladas granizo y pesticidas, siendo de mayor importancia las enfermedades bióticas. Entre las principales enfermedades tenemos las causadas por oomycetes: *Damping-off* por *Phytophthora sp.*, por hongos: mancha gris por *Cercospora physalidis*, muerte descendente por *Phoma sp.*, moho blanco por *Sclerotinia sclerotiorum*, mancha negra por *Alternaria sp.*, moho gris por *Botrytis sp.* y el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* (Benavides y Mora, 2005; Carrillo-Perdomo et al., 2015; Garcia, 2015; Zapata et al., 2002). Entre las enfermedades producidas por bacterias tenemos la mancha grasienta (*Xanthomonas sp.*) y la marchitez bacterial (*Ralstonia solanacearum*). También otros organismos ocasionan enfermedades como son los nematodos (*Meloidogyne sp.* que causa nódulos en la raíz) y fitoplasmas que ocasionan machorreo de la uvilla (Arellano, 2018; Benavides y Mora, 2005; Bosquez, 2018; Carrillo et al., 2015; García, Olarte, Gutiérrez, y Marín, 2016; Zapata et al., 2002).

Cabe recalcar que las enfermedades causadas por virus en uvilla no han sido estudiadas en el país. Entre los que atacan a la uvilla tenemos *Potato Virus X* (PVX), *Potato Virus Y* (PVY), *Potato Virus S* (PVS), *Tomato Mosaic Virus* (ToMV), *Tobacco Mosaic Virus* TMV entre otros, siendo de mayor importancia PVY y PVX (Scholthof et al., 2011).

### ***Potato Virus X***

El Potato Virus X (PVX) es un virus perteneciente a la familia de los *Flexiviridae* del género *Potextivirus*, perteneciente al grupo IV de la clasificación de Baltimore (Virus monocatenario positivo de ARN) (Walker, 2015).

PVX tiene forma de bastón con dimensiones de 470 a 580 nanómetros de longitud por 11 a 13 nanómetros de diámetro, su genoma es de aproximadamente (5.8 – 7.0kb), su ARN (Ácido ribonucleico) codifica para 5 proteínas que incluyen la ARN polimerasa y la *coat protein* (CP) segmento usado para su identificación (Agrios, 2005).

PVX tiene como hospedero las plantas de la familia de las solanáceas (tomate, tabaco, uvilla, papa entre otras), se transmite sin necesidad de vectores causando un crecimiento tardío de la planta, mosaico leve, enrollamiento de las hojas y muerte de la planta («Potato virus X», s. f.; Vásquez, Montero-Astúa, y Rivera, 2004).

Las variantes del virus son dadas por modificaciones en la región CP, debido a que la producción de estas proteínas permite el ingreso hacia la planta, la planta crea mecanismos que rechazan la entrada del virus. El virus para poder entrar y replicarse modifica la producción de algún aminoácido alterando la región CP (Lico, Benvenuto, y Baschieri, 2015). La variación de la región CP es responsable de causar diferente sintomatología a la planta (Agrios, 2005).

En su estudio sobre las enfermedades de *Physalis peruviana*, de la Rotta (2014), menciona que las plantas afectadas por el virus del mosaico rugoso PVX, presentan una serie de síntomas que van desde deformaciones en las láminas foliares hasta la necrosis sistémica de gran parte del tejido vegetal.

La identificación de un virus como agente causal del mosaico rugoso, contribuirá a mejorar el registro de enfermedades de la uvilla, demostrando la presencia de enfermedades

virales en este cultivo en el Ecuador y ayudando, por tanto, a optimizar el manejo integral de plagas y enfermedades con miras a obtener frutos sanos y mejores rendimientos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia del virus causante del mosaico rugoso de la papa (PVX) en cultivos de *Physalis peruviana*, provenientes de tres provincias de la sierra ecuatoriana: (Imbabura, Cotopaxi y Tungurahua) mediante el uso de herramientas serológicas y moleculares.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Recolectar en diferentes localidades de las provincias de Imbabura, Cotopaxi y Tungurahua, hojas de *Physalis peruviana* que manifiesten sintomatología similar a la causada por el virus PVX.

Determinar mediante herramientas inmunológicas la presencia del virus PVX en hojas de uvilla.

Confirmar la presencia de PVX en las muestras analizadas mediante las técnicas de PCR en tiempo real y secuenciación del ARN.

Comprobar mediante postulados de Koch que PVX es el agente causal del mosaico rugoso en plantas de *Physalis peruviana* en varias localidades del Ecuador.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. EQUIPOS UTILIZADOS

Todos los análisis fueron realizados en los laboratorios de Fitopatología y Biología Molecular de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD), los equipos que fueron utilizados se detallan en el Anexo 2.

### 4.2. MUESTREO

Se visitaron nueve fincas productoras de uvilla orgánica (Figura 1), en las provincias de Imbabura, Tungurahua y Cotopaxi, el muestreo consistió en recolectar hojas que presentaron sintomatología similar a infección vírica como se muestra en la Figura 2 Hoja de uvilla con sintomatología vírica. Hoja con amarillamiento o clorosis (clorosis, mosaico y enrollamiento de hojas) descritos por Zapata, Saldarriaga, Londoño, y Díaz, 2002.

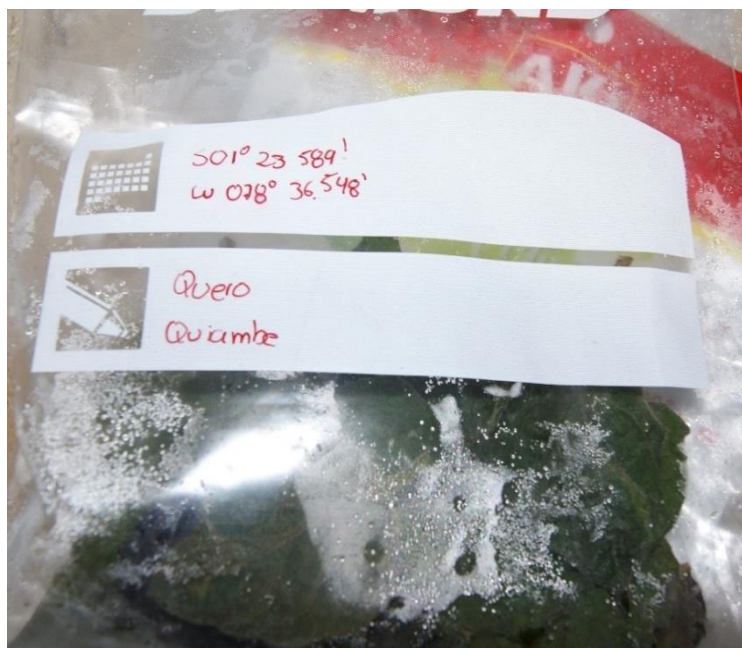


**Figura 1 Fincas orgánicas.** Fincas orgánicas productoras de uvilla ubicadas en las provincias de Cotopaxi e Imbabura.



**Figura 2 Hoja de uvilla con sintomatología vírica.** Hoja con amarillamiento o clorosis

En cada una de las fincas se recolectaron 10 hojas de manera aséptica, las cuales fueron envueltas en papel absorbente, almacenadas en bolsas plásticas herméticas y codificadas (Figura 3), considerando cada finca como una muestra. Las muestras fueron transportadas en cadena de frío al laboratorio de Fitopatología de AGROCALIDAD (Tumbaco, Pichincha) y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Fleury y Walker, 2014).



**Figura 3 Recolección de muestras.** Bolsas plásticas etiquetadas utilizadas en el muestreo

### 4.3. ANÁLISIS SEROLÓGICO

#### 4.3.1. InmunoStrip®

Para una detección rápida del virus se utilizó un método inmunológico, utilizando el kit InmunoStrip® para *Potato virus x*, el cual consiste en una tira fijada con anticuerpos policlonales, el cual mediante la unión antígeno anticuerpo determina la presencia del virus (Agdia, 2016).

Las muestras almacenadas fueron evaluadas mediante esta prueba inmunológica siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Agdia, 2016).

#### 4.3.2. DAS-ELISA

Para confirmar los resultados obtenidos de las InmunoStrip® se realizó una prueba de ELISA, donde se tomaron pequeños pedazos de las 10 hojas recolectadas por finca hasta obtener un peso de 10 gramos posterior se evaluó la presencia del virus PVX usando el kit diagnóstico DAS ELISA Agdia® (Double antibody sandwich) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Agdia, 2015b), también se evaluó la presencia de otros dos virus (PVY y PVS) usando la misma técnica (Agdia, 2015a, 2015b).

