

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Evaluación por secuenciamiento de próxima generación de
Closterovirus spp. relacionadas con el síndrome del
decaimiento y muerte de *Neltuma* spp. en el norte del Perú**

TESIS

**Para optar el grado académico de Maestro en Ciencias
con mención en Biotecnología Molecular**

Autor: Bach. Javier Javier Alva

Tumbes, 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Evaluación por secuenciamiento de próxima generación de
Closterovirus spp. relacionadas con el síndrome del
decaimiento y muerte de *Neltuma* spp. en el norte del Perú**

Tesis aprobada en forma y estilo por

Dr. Miguel Ángel Garrido Rondoy (presidente)

Dra. Rosa Liliana Solís Castro (secretaria)

Mg. Luis Dicson Sánchez Abad (vocal)

Tumbes, 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR



**Evaluación por secuenciamiento de próxima generación de
Closterovirus spp. relacionadas con el síndrome del
decaimiento y muerte de *Neltuma* spp. en el norte del Perú**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su
contenido y forma**

Bach. Javier Javier Alva (autor)

<https://orcid.org/0000-0002-4953-8165>

Mg. Luis Dicson Sánchez Abad (asesor)

<https://orcid.org/0000-0001-9397-902>

Ph. D. Benoit Diringer Mathieu (coasesor)

<https://orcid.org/0000-0001-6129-1751>

Tumbes, 2026

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes – Perú

"Año de la Esperanza y el Fortalecimiento de la Democracia"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los dieciséis días del mes de marzo del dos mil veintiséis, siendo las once horas y treinta minutos, en el aula N° 02 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, se reunieron los miembros del jurado calificador constituido con la **RESOLUCIÓN No 23 -2024/UNTUMBES-EPG-D**, uno de febrero de dos mil veinticuatro, presidido por el **Dr. Miguel Angel Garrido Rondoy**, integrado por la **Dra. Rosa Liliana Solis Castro** (Secretaria) y el **Mg. Luis Dicson Sánchez Abad** (vocal y asesor)

Instalado el jurado, se procedió a la evaluación, deliberación y calificación del acto de la sustentación de la tesis titulada: **"Evaluación por secuenciamiento de próxima generación de closterovirus spp. relacionadas con el síndrome del decaimiento y muerte de Neltuma spp. en el norte del Perú"**, presentada por el sustentante: **Javier Javier Alva**, para optar el grado académico de **MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**.

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la correspondiente deliberación, el jurado, conforme a lo normado en el artículo N° 111 del Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al egresado, **APROBADO por UNANIMIDAD** con el calificativo de **MUY BUENO**

Por lo anterior, el sustentante está expedito para iniciar los trámites correspondientes y conducentes a la obtención del grado académico de **Maestro en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular**, en conformidad con lo normado en la Ley Universitaria N° 30220, el Texto Único Ordenado del Estatuto, El Reglamento General, el Reglamento General de Grados Títulos y el Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las doce horas y treinta minutos, del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de público asistente.

Dr. Miguel Angel Garrido Rondoy
Presidente
DNI N° 00240207
<https://orcid.org/0000-0001-5217-1483>

Dra. Rosa Liliana Solis Castro
Secretaria
DNI N° 17628592
<https://orcid.org/0000-0002-1813-8644>

Mg. Luis Dicson Sánchez Abad
(vocal y asesor)
DNI N° 45777229
<https://orcid.org/0000-0001-9397-9024>

C.c.
Jurado de Tesis
Interesado
Unidad de Investigación
Archivo (Director EPG).

INFORME DE ORIGINALIDAD TURNITIN



Javier JAVIER ALVA

TESIS.FINAL.MBM (2) (1) (1)

Tesis 2026-1

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid::3117:578146635

Fecha de entrega
13 abr 2026, 17:00 GMT-5

Fecha de descarga
13 abr 2026, 17:05 GMT-5

Nombre del archivo
TESIS.FINAL.MBM (2) (1) (1).docx

Tamaño del archivo
15.3 MB

101 páginas

22.644 palabras

131.795 caracteres

M.Sc. Luis Dicson Sánchez Abad
ASESOR
ORCID 0000-0001-9397-9024






8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

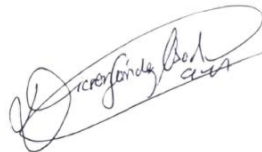
- 7%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 5%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



M.Sc. Luis Dicson Sánchez Abad
ASESOR
ORCID 0000-0001-9397-9024

Fuentes principales

- 7% Fuentes de Internet
- 2% Publicaciones
- 5% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