La técnica consiste en fijar un anticuerpo policlonal a una placa de poliestireno, después se coloca la muestra procesada (diez gramos del tejido infectado macerado con 20ml del buffer de extracción Agdia®), después del tiempo de incubación, el anticuerpo fijado a la placa interactúa con el antígeno presente en la muestra, posteriormente, se coloca el anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina, la cual se une al antígeno y finalmente se coloca un sustrato (albumina de suero bovino) dando una reacción de color si la muestra es positiva (García et al., 2016; Martinelli et al., 2015; Shcherbakova, 2007).

Los resultados fueron evaluados por la presencia de color (amarillo) y analizados en un lector de placas de ELISA (BIOTEK ELx800) a una longitud de onda de 405nm según la compañía serológica Bioreba (Suiza). En cada corrida se usaron controles positivos y negativos para validar cada prueba, además de determinar el punto de corte usando la fórmula  $Cut\ off = 2 * \bar{X}CN$  (Cut off = punto de corte,  $\bar{X}$  = media aritmética, CN controles negativos), considerando como muestras reactivas las muestras con valores de absorbancia mayores al punto de corte.

## 4.4. ANÁLISIS MOLECULAR

### 4.4.1. EXTRACCIÓN DE ARN

De las muestras positivas al inmunoensayo se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) total mediante el kit *GeneJET Plant RNA Purification*, siguiendo el protocolo del fabricante (Thermo Fisher Scientific® Inc., 2014) modificando la elución (se realizó una doble elución con 25µL cada una), el ARN total fue eludido en 50 µL de agua libre de ARNasas y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, para finalmente centrifugarlo a 18000rpm por 1 minuto en un nuevo tubo libre de ARNasas. Una segunda elución fue realizada a un volumen total de 50 µL y el ARN obtenido fue almacenado a -80°C (García et al., 2016).

El ARN obtenido fue medido en espectrofotometría (NanoDrop 8000), a una longitud de onda de 260nm (Simbolo et al., 2013), lo cual proporcionó la concentración de ARN en ng/µL.

Además de evaluar la concentración, el NanoDrop permite medir la pureza del ARN (presencia de otros compuestos). La relación 260/280 indica la presencia de proteínas cuando el valor de la relación es inferior a 1,7; si el valor se encuentra dentro del rango 1,7-2,0 el ARN es de óptima calidad (Faria, Magalhães, Nunes, y Oliveira, 2013; Sambrook y Green, 2012; Simbolo et al., 2013). Otra relación para tomarse en cuenta es la relación 260/230, la cual indica la presencia carbohidratos o compuestos fenólicos cuando el valor de la relación es inferior a 2,0; si el valor se encuentra dentro del rango 2,0-2,2 el ARN obtenido es de óptima calidad (Simbolo et al., 2013).

### 4.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción se realizó en un volumen total de 20µL, usando el *primer reverse* desarrollado por Massumi y colaboradores (2014). PVX\_101-2 RP: (5' GCT TCA GAC GGT GGC CG 3') siguiendo las condiciones descritas en el protocolo de uso de la enzima *Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific Inc., 2016) con pequeñas modificaciones (se realizó una incubación inicial del ARN a 65°C por cinco minutos ). La retrotranscripción se realizó en dos pasos, en la primera reacción se utilizó 7.5µL de agua tratada con DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*), 5µL de ARN (0.1pg –

5µg) y 1µL del *primer reverse* (100pmol) y se incubó a 65°C por 5 minutos en un termociclador (T100 BIO-RAD). Para a segunda reacción se colocó 1µL de dNTPs (Deoxinucleósido trifosfato) (0.5mM), 4µL de RT Buffer (1X), 0.5µL de inhibidor de ribonucleasas (20U) y 1µL de *Maxima Reverse Transcriptase* (200U). El termociclador se programó con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 50°C por 30 minutos, 1 ciclo de 85°C por 5 minutos y finalmente un ciclo de 4°C. Los productos obtenidos fueron almacenados a -80°C (ultracongelador THERMO) para ser utilizados en la amplificación a tiempo real.

#### 4.4.3. PCR EN TIEMPO REAL

La amplificación en tiempo real utilizó un volumen total de 25µL, con los cebadores descritos por Massumi y colaboradores (2014). El PVX\_101-2\_FP: (5´AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC 3´) y el PVX\_101-2 RP: (5´ GCT TCA GAC GGT GGC CG 3´), los cuales amplifican un fragmento de 101pb correspondientes a la región de la cápside ubicada en las posiciones 6110 y 6211 (Agindotan, Shiel, y Berger, 2007). Para la reacción se utilizó 10µL de agua tratada con DEPC, 12.5µL de mezcla madre [Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)], 0.75µL del *forward primer* (0.3µM), 0.75µL del *reverse primer* (0.3µM) y 1µL de ADNc (ADN complementario) (50-100ng). La amplificación se realizó en un termociclador *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* con las condiciones descritas en García Ruíz y colaboradores (2016): denaturación inicial 94 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos de denaturación a 94 °C por 60s, seguido por un tiempo de alineamiento apropiado por 30s, y una extensión 70 °C por 60s, y una elongación final por 10 min a 72 °C. En el equipo se programó una curva de *melt* con una temperatura inicial de 50°C con incrementos de 2°C cada 10 segundos hasta 99°C (BIO-RAD, 2012).

Los amplicones obtenidos fueron almacenados a -80°C (ultracongelador THERMO) y fueron enviados a secuenciar.

#### 4.4.4. VISUALIZACIÓN EN ELECTROFORESIS Y PURIFICACIÓN DE BANDAS

La electroforesis se realizó usando geles al 1.5% de agarosa (*UltraPure™ Agarose*) (Invitrogen, 2008), como agente intercalante se utilizó *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain*

para poder visualizar las bandas (Lonza, 2014). Se utilizó 5µL del marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, 2013) y en cada uno de los pocillos se colocaron 10µL de los amplicones obtenidos para luego ser purificados usando el kit *QIAquick Gel Extraction*® siguiendo las especificaciones del fabricante (QIAGEN, 2017). El tiempo de corrida fue de 50 minutos a 90 voltios en una fuente de poder (PowerPac™ BIO-RAD), los productos fueron visualizados en un transiluminador UV.

#### **4.4.5. SECUENCIACIÓN**

Los productos de PCR purificados se enviaron a MacroGen® (Seúl, Corea del Sur), para secuenciarlos utilizando la metodología Sanger, con los mismos *primers* PVX\_101-2\_FP y PVX\_101-2 RP. Esta empresa utiliza equipos secuenciadores por electroforesis capilar ABI 3730xl (MacroGen, 2018).

#### **4.4.6. ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa gratuito MEGA® versión 7.0.26. La herramienta *ClustalW* se utilizó para limpiar y alinear las secuencias *forward* y *reverse*, así como también, para obtener las secuencias consenso (Kumar, Stecher, y Tamura, 2016). Las secuencias consenso fueron comparadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Valuev, Afonnikov, Ponomarenko, Milanese, y Kolchanov, 2002). Las secuencias usadas fueron aquellas que presentaban un porcentaje de cobertura mayor o igual al 98%, un valor E igual a 0 y un porcentaje de identidad mayor o igual al 98% debido a que los altos valores de similitud indican la correspondencia con las secuencias víricas identificadas en el presente estudio (Altschul, Gish, Miller y Lipman, 2011).

#### **4.5. POSTULADOS DE KOCH**

Los postulados de Koch son usados para determinar el agente causal de una enfermedad mediante la experimentación y son cuatro postulados (Bosquez, 2018; Volcy, 2008). En este estudio, fueron usados para determinar la identidad del agente causal del

mosaico rugoso de la hoja de uvilla mediante el siguiente proceso (Science y Plants for Schools, 2005; Salazar, 1995):

- A. El agente causal de la enfermedad debe aislarse de organismos enfermos y jamás de especímenes sanos.
- B. Cuando un organismo esté enfermo el agente patógeno debe aislarse en cultivo puro.
- C. Si el patógeno se inocula a otro organismo, este debe manifestar la misma enfermedad.
- D. Al aislar el agente patógeno del organismo inoculado, este debe ser el mismo que se inóculo.

#### 4.5.1. OBTENCIÓN Y CUIDADO DE LAS PLÁNTULAS

Las plántulas fueron obtenidas en la empresa PILONES LA VICTORIA S.A. (Figura 8). Los pilones fueron sembrados en macetas plásticas con un sustrato de tierra negra, cascarilla de arroz y piedra pómez previamente esterilizada. El ensayo se llevó a cabo en los invernaderos de AGROCALIDAD, Tumbaco.