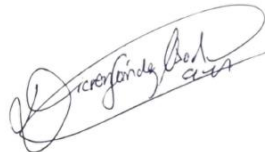
Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

| | | | |
|----|-------------------------|--|-----|
| 1 | Internet | doczz.es | <1% |
| 2 | Internet | cybertesis.unmsm.edu.pe | <1% |
| 3 | Internet | bq.facmed.unam.mx | <1% |
| 4 | Internet | repositorio.lamolina.edu.pe | <1% |
| 5 | Internet | riviste.unimi.it | <1% |
| 6 | Internet | www.researchgate.net | <1% |
| 7 | Trabajos del estudiante | Universidad TecMilenio on 2024-01-27 | <1% |
| 8 | Internet | cdn.www.gob.pe | <1% |
| 9 | Internet | phytotaxa.mapress.com | <1% |
| 10 | Trabajos del estudiante | ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey on 2023-12-15 | <1% |
| 11 | Internet | www.coursehero.com | <1% |

| | | | |
|----|-------------------------|--|-----|
| 12 | Internet | bdttd.unoeste.br:8080 | <1% |
| 13 | Internet | graellsia.revistas.csic.es | <1% |
| 14 | Trabajos del estudiante | Universidad Técnica Nacional de Costa Rica on 2024-11-08 | <1% |
| 15 | Internet | revistauniversitaria.uaemex.mx | <1% |
| 16 | Internet | www.tandfonline.com | <1% |
| 17 | Internet | cris.unp.edu.pe | <1% |
| 18 | Internet | ls.beckmancoulter.co.jp | <1% |
| 19 | Internet | studenttheses.uu.nl | <1% |
| 20 | Internet | www.biorxiv.org | <1% |
| 21 | Internet | vhir.vallhebron.com | <1% |
| 22 | Trabajos del estudiante | Universidad Nacional de Cajamarca on 2026-03-10 | <1% |
| 23 | Internet | apps.worldagroforestry.org | <1% |
| 24 | Internet | prociencia.gob.pe | <1% |
| 25 | Trabajos del estudiante | University of Edinburgh on 2020-08-13 | <1% |

| | | | |
|----|-------------------------|---|-----|
| 26 | Publicación | Aylen Capparelli, Dorian Q. Fuller. "Archaeobotanical evidence for a domesticated..." | <1% |
| 27 | Internet | oa.upm.es | <1% |
| 28 | Internet | sedici.unlp.edu.ar | <1% |
| 29 | Trabajos del estudiante | Universidad San Francisco de Quito on 2016-10-18 | <1% |
| 30 | Trabajos del estudiante | Universidad de Pamplona on 2024-07-04 | <1% |
| 31 | Internet | cell.ijbio.ir | <1% |
| 32 | Trabajos del estudiante | Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayolo on 2022-10-08 | <1% |
| 33 | Internet | rinacional.tecnm.mx | <1% |
| 34 | Internet | vdocumento.com | <1% |
| 35 | Internet | www.bmbq.uma.es | <1% |
| 36 | Internet | phd.mater.uni-mate.hu | <1% |
| 37 | Internet | plakauto.be | <1% |
| 38 | Internet | repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar | <1% |
| 39 | Internet | saludpublica.mx | <1% |

| | | | |
|----|-------------------------|--|-----|
| 40 | Internet | docplayer.es | <1% |
| 41 | Internet | hdl.handle.net | <1% |
| 42 | Internet | repositorio.untumbes.edu.pe | <1% |
| 43 | Trabajos del estudiante | Universidad Nacional de Tumbes on 2026-04-07 | <1% |
| 44 | Trabajos del estudiante | Universidad TecMilenio on 2025-04-26 | <1% |
| 45 | Trabajos del estudiante | uncedu on 2025-01-23 | <1% |
| 46 | Internet | 1library.co | <1% |
| 47 | Trabajos del estudiante | ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey on 2026-04-11 | <1% |
| 48 | Internet | repositorio.serfor.gob.pe | <1% |



M.Sc. Luis Dicson Sánchez Abad
ASESOR
ORCID 0000-0001-9397-9024

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres, Manuel Javier Nomberto e Ignacia Alva de Javier, a quienes guardo una imperecedero recuerdo, amor y gratitud por haber contribuido a mi formación como persona y a mi formación profesional. Este pasado, refleja de su amor y dedicación hacia mí, siempre estaré agradecido de ellos.

A mis hermanos, Andrea, José Augusto, Ana, Violeta, José Manuel, Jorge, Leda y Manuel Barnard, por ser muy importantes en mii vida y por el estrecho vínculo que nos une.

A mi esposa Semira, a mis hijos Perla, Andrea, María José y José Augusto por el cariño y ánimo y empuje en cada momento de mi vida para siempre dar un paso adelante.

A mis alumnos de la Facultad de agronomía - Universidad Nacional de Piura, quienes siempre me sirven como fuente de inspiración para mejorar y actualizar mis conocimientos como docente y de esta manera contribuir en su mejor formación profesional.

AGRADECIMIENTO

Expreso gratamente mi agradecimiento al asesor Mg. Dicson Sánchez Abad y a mi coasesor Ph. D. Benoit Diringer Mathieu por su dedicación y enseñanzas en la ejecución de la tesis.

Agradezco sinceramente a la Universidad de Piura, Universidad Nacional de Tumbes, IncaBiotec, SERFOR, INRAE por haberme hecho partícipe de esta importante investigación.

Al proyecto de investigación básica “Determinación de la etiología de la mortandad del algarrobo (*Neltuma* sp.) observada en los bosques secos del Norte del Perú, mediante diagnóstico molecular y bioensayos” por su apoyo y participación.

Al Ing. Gastón Cruz Alcedo, responsable técnico del proyecto y a los participantes del equipo de investigación Yuliana Mendoza Martínez, Krizia Maribel Pretell, Karol Vílchez Estrada, David Roy Aldana, William Nauray, Delia Talledo, Silvana Marigorda, Thierry Jean Candresse y Reynaldo Raygada por su apoyo y estímulo para sacar adelante esta investigación.