**Figura 4. Plántulas de uvilla.** Plantas sanas obtenidas en pilones de 15 días de crecimiento.

En cada una de las macetas se colocó el sustrato hasta cubrir la tercera parte de la maceta y se ubicó un pilón en el centro de esta. El primer riego las plantas fueron regadas con agua adicionada úrea para evitar el estrés producido por el trasplante (J. Guevara, comunicación personal, 07 noviembre 2018), a partir de la segunda semana las plantas fueron regadas con agua potable dos veces por semana.

#### 4.5.2. INOCULACIÓN

Después de 15 días del trasplante, las plantas que presentaban por lo menos cinco hojas verdaderas fueron inoculadas. El inóculo fue obtenido de la maceración de las hojas congeladas positivas para PVX, las cuales fueron maceradas con agua destilada estéril para obtener la suspensión del virus (Figura 5), (Ramírez, Vásquez, Montoya, y Jaimes, 2015). Con la ayuda de una bola de algodón estéril, se espolvoreó tierra de diatomeas en 3 hojas verdaderas (Vásquez, Montero-Astúa, y Rivera, 2004) para causar pequeñas lesiones en el haz de la hoja (Figura 6), y con otro algodón estéril empapado en la solución inóculo con virus se frotó sobre las láminas de las hojas lesionadas para introducir las partículas virales (Figura 7), (Chapingo, Ochoa-Martínez, y Tlapal-Bolaños, 2008). Las plantas fueron regadas 2 veces por semana con agua potable y fueron expuestas a fotoperiodos de 12 horas, además, se registró la temperatura y humedad del laboratorio (Tabla 10) para permitir las condiciones ambientales para que se produzca la infección.



**Figura 5. Preparación de suspensión de partículas virales.** Maceración de hojas positivas para el virus con agua estéril para obtención de inóculo infeccioso.



**Figura 6. Laceración de hojas.** Aplicación de tierra de diatomeas para causar micro heridas y permitir la entrada de las partículas virales.



**Figura 7 Inoculación de suspensión viral.** Aplicación con algodón de partículas virales obtenidas de muestras positivas con PVX

#### **4.5.3. RECUPERACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES**

Transcurridos 15 días de la inoculación, se observaron las plantas infectadas, se registraron los síntomas presentados y se cortaron las hojas sintomáticas para realizar un nuevo análisis serológico y molecular y así, determinar que el agente causal es el mismo que fue inoculado.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se muestrearon 10 fincas productoras de uvilla orgánica en las provincias de Imbabura, Tungurahua y Cotopaxi (Tabla 1), obteniendo un total de diez muestras, tres provenientes de Tungurahua, cuatro provenientes de Imbabura y tres provenientes de Cotopaxi.

**Tabla 1.** Codificación, fecha y lugar de muestreo

<b>Fecha de muestreo</b>	<b>Lugar</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Código</b>
28/04/2018	Mocha, Tungurahua	S 01°25'16.4" E 078°38'39.5"	T023
28/04/2018	Quero, Tungurahua	S 01°23'35.3" E 078°36'32.9"	T024
28/04/2018	Quero, Tungurahua	S 01°23'52.3" E 078°36'22.7"	T025
02/06/2018	San Pablo, Imbabura	N 00°12'03.6" E 078°11'13.0"	Imb026
02/06/2018	San Pablo, Imbabura	N 00°12'16.4" E 078°11'24.2"	Imb027
02/06/2018	Cotacachi, Imbabura	N 00°17'33.2" E 078°21'08.4"	Imb028
02/06/2018	Urcusiqui, Imbabura	N 00°17'27.1" E 078°20'58.4"	Imb029
23/10/2018	Chinintahua, Cotopaxi	S 1°04'40.7" E 78°32'40.9"	C030
23/10/2018	Saquisilí, Cotopaxi	S 0°50'19.3" E 78°38'51.6"	C031
23/10/2018	Saquisilí, Cotopaxi	S 0°50'19.3" E 78°38'51.6"	C032

## 5.1. ANÁLISIS SEROLÓGICO

Las muestras T024 y C030 resultaron reactivas para las InmunoStrip® (Anexo 3), estas muestras también fueron positivas al ensayo DAS-ELISA. Las InmunoStrip® son métodos rápidos básicos para la investigación en campo, sin embargo, estos resultados deben confirmarse en laboratorio utilizando DAS-ELISA (Vázquez, Rito, Martínez, y Hosseini, 2018).

Para las pruebas DAS-ELISA realizadas, los controles positivos y negativos validaron cada una de las corridas. Las absorbancias de los controles negativos determinaron el punto de corte, en el caso de PVX fue de 0.359, en PVY fue 0.291 y en PVS 0.322 como se muestra en la Tabla 2. Las muestras con absorbancias mayores a las del punto de corte se consideran muestras positivas.

**Tabla 2** Determinación del punto de corte y de las absorbancias de los controles positivos y negativos

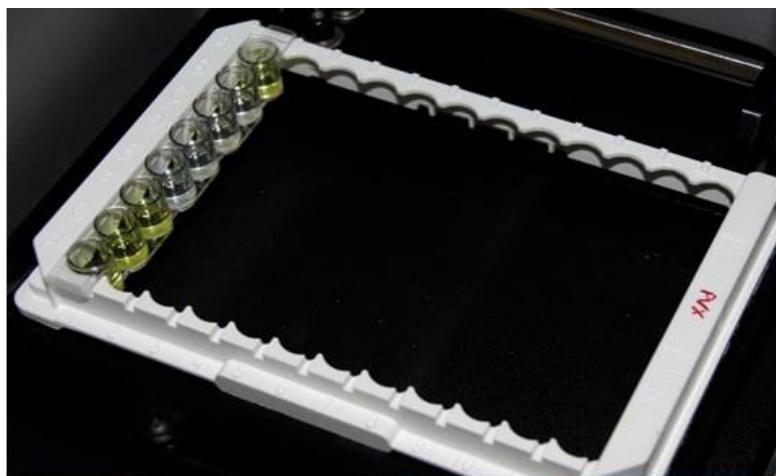
	<b>PVX</b>	<b>PVY</b>	<b>PVS</b>
<b>CP 1</b>	4.010	2.921	1.002
<b>CP 2</b>	3.687	2.200	1.081
<b>CP 3</b>	3.828	3.111	1.060
<b>Promedio CP</b>	<b>3.842</b>	<b>2.534</b>	<b>1.048</b>
<b>CN 1</b>	0.162	0.177	0.133
<b>CN 2</b>	0.168	0.150	0.162
<b>CN 3</b>	0.209	0.110	0.188
<b>Promedio CN</b>	<b>0.180</b>	<b>0.146</b>	<b>0.483</b>
<b>*Cut off</b>	<b>0.359</b>	<b>0.291</b>	<b>0.322</b>

\*  $Cut\ off = 2 * \bar{X}_{CN}$

Las muestras T24 y C30 resultaron muestras reactivas para PVX, lo cual se evidenció cualitativamente mediante la presencia de color (Figura 8), de transparente a amarillo y mediante la espectrofotometría, dando valores entre 1.128 y 3.863 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 405nm (Tabla 3).

**Tabla 3** Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVX.

Muestra (n=10)	Absorbancia a 405nm	Cut off (Cut off = $2 * \bar{X}_{CN}$ )	Resultado
T023	0.224	0.359	No Reactivo
T024	3.863	0.359	Reactivo
T025	0.219	0.359	No Reactivo
Imb026	0.123	0.359	No Reactivo
Imb027	0.128	0.359	No Reactivo
Imb028	0.120	0.359	No Reactivo
Imb029	0.138	0.359	No Reactivo
C030	1.128	0.359	Reactivo
C031	0.165	0.359	No Reactivo
C032	0.196	0.359	No Reactivo



**Figura 8 Prueba DAS-ELISA.** Se muestran placas realizadas para identificar las partículas virales de PVX, PVS y PVY. El color amarillo indica un resultado positivo, mientras que los pocillos de color transparente indican un resultado negativo

Debido a la disponibilidad de reactivos en AGROCALIDAD, se analizó serológicamente (DAS-ELISA) todas las muestras para otros dos virus PVY y PVS. No se continuó con otros ensayos para verificar que estos virus causan sintomatologías similares, debido a factores económicos y temporales.

Aunque se logró identificar PVX como agente causal en alguna de las muestras, no se debe restar importancia a la presencia de los otros dos virus encontrados PVY y PVS (Tabla 4 y

**Tabla 5**) ya que, estos ocasionan síntomas similares como lo menciona Kopp y colaboradores (2015). Entonces, se sugiere analizar los dos virus encontrados, mediante técnicas moleculares, completando con postulados de Koch.

**Tabla 4** Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVY

Muestra (n=10)	Absorbancia a 405nm	Cut off (Cut off = 2 * $\bar{X}$ CN)	Resultado
T023	0.186	0.291	No Reactivo
T024	0.157	0.291	No Reactivo
T025	0.171	0.291	No Reactivo
Imb026	0.119	0.291	No Reactivo
Imb027	1.638	0.291	Reactivo
Imb029	0.131	0.291	No Reactivo
C030	0.140	0.291	No Reactivo
C031	0.130	0.291	No Reactivo
C032	0.120	0.291	No Reactivo

**Tabla 5** Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVS

Muestra (n=10)	Absorbancia a 405nm	Cut off (Cut off = 2 * $\bar{X}$ CN)	Resultado
T023	0.144	0.322	No Reactivo
T024	0.117	0.322	No Reactivo

T025	0.110	0.322	No Reactivo
------	-------	-------	-------------

**Tabla 5 (continuación)** Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVS

Muestra (n=10)	Absorbancia a 405nm	Cut off ( $Cut\ off = 2 * \bar{X}CN$ )	Resultado
Imb026	0.190	0.322	No Reactivo
Imb027	0.195	0.322	No Reactivo
Imb028	0.174	0.322	No Reactivo
Imb029	1.348	0.322	Reactivo
C030	0.131	0.322	No Reactivo
C031	0.133	0.322	No Reactivo
C032	0.140	0.322	No Reactivo

## 5.2. ANÁLISIS MOLECULAR

### 5.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN

De las muestras reactivas para PVX (T024 y C030) se extrajo el ARN total dando concentraciones de 7.039 ng/ $\mu$ L para la muestra T024 y 255.3 ng/ $\mu$ L para la muestra C030 (

#### Tabla 6).

La muestra T024 produjo una concentración baja, esto pudo ser consecuencia del tiempo de almacenamiento de la misma, el cual fue seis meses de diferencia con respecto a la muestra C030. Además, la presencia de virus en las hojas colectadas puede variar de acuerdo al ciclo de vida del patógeno en el cual fue recolectado (Agrios, 2005).

La calidad del ARN extraído no fue buena, ya que, a una relación A260/A280 se obtuvieron valores de 1.51 para la muestra T024 y 2.10 para la muestra C030, y a una relación 260/230 se obtuvieron valores de -3.22 para T024 y -3.53 para C030 (

**Tabla 6).**

**Tabla 6** Concentración y calidad de ARN de las muestras reactivas para PVX

<b>Muestra (n=2)</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
T024	7.039	1.51	-3.22
C030	255.3	2.10	-3.53

La extracción de ARN es un paso crucial en la RT-PCR. El ARN obtenido en este estudio fue de baja concentración y calidad como se observa en la

**Tabla 6.** Esto puede deberse a que, existen otros componentes en la hoja como son los fenoles, la celulosa y la lignina (Fischer et al., 2011). Oliveira et al. (2012) menciona que, estos componentes intervienen en la extracción del material genético. Valores diferentes a 0.30 en una absorbancia a 230nm (Gallagher 2008), por lo general refleja una contaminación por fenoles. Aunque, las concentraciones fueron bajas no hubo ningún inconveniente al realizar los pasos siguientes.

### 5.2.2. PCR EN TIEMPO REAL

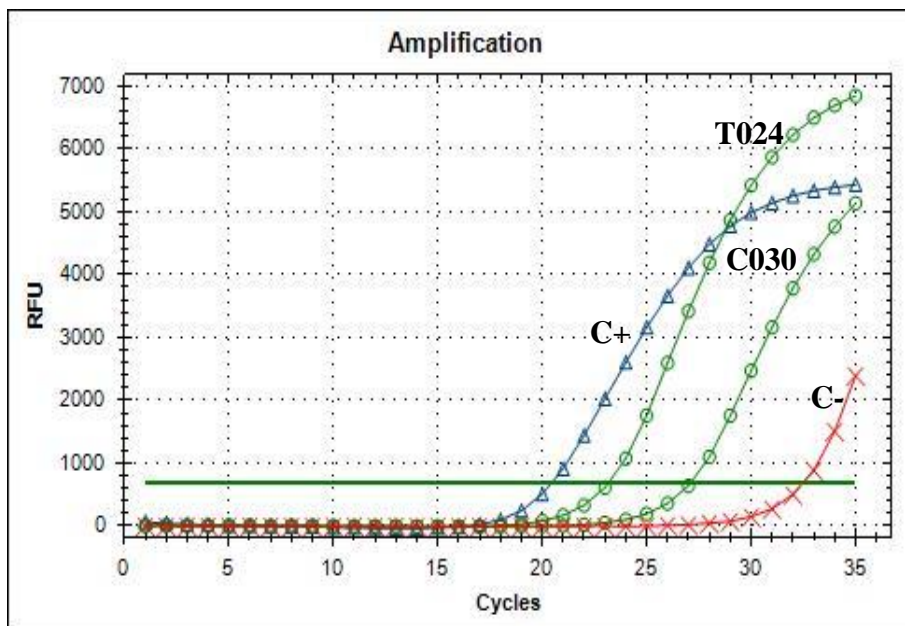
La PCR en tiempo real se llevó a cabo para cada una de las muestras, se consideraron positivas aquellas que amplificaron antes de los 35 ciclos, es decir un valor de Cq (*quantitation cycle*) menor a 35. Las muestras fueron positivas, ya que, la muestra T024 obtuvo un Cq de 23.22 y C030 un Cq de 33.12 (Tabla 7). Un Cq bajo indica mayor cantidad de ADN diana, entonces, la muestra T024 tiene una mayor cantidad de ADN que la muestra C030 (Figura 9), esto además se evidencia en la intensidad de la banda de la electroforesis (Figura 11).

**Tabla 7** Valores obtenidos por qPCR de las muestras reactivas para PVX

Muestra (n=4)	Lugar	Valor de Cq*	Valor de Tm (°C)**
C+	-	17.75	81.50
C-	-	34.5	-
T024	Quero, Tungurahua	23.22	81
C030	Chinintahua, Cotopaxi	33.12	80

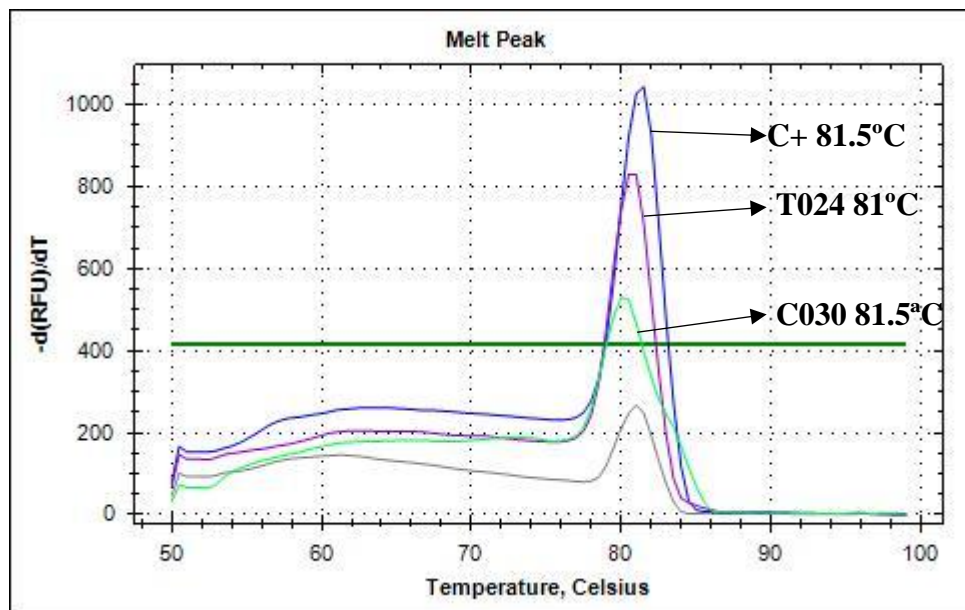
\*Cq corresponde al ciclo de cuantificación, el Cq es medido hasta que ciclo de la PCR se obtienen unidades de fluorescencia, el Cq es inversamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado.