A todos, mi profundo agradecimiento por su participación y contribución en la búsqueda de la solución de un problema que afecta nuestros bosques de algarrobo.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | xvii |
| ABSTRACT..... | xviii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 19 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 21 |
| 1. El algarrobo | 21 |
| 1.1 Taxonomía e identificación | 21 |
| 1.2 Sinonimia..... | 21 |
| 1.3 Distribución geográfica..... | 22 |
| 1.4 Genética..... | 22 |
| 1.5 Especies en el Perú..... | 22 |
| 1.6 Morfología | 23 |
| 1.7 Ecología y usos..... | 24 |
| 2. Enfermedades del algarrobo | 24 |
| 2.1 Hongos y pseudohongos | 24 |
| 2.2 Virus..... | 25 |
| 3. Glosario de términos básicos | 35 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 38 |
| 1. Zonas de estudio, periodo de ejecución y toma de muestras..... | 38 |
| 1.1 Zonas de estudio | 38 |
| 1.2 Periodo de ejecución | 38 |
| 1.3 Toma de muestras | 38 |
| 2. Síntomas y grados de severidad de la enfermedad..... | 39 |
| 3. Extracción de ARN total..... | 41 |
| 3.1 Concentración, pureza e integridad del ARN total | 42 |
| 3.2 Conservación del ARN para el envío a secuenciamiento..... | 44 |
| 4. Secuenciamiento de ARN (RNA-seq) por Azenta..... | 45 |
| 4.1 Concentración total y pureza de ácidos nucleicos | 45 |
| 4.2 Medición de la cantidad de ARN..... | 45 |
| 4.3 Evaluación de calidad e integridad del ARN..... | 45 |
| 4.4 Evaluación del tamaño y distribución de fragmentos | 45 |
| 4.5 Secuenciación..... | 46 |
| 4.6 Análisis bioinformático de las secuencias para la detección de virus | 46 |
| 4.7 Análisis de las lecturas del ARNseq para estudios del microbioma | 46 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5. | Secuenciación de Sanger | 47 |
| 5.1 | Retrotranscripción del ARN (RT-PCR) | 47 |
| 5.2 | Detección del CTV mediante la PCR | 48 |
| 5.3 | Electroforesis en gel de agarosa | 48 |
| 5.4 | Secuenciamiento y análisis informático | 49 |
| 6. | Indexado biológico..... | 49 |
| 6.1 | Recolección de ramillas de árboles reservorio..... | 49 |
| 6.2 | Obtención de corteza de varetas reservorio..... | 49 |
| 6.3 | Preparación de los plantones indicadores..... | 50 |
| 6.4 | Inoculación de corteza | 50 |
| 6.5 | Despunte y primera defoliación de los plantones indicadores..... | 50 |
| 6.6 | Segunda defoliación de los plantones indicadores..... | 51 |
| 6.7 | Diseño experimental | 51 |
| 6.8 | Evaluaciones del crecimiento de nuevas brotes | 52 |
| 6.9 | Aspecto del follaje..... | 52 |
| IV. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 54 |
| 1. | Sintomatología..... | 54 |
| 2. | ARNseq por Azenta..... | 60 |
| 2.1. | Concentración y pureza de ácidos nucleicos..... | 60 |
| 2.2. | Cantidad total de ARN | 61 |
| 2.3. | Calidad e integridad del ARN..... | 61 |
| 2.4. | Integridad del ARN por tamaño y distribución de los fragmentos..... | 63 |
| 3. | Detección de virus por illumina | 65 |
| 3.1. | Metatranscriptómica de <i>N. pallida</i> | 69 |
| 4. | Secuenciamiento por Macrogen..... | 71 |
| 4.1 | Detección del gen de la actina y de la proteína de la cápside del CTV..... | 71 |
| 4.2 | Secuenciamiento | 73 |
| 5. | Indexado | 76 |
| 5.1 | Crecimiento de brotes (cm)..... | 76 |
| 5.2 | Aspecto externo del follaje de los plantones | 77 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 81 |
| 7. | RECOMENDACIONES | 82 |
| 8. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| | ANEXO | 103 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Grados de severidad del síndrome de mortandad de <i>N. pallida</i>..... | 39 |
| Tabla 2. Puntos de muestreo..... | 40 |
| Tabla 3. Secuencia de primers del control interno actina y del CTV..... | 48 |
| Tabla 4. Tratamientos en ensayo de indexación..... | 51 |
| Tabla 5. Concentración y pureza de ácidos nucleicos por NanoDrop..... | 59 |
| Tabla 6. Calidad e Integridad del ARN total realizado por Azenta..... | 62 |
| Tabla 7. Anotación funcional de proteínas predichas mediante EggNOG-mapper..... | 68 |
| Tabla 8. Clasificación taxonómica de las lecturas ARNseq por Azenta..... | 70 |
| Tabla 9. Secuencias amplificadas para CTV por Sanger..... | 73 |
| Tabla 10. Prueba de Duncan: ritmo promedio de crecimiento (cm) de brotes ($\alpha=0,0$).. | 76 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Zonas de estudio de <i>N. pallida</i> | 39 |
| Figura 2. Toma de muestras de cambium | 41 |
| Figura 3. Extracción de ARN del algarrobo | 43 |
| Figura 4. Espectrofotómetro NanoDrop/Photometer (a), electroforesis (b)..... | 44 |
| Figura 5. Proceso de indexado | 53 |
| Figura 6. Síntomas del decaimiento y muerte de <i>N. pallida</i> | 57 |
| Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ARN de cambium y hojas | 60 |
| Figura 8. Integridad del ARN de muestras de cambium por electroforesis capilar | 64 |
| Figura 9. Electroferograma TapeStation para medir la calidad del ARN | 65 |
| Figura 10. Diagrama de Sankey: ruta taxonómica de las lecturas microbianas..... | 71 |
| Figura 11. Amplificación del gen constitutivo de Actina..... | 72 |
| Figura 12. Amplificación del gen de la proteína de la cápside del CTV..... | 72 |
| Figura 13. Curva de crecimiento de brotes después de la primera defoliación | 76 |
| Figura 14. Curva de crecimiento de brotes después de la segunda defoliación..... | 77 |
| Figura 15. Aspecto del follaje después de la primera defoliación | 79 |
| Figura 16. Aspecto del follaje después de la segunda defoliación..... | 80 |

RESUMEN

El algarrobo (*Neltuma pallida*) constituye un componente ecológico y socioeconómico clave de los bosques secos del norte del Perú; sin embargo, desde inicios del siglo XXI se ha registrado un síndrome progresivo de decaimiento y mortalidad cuya etiología no ha sido esclarecida. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la posible asociación de Closterovirus spp. con dicho síndrome mediante enfoques moleculares y biológicos complementarios, con énfasis en el uso del secuenciamiento de próxima generación. Se realizó la caracterización sintomatológica de árboles sanos y afectados en bosques de Piura, seguida de la extracción y evaluación de la calidad del ARN total a partir de cambium y hojas. El ARN del cambium presentó mejores indicadores de pureza e integridad, por lo que fue priorizado para el análisis transcriptómico. El RNA-Seq, realizado en plataforma Illumina, no evidenció la presencia de virus episomales activos; en cambio, se identificaron secuencias asociadas a virus endógenos (rhabdovirus y pararetrovirus) y mitovirus relacionados con regiones del genoma mitocondrial de *N. pallida*. Los análisis metatranscriptómicos y taxonómicos tampoco revelaron lecturas virales, aunque se observó una mayor carga microbiana en muestras provenientes de árboles severamente afectados. La detección mediante RT-PCR permitió amplificar el gen de la proteína de la cápside del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), los productos obtenidos evidenciaron una baja relación viral cercanas al 96%. Finalmente, las pruebas de indexado biológico no demostraron transmisión de la enfermedad. En conjunto, los resultados indican que el síndrome de decaimiento del algarrobo no estaría asociado a infecciones virales activas detectables por RNA-Seq, y resaltan la importancia de integrar metodologías dirigidas y no dirigidas para el diagnóstico de enfermedades forestales complejas.

Palabras clave: Síndrome de decaimiento, Neltuma pallida, Closteroviridae, Secuenciación de alto rendimiento, Secuenciación por terminación de cadena, Indexado.

ABSTRACT

The carob tree (*Neltuma pallida*) is an essential ecological and socioeconomic component of the dry forests of northern Peru; however, since the early twenty-first century a progressive syndrome of decline and mortality has been recorded, the etiology of which remains unclear. The aim of this study was to evaluate the possible association of Closterovirus spp. with this syndrome through complementary molecular and biological approaches, with emphasis on next-generation sequencing. Symptom characterization of healthy and affected trees was carried out in forests of Piura and Tumbes, followed by extraction and assessment of total RNA quality from cambium and leaves. Cambium RNA showed better purity and integrity indicators, and was therefore prioritized for transcriptomic analysis. RNA-Seq, performed on an Illumina platform, did not reveal the presence of active episomal viruses; instead, sequences associated with endogenous viruses (rhabdovirus and pararetrovirus) and mitoviruses related to regions of the mitochondrial genome of *N. pallida* were identified. Metatranscriptomic and taxonomic analyses also did not reveal viral reads, although a higher microbial load was observed in samples from severely affected trees. Detection via RT-PCR enabled amplification of the coat protein gene of citrus tristeza virus (CTV), and the resulting products showed a low viral relationship of about 96%. Finally, biological indexing tests did not demonstrate disease transmission. Taken together, the results indicate that the carob decline syndrome is likely not associated with active viral infections detectable by RNA-Seq, and highlight the importance of integrating targeted and untargeted methodologies for diagnosing complex forest diseases.

*Keywords: Decline syndrome, Neltuma pallida, *Closteroviridae*, High-throughput sequencing, Chain-termination sequencing, Indexing*

I. INTRODUCCIÓN

El algarrobo (*Neltuma pallida*) forma parte del bosque xerofítico ecuatorial del noroeste peruano a partir de la Latitud 7°S hacia el Norte, departamentos de Lambayeque, Piura y Tumbes (Mostacero et al., 2007; Cairati, 2013), en una superficie de 1,8 millones de ha (Cardich, 1997). Es un recurso multipropósito muy importante como alimento para el ser humano y animales, madera, leña y carbón, miel, como bosques y comunidades en zonas áridas, cubierta vegetal, mejora del suelo, mejora del microclima y en la disponibilidad del agua (Mostacero et al., 2007; Kometter y Reynel, 2022).

El problema que da origen a esta investigación es la enfermedad emergente conocida como “decaimiento y muerte” de árboles de algarrobo que se observa a partir del año 2000 (Llontop, 2013). Kometter y Reynel (2022) informan la muerte del 40% de árboles en pie y 27% en tránsito hacia la muerte, reduciendo gradualmente su superficie de cobertura, afectando su ecosistema y profundizando las desigualdades socioeconómicas en las poblaciones rurales.

El Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre [SERFOR ,2019"], atribuye la vulnerabilidad del algarrobo a la combinación de factores antrópicos y de origen natural como el cambio climático.

Por su complejidad, se le conoce como el “síndrome de decaimiento y muerte del algarrobo”, con alta incidencia en Tumbes, Piura y Lambayeque, hasta la fecha, no se ha establecido un diagnóstico etiológico preciso.

Estudios preliminares detectaron proteínas de virus familia Closteroviridae similares a los virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y virus del enrollamiento de la vid (GLRaVs) en hojas de algarrobo (Investigación y Capacitación en Biotecnología Molecular [INCABIOTEC], 2020).

Juárez-Noé y Gonzáles-Coronado (2020) reporta 189 especies, 175 géneros, 84 familias y 12 órdenes de insectos. Coleóptera con 69 especies, Himenóptera con

36 especies, Coccinellidae y Formicidae con 11 y 10 especies, respectivamente. Del total de especies registradas, 68 son fitófagos y el insecto plaga más emblemático es el díptero *Enallodiplosis discordis* que afecta el follaje

El hongo *Hypoxylon diatrypeoides* causa la muerte regresiva y resinosis del algarrobo en Zapotitlán, Puebla, México (De la Torre-Almaráz et al., 2009).