\*\*Tm indica la temperatura media de fusión, la temperatura donde el 50% de la cadena de ADN se encuentra desnaturalizada.



**Figura 9. Curva de amplificación en RT-PCR.** Se muestra la amplificación de las muestras en tiempo real, en el eje X se encuentra el ciclo en que el producto empieza amplificarse y en el eje Y las unidades relativas de fluorescencia (RFU) emitidas por el *SYBR Green* al unirse en el surco menor del amplicón. La línea azul con triángulos corresponde al control positivo (C+), la línea verde con círculos corresponde a las muestras T024 y C030, y la línea roja con cruces corresponde al control negativo (C-)

El análisis de la curva de *melt* permitió identificar dos valores diferentes en las muestras, para T024 de 81°C y para C030 de 80°C, lo cual permite suponer que estos dos virus son variantes, esto fue confirmado con la secuenciación. Además, se encontró que los *primers* emiten un ruido de fondo amplificando entre ellos mismos (Figura 10)



**Figura 10. Curva de *melt* en RT-PCR.** Presenta los picos de disociación de amplificación, la cual permite identificar los diferentes productos amplificados, se observan 4 picos: de color azul, el control positivo, de color morado, la muestra T024 y de color celeste, la muestra C030, la última curva es dímero de *primer*.

Es importante mencionar que solo se encontró la presencia del virus en dos de las 10 fincas muestreadas, encontrándose dos variantes distintas, evidenciadas por la curva de *melt* (Figura 10), y estas fueron confirmadas en la secuenciación. Esta curva permite diferenciar este tipo de variantes gracias a que la temperatura de fusión o temperatura *melt* ( $T_m$ ) es afectada por la composición de las pares de bases que conforman el ADN, debido a que, a una mayor cantidad de Citocina y Guanina se necesita más temperatura para poder separar las hebras (BIO-RAD, 2012). García y colaboradores (2016), encontraron dos variantes del virus con valores de  $T_m$  de  $79,5 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $83,7 \pm 1^\circ\text{C}$ , a diferencia de las variantes encontradas de  $81^\circ\text{C}$  (T024) y  $81.5$  (C030).

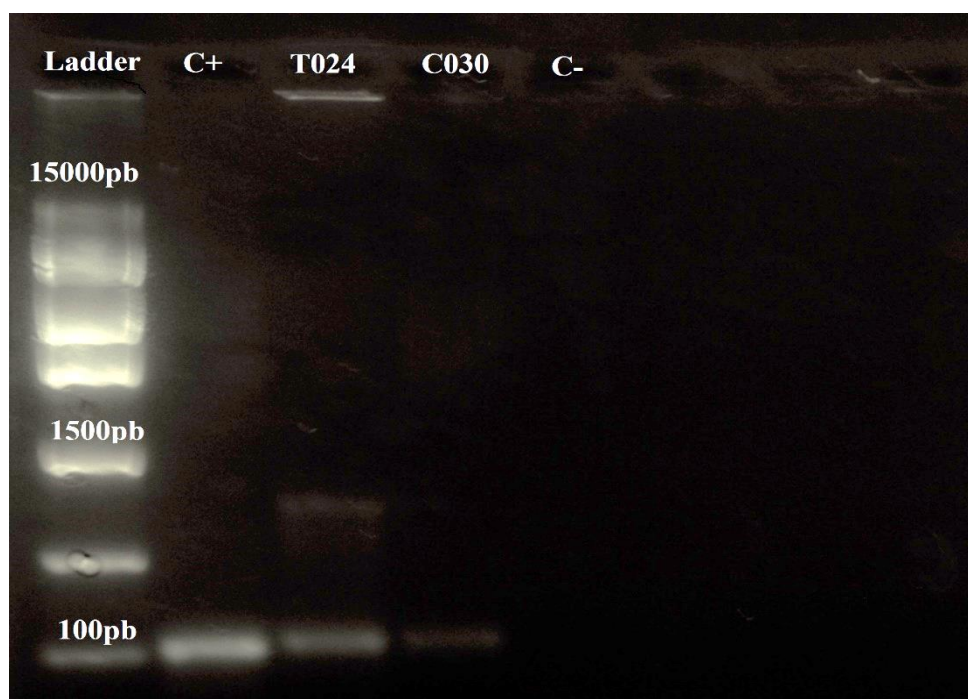
Solo se realizó la amplificación de los resultados positivos para DAS ELISA, debido a que este ensayo presente una sensibilidad de 98.9% (Agdia, 2015), por lo cual esta prueba realmente identifica aquellas plantas que presentan la enfermedad (Gordis, 2014)

Los *primers* utilizados en este estudio fueron analizados mediante la herramienta *OligoAnalyzer* (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES), donde se encontró que el *forward primer* presenta 14 homodímeros, mientras que el *primer reverse* presenta 9 homodímeros, y entre los dos *primers* 13 heterodímeros (ver anexo 5, 6 y 7), estos dímeros son evidenciados en la Figura 10 como un ruido de fondo.

Estos ruidos de fondo son leídos por el equipo, los cuales podrían ser interpretados como resultados positivos, por lo cual, es de suma importancia realizar una curva de *melt* (BioRad, 2012), como se muestra en la Figura 9 el control negativo amplificó en el ciclo 33 por lo cual podría ser interpretado como un resultado positivo, pero al realizar el análisis de la curva de *melt* (Figura 10) se confirmó que es un producto de los *primers*.

### 5.2.3. VISUALIZACIÓN EN ELECTROFORESIS Y PURIFICACIÓN DE BANDAS

Después de la corrida electroforética, se presentaron bandas en los carriles para el control positivo y las muestras, las bandas observadas miden 110pb aproximadamente al compararla con el *ladder* (Figura 11).



**Figura 11** Gel de electroforesis de los amplicones obtenidos en la RT-PCR. Se muestran amplicones de aproximadamente 100pb.

Después de purificar las bandas de ADN, se las cuantificó mediante espectrofotometría, obteniendo concentraciones de 4.879 ng/ $\mu$ L para T024 y 1.294 ng/ $\mu$ L para C030, la calidad de ADN fue buena ya que, los valores de la relación A260/A280 y A260/A230 se encuentran dentro del límite aceptable.



**Tabla 8** Número de acceso *GenBank* y porcentaje de cobertura de las muestras positivas de PVX

Muestra (n=2)	Porcentaje de identificación	Valor E	Nº acceso <i>GenBank</i>
T024	98%	1e <sup>-26</sup>	KR605347.1
C030	98%	2e <sup>-18</sup>	MH038050.1

El porcentaje de identidad de 98% es un porcentaje aceptable, aunque se recomienda que este porcentaje sea mayor del 99%, en este caso es bajo, debido a los *primers* usados. García y colaboradores, (2016) usaron cebadores específicos para amplificar la variante del virus encontrado en Colombia con N° de acceso al GenBank MH282866.1. En la

Tabla 8, las secuencias fueron identificadas como otras variantes de PVX, por lo cual, se recomienda el uso de *primers* universales o crear propios, debido a que los *primers* utilizados en este estudio son específicos. Por tanto, se recomienda realizar un secuenciamiento de los virus identificados para conocer si es una nueva variante para el Ecuador.

### 5.3. POSTULADOS DE KOCH

Los pilones de 15 días fueron adquiridos en buen estado como se muestra en la Figura 4. Las plántulas fueron sembradas en 16 macetas con sustrato estéril (Figura 13 y Figura 14). Tres plantas no se adaptaron y se marchitaron, entonces solo se usaron 9 plantas (tres controles y seis muestras).



**Figura 13. Preparación del ensayo.** Macetas con sustrato estéril compuesto de tierra negra, cascarilla de arroz y piedra pómez, dispuestas en el invernadero.