En condiciones de invernadero, *Lasiodiplodia* y *Pestalotiopsis* se reportan como agentes causales del cancro y muerte regresiva que empieza en los cortes de poda en plantas jóvenes de algarrobo (Lesney y Felker, 1995).

El diagnóstico sintomático puede ser erróneo por confusiones asociadas con síntomas debido a interacciones entre el huésped y el virus o al estrés abiótico; por lo que, se requieren plataformas de diagnóstico fiables y de aceptación oficial (Joo-jin et al., 2014).

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar por secuenciamiento de próxima generación la presencia de Closterovirus relacionadas con el síndrome del decaimiento y muerte de *Neltuma* spp. Los objetivos específicos fueron: describir la sintomatología, realizar la extracción de ARN total del cambium y hojas del algarrobo, analizar el secuenciamiento del ARN mediante la técnica de próxima generación (NGS) de secuenciación masiva illumina la presencia de Closterovirus u otros virus relacionados, analizar el secuenciamiento del ADNc realizado mediante la técnica de secuenciación de Sanger o de terminación en cadena y realizar el indexado de árboles de algarrobo fuente en plantas indicadoras de algarrobo. Se pretende ganar conocimientos sobre virus asociados a esta enfermedad que serían las bases para establecer estrategias de manejo integrado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. El algarrobo

1.1 Taxonomía e identificación

Según Burkat (1976), el algarrobo pálido, huarango pertenece al reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Fabales, familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae, tribu Mimoseae, Género *Prosopis*, especie *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth., considerándolo un género muy heterogéneo y dividiéndolo en las secciones Algarobia, Strombocarpa y *Prosopis* (sensu stricto), ubica a *P. pallida* en la sección Algarobia. Koenen et al. (2020) analizaron 997 genes nucleares y demostraron que solo 69 árboles de genes apoyan la relación tradicional de grupo hermano, mientras que 629 árboles entran en conflicto con esa topología, por lo que consideraron a *Prosopis* como polifilético, rescatando los géneros *Anonychium*, *Neltuma* y *Strombocarpa*, sus miembros provienen de diferentes linajes evolutivos. Hughes et al. (2022) han realizado una reasignación taxonómica fundamental y lo han reclasificado dentro del género *Neltuma*, bajo el nombre científico *Neltuma pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Hughes & Lewis (subfamilia Caesalpinioideae), nueva categorización que, no solo responde a su herencia genética, sino que también se apoya en características morfológicas distintivas, como la presencia de espinas axilares, ya sean solitarias o emparejadas, que facilitan su identificación frente a otros géneros segregados.

1.2 Sinonimia

En Perú se denomina “algarrobo” o algarrobo pálido, algarrobo blanco, “Huarango” (FAO, s. f.), “Guarango. “Mesquite” en México y “Tamarugo” en el norte de Chile (Cardich, 1977).

1.3 Distribución geográfica

Pasiecznik et al. (2001) han dividido los algarrobos de zonas áridas y semiáridas en cinco regiones: Asia, África, Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica. Las especies nativas de Asia de la Sección *Prosopis* son: *P. cineraria*, *P. farcta* y *P. koelziana*, nativas del Medioeste. La especie nativa de África *P. africana*, es única de la Sección *Anonychium*. Las 40 especies restantes de las secciones *Strombocarpa*, *Monilicarpa* y *Algarobia*, son nativas de tres áreas geográficas de América: i) Norte de México y USA, ii) Argentina y países vecinos, iii) una zona central intermedia poblada principalmente por *P. juliflora* y *P. pallida*, en el norte, centro y Sudamérica y El Caribe.

1.4 Genética

Hunziker et al. (1995) estudiando el número de cromosomas y la formación de híbridos naturales de *Prosopis*, lo establecieron como un género con alta similitud genética que permite la hibridación, a menudo diploide ($2n=28$) pero con instancias de poliploidía, destacan la especiación en curso y los desafíos en su clasificación. Caycho (2023) secuenciando el ADN por la metodología

illumina ensambló el genoma cloroplastidial de *N. pallida*, evidenciando un genoma de 162381 pb con un contenido GC% de 35.97%, por un total de 132 genes: 85 codificantes de proteínas, 8 codificantes de ARNr y 39 codificantes de ARNt. Además, demostró que 19 de estos genes son duplicados y 18 genes presentan al menos un intrón. Finalmente, encontró diferentes tipos de secuencias repetitivas, siendo las más abundantes las repeticiones en tándem ($n = 306$) e identificó 250 secuencias repetitivas directas, 240 secuencias invertidas y 33 de palíndromos.

1.5 Especies en el Perú

Según Mostacero et al. (2009), las principales especies de *Neltuma* reportadas en el Perú son; i) *N. peruviana* (L. Vásquez, Escurra & Huamán) C.E. Hughes & G.P. Lewis, comb. nov., con material tipo de Apurímac, provincia de Andahuaylas, distrito de Sapichaca, ii) *N. pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) C.E. Hughes & G.P. Lewis, comb. nov., con material tipo de Perú, prov. Jaén de Bracamoros, paso de Matara, “in América meridionali”, iii) *N. piurensis* (L.

Vásquez, Ecurra & Huamán) C.E. Hughes & G.P. Lewis, comb. nov. Con material tipo de Perú, Piura, prov. Sullana, borde de carretera panamericana cerca al puente del río Chira, iv) *N. limensis* (Benth.) C.E. Hughes & G.P. Lewis, comb. nov., con material tipo de Perú, Lima.

Ayabu et al. (2015) y Shackleton et al. (2014) mencionan que muchas especies de *Neltuma* son conocidas como invasoras y se pueden encontrar en África y Asia, haciendo recomendaciones para su manejo sustentable y control. Cardich (1997) menciona que *N. pallida* es originaria de América y en el Perú se encuentra en el bosque seco costero de los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Piura y Tumbes.

Ramón Ferreyra (como se citó en Cairati, 2013) afirma que, en la región andina, y en particular en Perú, es posible identificar tres especies de *Neltuma*: *pallida*, *juliflora* y *affinis*, predominando *pallida* en la costa norte, presente en cuatro formas: *pallida*, *annularis*, *armata* y *decumbens*. Según Cardich (1997), la forma *annularis* se conoce como “algarrobo cachito” por sus frutos anillados, la *decumbens* llamado “algarrobo achaparrado” y la forma *affinis* “algarrobo pava” tiene frutos morados, presente desde el Norte de Argentina hasta la franja de la Costa Norte peruana, la forma *pallida* sería la más difundida y típica de la Costa Norte de Perú.

1.6 Morfología

Los algarrobos son árboles xerófilos siempre verdes que miden entre 8 - 18 - 20 m de altura. Sus ramas son gruesas, alternas, ascendentes y extendidas que se bifurcan entre 10-150 cm sobre el suelo; hojas compuestas bipinnadas oblongas y pequeñas de color verde con pocos pares de pinnulas opuestas; con espinas axilares de hasta 4 cm de largo; flores pequeñas verde amarillentas, pubescentes pentámeras, hermafroditas, cáliz campanulado, corola con pétalos lineales fusionados o más o menos libres, que forman una inflorescencia o espiga cilíndrica; frutos son vainas rectas con mesocarpio carnoso, pulpa dulce y fibrosa hasta con 30 semillas y entre 10 y 25 cm de largo; semillas ovoides comprimidas, con pleurograma en las caras, duras, con endospermo mucilaginoso, con cotiledones planos, redondeados y epigeos (Burkart, 1976; Skolmen, 1990; Perú Ecológico, 2009; Dostert et al., 2012).

1.7 Ecología y usos

Predomina en el bosque tropical seco costero con precipitaciones que van de 300 a 500 mm, resiste a estaciones secas hasta 10 meses de sequía, temperaturas superiores a 25° C y humedad relativa entre 60-70%. adaptable a suelos pobres, que mejora el ecosistema y fertilidad del suelo fijando nitrógeno atmosférico con bacterias del género *Rhizobium*, crea microclimas con su sombra y humedad (Aguilera, 2014).

Importante como alimento, ayuda a la protección de los recursos naturales frente a los UV, es fuente de alimento de insectos y aves, regula las temperaturas; es un recurso de gran importancia económica y ecológica para los pobladores y es considerada de usos múltiples (Mostacero León, 2011). Su uso como combustible para la cocina, leña o carbón y el gran valor nutritivo de sus frutos no solo para alimentación animal sino para alimentación humana, forraje y la industrialización para la obtención de algarrobina, alcohol de algarrobo, taninos y productos medicinales (Díaz, 1995). Su madera se utiliza como material de construcción (Depenthal & Meitzner, 2017). Es de gran importancia ecológica para el mantenimiento de su hábitat, provee de una barrera física que evita la erosión del suelo causada por el aire (Okin & Gillette, 2001), mantiene el ambiente adecuado para la vida al regular la temperatura y humedad (Berry et al., 2013); aporta fertilidad al suelo a través de la materia orgánica de sus hojas (Salazar et al., 2021) y es esencial para los animales del bosque seco (Cruzado et al., 2019).