**Figura 14. Plántulas de uvilla.** Plantas ubicadas en el invernadero, en macetas con sustrato estéril.

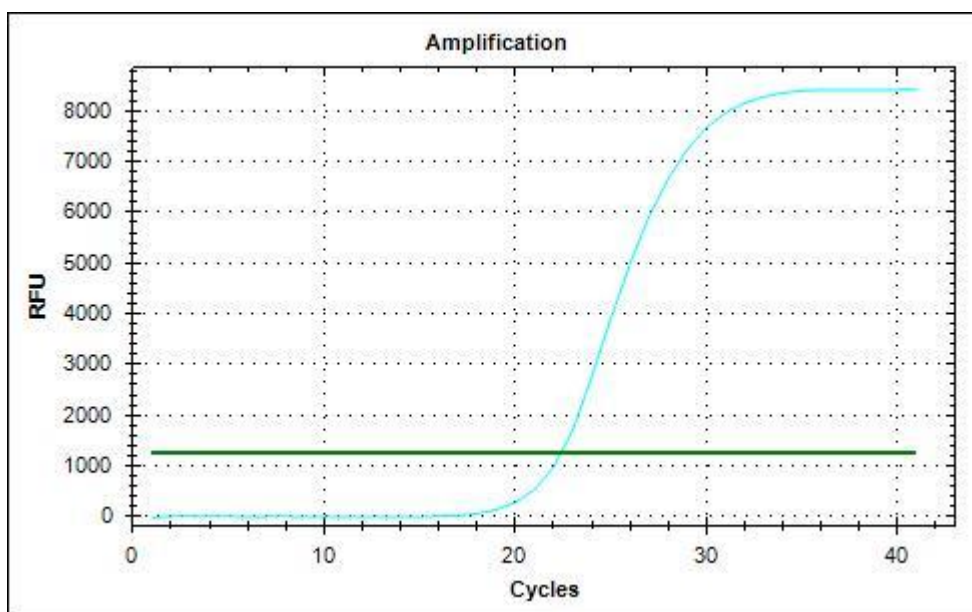
Después de los 15 días de la inoculación, las hojas infectadas presentaron mosaico rugoso, síntoma típico de una enfermedad vírica (Figura 5). La presencia del virus se confirmó nuevamente mediante serología y RT-qPCR (Tabla 9 y Figura 16).



**Figura 15. Síntomas de PVX.** Después de los 15 días de infección, se observan hojas con mosaico, enrollamiento y un retraso de crecimiento en la planta, a diferencia de las tres primeras plantas de la parte izquierda.

**Tabla 9** Resultado la prueba DAS-ELISA obtenidas del espectrofotómetro a 405nm para PVX.

Muestra (n=1)	Absorbancia a 405nm	Cut off ( $Cut\ off = 2 * \bar{X}CN$ )	Resultado
Postulados de Koch	2.542	0.359	Reactivo



**Figura 16 Curva de amplificación en RT-PCR.** Se muestra la amplificación del virus recuperado de los postulados de Koch en tiempo real, en el eje x se encuentra el ciclo en que el producto empieza amplificarse y en el eje y las unidades relativas de fluorescencia (RFU) emitidas. El virus recuperado amplificó antes del ciclo 35 considerando como un resultado positivo.

Durante la realización de este estudio, no se encontró literatura donde se realicen postulados de Koch para PVX, sin embargo, utilizando la metodología de inoculación descrita por Chapingo y colaboradores (2008), se logró una buena infección mostrando los síntomas esperados («Potato virus X», s. f.), 15 días después de la inoculación como se muestra en la Figura 15.

Hay que tomar en cuenta que, según la revista *Plant Disease* de la *American Phytopathological Society*, es suficiente realizar dos pruebas de identificación para determinar el agente causal de una enfermedad, en el caso de las infecciones víricas, se puede omitir realizar los postulados de Koch, debido a que, no todos los virus son replicables, siendo difícil que la infección se produzca, sin embargo, en nuestro estudio se logró realizar postulados.

Es importante desarrollar los postulados en lugares donde la temperatura y la humedad sean homogéneas. Arellano (2018), menciona que realizar el experimento en un invernadero controlado favorece a los postulados debido a que, la planta no sufre estrés por cambios bruscos de temperatura y con una humedad constante permite que la fotosíntesis no

se frene, como se muestra en la Tabla 10. Esto permite que se cumpla el triángulo epidemiológico descrito en Agrios (2005), donde se menciona que, una enfermedad se produce siempre y cuando esté presente un agente infeccioso, un hospedero y las condiciones ambientales adecuadas. En nuestro estudio, se cumplió el triángulo epidemiológico debido a que, se manejó un ambiente controlado (invernadero), plantas de uvilla sanas y susceptibles (hospedero) y un inóculo de PVX (hojas con el patógeno) como resultado de esto se desarrolló la enfermedad.

**Tabla 10** Registro de temperatura y humedad del invernadero en los ensayos de postulados de Koch

<b>Fecha</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>% Humedad</b>
12/11/2018	24	40
13/11/2018	22	42
14/11/2018	22	41
15/11/2018	23	40
16/11/2018	-	-
17/11/2018	-	-
18/11/2018	24	40
19/11/2018	22	42
20/11/2018	24	41
21/11/2018	22	40
22/11/2018	23	42
23/11/2018	-	-
24/11/2018	-	-
25/11/2018	22	41
26/11/2018	24	42

## 6. CONCLUSIONES

*Potato virus X* (PVX) fue identificado como agente causal del mosaico rugoso en plantas de *Physalis peruviana* obtenidas en las provincias de Cotopaxi y Tungurahua. El objetivo de la investigación fue cumplido, dando lugar a desarrollar el primer reporte sobre la presencia del mosaico rugoso causado por PVX en plantas de uvilla en el Ecuador.

El virus PVX fue encontrado en las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, sin embargo, se deberá realizar un muestreo a nivel nacional para observar si el virus se encuentra presente en el resto del país.

Los análisis serológicos como las InmunoStrip® y DAS Elisa demostraron ser una buena alternativa para la detección temprana del virus. La desventaja de estos métodos es que solo se puede analizar un virus a la vez y sus costos son elevados en el país, por lo que se recomienda desarrollar protocolos donde se puedan detectar más de un virus por análisis, como es el caso de un multiplex PCR.

Los análisis moleculares empleados detectaron correctamente al virus, además, permitieron observar dos variantes distintas del PVX analizado: SHI-C-17 y K9 Khanpur.

Los postulados de Koch se cumplieron y permitieron comprobar que el virus PVX produce los síntomas característicos de mosaico rugoso de la papa, pero esta vez en cultivos de uvilla.

El presente estudio demostró PVX ocasiona el mosaico rugoso de la hoja de uvilla, lo cual es de suma importancia debido a que, contribuye con datos que aportan a la vigilancia fitosanitaria, apoya a la creación de programas para evitar que la enfermedad se propague, y por tanto, se produzca un bajo rendimiento del cultivo.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agdia. (2015). Reagent Set DAS ELISA, Alkaline phosphatase label Coating. Recuperado a partir de <https://d163axztg8am2h.cloudfront.net/static/doc/ee/57/c990eefe3955835055fb5a008435.pdf>
- Agdia. (2016). USER GUIDE: PVX ImmunoStrip<sup>®</sup>, PVS ImmunoStrip, PVA ImmunoStrip Tests, 1-2.
- Agindotan, B. O., Shiel, P. J., y Berger, P. H. (2007). Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan<sup>®</sup>real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 142(1-2), 1-9. doi:10.1016/j.jviromet.2006.12.012
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (Fifth). Florida.
- Arellano, M. (2018). *Detección de Fusarium oxysporum en cultivos de uvilla (Physalis peruviana L.) en la Sierra norte y centro del Ecuador* Disertación. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Arias, F. J., Gómez, L. M., Suarez, E., y Rendón, S. (2015). Inteligencia de mercados para la cadena de uchuva colombiana (*Physalis peruviana* L). *Observatorio Iberoamericano del Desarrollo Local y la Economía Social (OIDLES)*, 9(18), 12 p.
- Banco Central del Ecuador. (2013). Boletín Mensual de Comercio Exterior - Ministerio de Comercio Exterior. Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones. CÓDIGO ISSN 1390-812Xext.
- Benavides, M., y Mora, R. (2005). *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva Physalis peruviana L.*
- BioRad. (2012). Precision Melt Analysis<sup>™</sup> Software. doi:10.1016/j.medmal.2014.06.004
- Bosquez, C. (2018). *Caracterización morfológica y molecular de Alternaria alternata hongo fitopatógeno causante del secamiento descendente del cáliz, en frutos de Physalis peruviana en la Sierra centro-norte del Ecuador.* Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- Carrillo, E., Aller, A., Cruz, S., Giampieri, F., y Alvarez, J. (2015). Andean berries from Ecuador: A review on botany, agronomy, chemistry and health potential. *Journal of Berry Research*, 5(2), 49-69. doi:10.3233/JBR-140093
- Cedeño, M. (2004). *PLAN EXPORTADOR, LOGISTICO Y DE COMERCIALIZACION DE UCHUVA AL MERCADO DE ESTADOS UNIDOS PARA FRUTEXPO S.C.I. LTDA.* Pontificia Universidad Javeriana.
- Chapingo., E., Ochoa, L., y Tlapal, B. (2008). Efecto del ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(1), 55-59.
- de La Rotta, M. (2014). Enfermedades de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). En C. Pássaro (Ed.), *Physalis peruviana L.: Fruta Andina para el mundo* (pp. 50-78).
- Faria, M., Magalhães, A., Nunes, M., y Oliveira, M. (2013). High resolution melting of trnL amplicons in fruit juices authentication. *Food Control*, 33(1), 136-141. doi:10.1016/j.foodcont.2013.02.020
- Fischer, G., Almanza, P., y Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 01-15. doi:10.1590/0100-2945-441/13
- Fischer, G., Herrera, A., y Almanza, P. (2011). *Cape gooseberry (Physalis peruviana L.). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits.* Woodhead Publishing Limited. doi:10.1533/9780857092762.374
- Fleury, D., y Walker, J. (2014). *IN Series Editor. Candida Species Methods and Protocols* (Vol. 1). doi:10.1007/978-1-4939-2687-9
- Garcia, M. C. (2015). *Capítulo III Poscosecha: Desarrollo tecnológico para el fortalecimiento del manejo poscosecha de la uchuva ( Physalis peruviana L .).*
- García, D., Olarte, M., Gutiérrez, P., y Marín, M. (2016). Detección serológica y molecular del Potato virus X (PVX) en tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. Bukasov) en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 1-8. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.51389
- Gongora, A., y Rojas, P. (2006). *INCIDENCIA DE LAS ENFERMEDADES EN*

*UCHUVA Physalis peruviana L. POR ESTADO FENOLÓGICO Y DE ACUERDO CON LA UBICACIÓN EN LOS DIFERENTES ESTRATOS DE LA PLANTA, EN EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.*

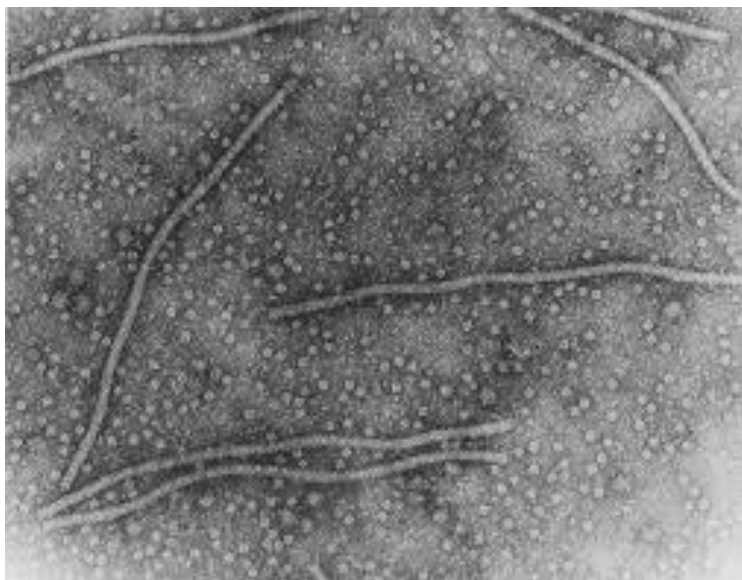
- Gordis, L. (2014) *Epidemiología* (Fith).
- Gutiérrez, P., Alzate, J., y Montoya, M. (2015). Complete genome sequence of an isolate of Potato virus X (PVX) infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Virus Genes*, 50(3), 518-522. doi:10.1007/s11262-015-1181-1
- Invitrogen. (2008). UltraPure™ Agarose, 1-4.
- Invitrogen. (2013). 1 Kb Plus DNA Ladder, (10787), 1-2.
- Kopp, A., Kondrák, M., y Bánfalvi, Z. (2015). Review Article: Molecular Mechanisms of Resistance to *Potato virus X* and *Y* in Potato. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 50(2), 151-160. doi:10.1556/038.50.2015.2.1
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Lico, C., Benvenuto, E., y Baschieri, S. (2015). The Two-Faced Potato Virus X: From Plant Pathogen to Smart Nanoparticle. *Frontiers in Plant Science*, 6(November), 1-8. doi:10.3389/fpls.2015.01009
- Lonza. (2014). GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain 10,000X. *Lonza*, 8-11.
- Macrogen. (2018). Standard Sequencing. Recuperado 20 de diciembre de 2018, a partir de [https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/standard\\_seq\\_intro.jsp](https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/standard_seq_intro.jsp)
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Dandekar, A. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 1-25. doi:10.1007/s13593-014-0246-1
- Massumi, H., Poormohammadi, S., Pishyar, S., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hosseini, A., Varsani, A. (2014). Molecular characterization and field survey of Iranian potato virus X isolates. *VirusDisease*, 25(3), 338-344. doi:10.1007/s13337-014-0222-z

- Muniz, J., Kretschmar, A., Rufato, L., Pelizza, T., Rufato, A., y Macedo, T. (2014). General aspects of physalis cultivation. *Ciência Rural*, 44(6), 964-970. doi:10.1590/S0103-84782014005000006
- Nawirska-Olszańska, A., Stępień, B., Biesiada, A., Kolniak-Ostek, J., y Oziembłowski, M. (2017). Rheological, Chemical and Physical Characteristics of Golden Berry (*Physalis peruviana* L.) after Convective and Microwave Drying. *Foods*, 6(8), 60. doi:10.3390/foods6080060
- Olivares, M., Dekker, M., Verkerk, R., y van Boekel, M. (2016). Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.): Review from a supply chain perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 83-92. doi:10.1016/j.tifs.2016.09.009
- Oliveira, K. de, Costa, C., Bittar, C., Santos, V. P. dos, Oliveira, V., y Sá, J. de. (2012). Indigestible cellulose and lignin in determining feces production and apparent digestibility in horses. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. scielo.
- Pássaro, C., y Moreno, D. (2014). *Uchuva Physalis peruviana L.: fruta andina para el mundo* (1ª). Bogot.
- Potato virus X. (s. f.). Recuperado 25 de enero de 2019, a partir de <http://14.139.189.27/virusdb/detail.php?id=29>
- Puente, L., Pinto, C., Castro, E., y Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44(7), 1733-1740. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.034
- QIAGEN. (2017). QIAquick Gel Extraction Kit. Recuperado 23 de noviembre de 2017, a partir de <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit/#orderinginformation>
- Ramírez, J., Vásquez, M., Montoya, M., y Jaimes, E. (2015). Identificación de Potyvirus en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en Antioquia mediante detección serológica. *Revista Politécnica*, 5(8), 112-120.
- Sambrook, J., y Green, M. (2012). *Molecular cloning a laboratory manual* (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scholthof, K., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Foster, G.

- (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938-954. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x
- Shcherbakova, L. (2007). Advanced methods of plant pathogen diagnostics. *Comprehensive and Molecular Phytopathology*, 75-116. doi:10.1016/B978-044452132-3/50006-7
- Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., Mafficini, A., Malpeli, G., Scarpa, A. (2013a). DNA Qualification Workflow for Next Generation Sequencing of Histopathological Samples. *PLoS ONE*, 8(6), e62692.
- Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., Mafficini, A., Malpeli, G., Scarpa, A. (2013b). DNA Qualification Workflow for Next Generation Sequencing of Histopathological Samples. *PLoS ONE*, 8(6), e62692.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2014). Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit #K0801. *ThermoScientific Protocol*.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase.
- Valuev, V., Afonnikov, D., Ponomarenko, M., Milanese, L., y Kolchanov, N. (2002). ASPD (Artificially Selected Proteins/Peptides Database): a database of proteins and peptides evolved in vitro. *Nucleic Acids Res*, 30(1), 200-202. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Vázquez, P., Rito, M., Martínez, S., y Hosseini, S. (2018). *Enzyme-linked Immunosorbent Assay ( ELISA ) From A to Z*.
- Vásquez, V., Montero, M., y Rivera, C. (2004). Efecto de la infección de PVX y PVY en la producción de *Solanum tuberosum* en invernadero con los cultivares Floresta y Granola. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, (73), 57-63.
- Walker, J. (2015). *Plant Virology Protocols Series Editor*. doi:10.1007/978-1-4939-1695-5
- Zapata, J., Saldarriaga, A., Londoño, M., y Díaz, C. (2002). Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia. Rionegro.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1.** Microfotografía del tejido vegetal infectado por PVX (Walker, 2015).

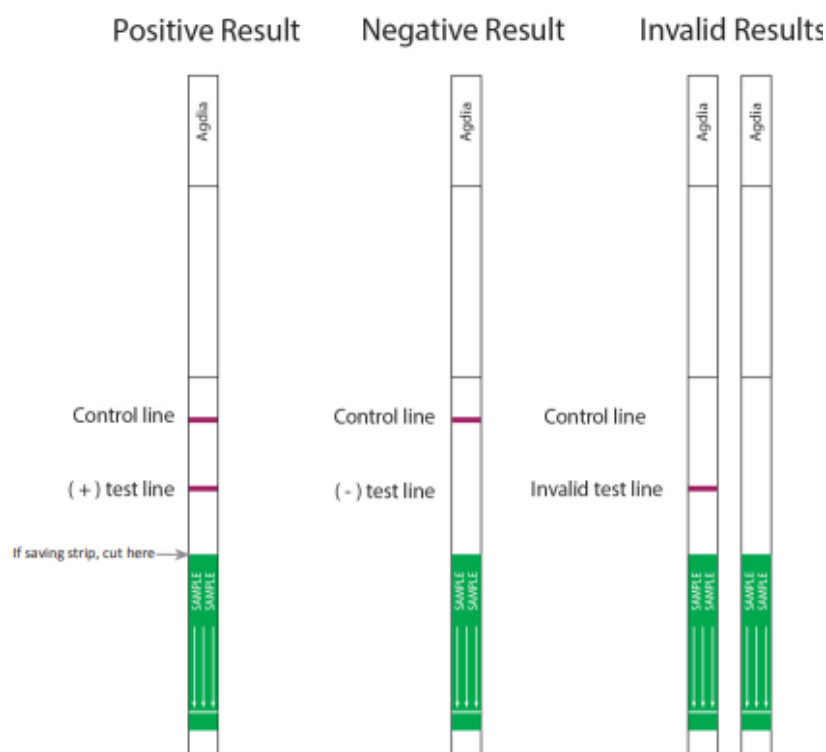


**Anexo 2.** Codificación de los equipos utilizados

<b>EQUIPO</b>	<b>MARCA</b>	<b>ÁREA</b>	<b>CODIFICACIÓN</b>
Balanza	ADAM	Fitopatología	FP/EM/011
Espectrofotómetro ELISA	BIOTEK	Fitopatología	FP/EM/007
Termohigrómetro	TAYLOR	Fitopatología	FP/EM/008
Pipeta Automática 100µL-1000µL	GILSON	Fitopatología	FP/EM/042
Pipeta Automática 10µL-100µL	GILSON	Fitopatología	FP/EM/043
Pipeta Automática 0.1µL-10µL	GILSON	Fitopatología	FP/EM/044
Congelador	BIOBASE	Fitopatología	FP/EM/068
Pipeta Automática 100µL-1000µL	EPPENDORF	Biología Molecular	BM/EM/019

**Anexo 2 (continuación)** Codificación de los equipos utilizados

EQUIPO	MARCA	ÁREA	CODIFICACIÓN
Pipeta Automática 10µL-100µL	EPPENDORF	Biología Molecular	BM/EM/021
Pipeta Automática 0.1µL-10µL	EPPENDORF	Biología Molecular	BM/EM/022
Pipeta Automática 10µL-100µL	EPPENDORF	Biología Molecular	BM/EM/024
Pipeta Automática 0.1µL-10µL	EPPENDORF	Biología Molecular	BM/EM/025
Pipeta Automática 0.1µL-10µL	EPPENDORF	Biología Molecular	BM/EM/029
Termociclador en tiempo real	BIORAD	Biología Molecular	BM/EM/071
Termociclador	BIORAD	Biología Molecular	BM/EM/069
Fuente de poder electroforesis	BIORAD	Biología Molecular	BM/EM/083

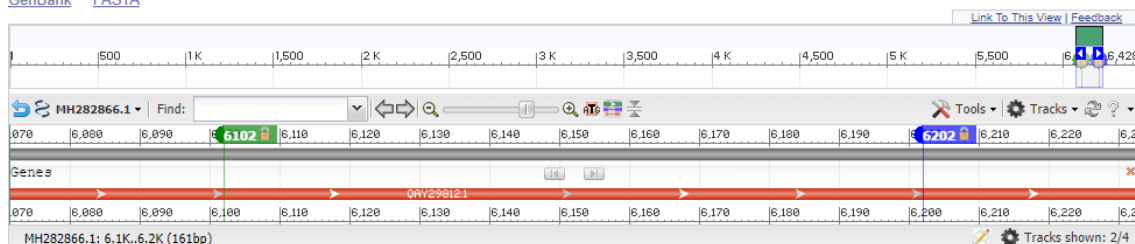
**Anexo 3.** Interpretación de resultados de InmunoStrip®

**Anexo 4.** Región diana (101pb) de los primers usados, región (5' 6102 – 6202 3') de la *coat protein*.

#### Potato virus X isolate Tomato\_Antioquia, complete genome

GenBank: MH282866.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



#### Anexo 5. Secuencia consenso T024

AGTCAATTCTTTCAATGGAGTCACCAACCCAGCTGCCATCATGCCAGAGA  
 GGGGCTCATCCGGCCACCGTCTGAAGCATTATTGTGCTCCAGATTTTCGATTT  
 CTTACCATCCCTACTACAATAATACTTGATTTGTTCTTATATACCAATTAAGC  
 TCTATTATACTTAACAAATTTACCTAATTCTTATTTTTTGGGTAATGCAACT  
 TCAACATTTCAAGCGGTCGAGAGGGAAGTTGTGATCACTACTTCTCACAGG  
 AAAGAATTG

#### Anexo 6. Secuencia consenso C030

TCCTCTAATCGTGAGTCACCAACCCAGCTGCCATCATGCCAAAGAGGGGC  
 TCATCCGGCCACCGTCTGAAGCATGTGAGTTTTTCGACCGATAAACAATTTTC  
 TTGCTTTTTCTCTAAGATAAAATATTGATTTCTTCATTACTCCATTTAACTCT  
 AACTTTTTTATCTAATTTCAACTTATCCTTATCTTTTGAGTAAGGGAACGGAT  
 GCTGATGCTTGGTCTAGAGGGAAGTTGTGAGAATTACGTACCGCAGGAAAA  
 AA

#### Anexo 7. Homodímeros del *forward primer*

Delta G: -6.21 kcal/mole Base Pairs: 3  
 5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

|||  
 3' CGAAGTCTGCCACCGG

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2  
 5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

: ||  
 3' CGAAGTCTGCCACCGG

Delta G: -3.52 kcal/mole Base Pairs: 3  
 5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

3'                                   |||  
CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

5'           AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      :   :       ||

3' CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      :: :   : ||

3'           CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      || : ::       :

3'   CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      || :       :

3'           CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      ||

3'                                   CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

5'           AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      :   ||   :

3' CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      || :

3'           CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2**

5'           AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      || : : : :

3' CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      || : :       :

3'   CGAAGTCTGCCACCGG

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC

      : ||

3' CGAAGTCTGCCACCGG

**Anexo 8. Homodímeros del *reverse primer*****Delta G: -9.28 kcal/mole Base Pairs: 4**

```

5'          GGCCACCGTCTGAAGC
           ||||
3' CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'  GGCCACCGTCTGAAGC
     :  ||  :
3'  CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'  GGCCACCGTCTGAAGC
     ||  :  :  :  :  ::
3'  CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'  GGCCACCGTCTGAAGC
           ||
3'          CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'          GGCCACCGTCTGAAGC
           ||  ::
3'  CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'  GGCCACCGTCTGAAGC
     ||  ::
3'  CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'  GGCCACCGTCTGAAGC
           ||  ::
3'          CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'  GGCCACCGTCTGAAGC
     :  ||  ::  :
3'          CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Delta G: -1.34 kcal/mole Base Pairs: 2**

```

5'  GGCCACCGTCTGAAGC
     ||  ::
3'  CGAAGTCTGCCACCGG

```

**Anexo 9.** Heterodímeros entre *reverse primer* y *forward primer*

Delta G: -5.36 kcal/mole Base Pairs: 4

```

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      : |||| :
3'           CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      ||
3'           CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      : || :
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      ||  ::
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      :  :: || :: :
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      ||  ::
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      || : : ::
3'           CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      ||
3'           CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      :  ||  ::  :
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      ||  ::
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA

```

Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      || ::
3'          CGCTTAAACACGAGTCCGAA
```

**Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'          AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      || ::
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA
```

**Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5'          AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      || ::
3' CGCTTAAACACGAGTCCGAA
```

**Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2**

```
5' AAGCCTGAGCACAAATTCGC
      ||          ::
3'          CGCTTAAACACGAGTCCGAA
```