2. Enfermedades del algarrobo

2.1 Hongos y pseudohongos

Srivastava y Mishra (1998) observaron en la India la “pudrición” de la raíz por *Fusarium* spp. en plantas jóvenes de *P. juliflora* y la pudrición del collar por *Macrophomina phaseolina*; en árboles más viejos observaron *Colletotrichum capsici* en hojas y reportan un cancro del tallo por *Botryodiplodia theobromae*. Lesney y Felker (1995) reportan *Lasiodiplodia* sp. y *Pestalotiopsis* sp. causando canchros y la muerte regresiva de las puntas de *P. glandulosa* en los EE. UU.

El Ministerio de agricultura [MINAGRI]. (2015), reporta haber aislado de los bosques de algarrobo de Lambayeque, Piura y Tumbes a los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* de canchales circulares en ramas delgadas, *Lasiodiplodia theobromae* asociado a muerte regresiva, *Sphaeropsis* sp. en ramas asociado a varios síntomas; afirma que los síntomas observados podrían tratarse de agentes abióticos u otros agentes dañinos como insectos.

Llontop (2013) afirma que el cambio climático ha impactado en la declinación del algarrobo, siendo la sequía la causa principal de la muerte de árboles jóvenes; la variación climática ha favorecido el desarrollo de agentes biológicos dañinos al algarrobo; propuso a los hongos *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria alternata*, *Fusarium roseum*, *Fusicoccum* spp. asociados al declinamiento y muerte de árboles. También, reporta al basidiomiceto *Ganoderma applanatum* y la planta parásita suelta con suelta (*Psittacanthus* spp.) afectando el algarrobo.

En Ica – Perú, Álvarez et al. (2007) reportan a *Phytophthora syringae* causando lesiones en la corteza y cancro sangrante en tallos y ramas de árboles de *Prosopis pallida* en los parques de Ica y que los árboles severamente afectados murieron por la enfermedad.

2.2 Virus

2.2.1 Concepto

Los virus fitopatógenos son parásitos obligados sin metabolismo propio, capaces de replicarse solo en células vegetales. Su material genético, de ADN o ARN, está protegido por una cápside proteica y, en algunos casos, por una envoltura lipídica (Agrios, 2005; Gergerich et al., 2006).

2.2.2 Material genético

En plantas predominan los virus de ARN de cadena simple: los de sentido positivo funcionan como ARNm, mientras que los de sentido negativo requieren transcripción previa. También existen virus con ARN de doble cadena y genomas de ADN simple o doble, aunque estos son menos comunes en vegetales (Agrios, 2005; Hull, 2014).

2.2.3 Ingreso y transmisión

No matan a la célula vegetal, ingresan por heridas y vectores (insectos, nematodos, hongos), herramientas, semilla, propagación vegetativa y polen, tienen dos formas estructurales básicas: icosaédricas y helicoidales (Dal Bó, 2020).

2.2.4 Familia Closteroviridae

Los virus de esta familia poseen genomas de ARN monocatenario o de hebra simple (ARNss), de sentido positivo, mono – bi - o tripartitos, con longitudes entre 13 y 19 kb. Son partículas filamentosas no envueltas, y pueden medir entre 650 y 2200 nm de largo por 12 nm de diámetro. Infectan de manera semipersistente (Fuchs et al., 2020) mediante pulgones, moscas blancas y cochinillas plantas dicotiledóneas, muchas de ellas frutales. Incluye los géneros Ampelovirus, Closterovirus, Crinivirus y Velarivirus (Dolja et al., 2020).

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV), perteneciente al género Closterovirus, presenta partículas filamentosas de aproximadamente 2000 nm de longitud y 12 nm de diámetro, y un genoma de ARNss (cadena simple) positivo de cerca de 20 kb con 12 ORFs. Es considerado la virosis más destructiva para la citricultura mundial, responsable de la muerte de millones de árboles y de severas pérdidas económicas (Bar-Joseph et al., 1979; Verano & Sánchez, 2024).

2.2.5 Diagnóstico de virus por técnicas moleculares

Los métodos clásicos para el diagnóstico de virus y viroides fitopatógenos han sido específicos (serológicos/moleculares específicos) y no específicos (plantas de prueba indicadoras, indexado y microscopía electrónica). Los primeros dirigidos a una o pocas especies virales, necesitan un conocimiento a priori de los patógenos que se están probando; los no específicos no requieren un conocimiento específico de los patógenos; pero con frecuencia sólo clasifican los virus a nivel de género basándose en los caracteres físicos/biológicos compartidos (Pecman et al., 2017). Entre las técnicas moleculares, la PCR multiplex se utiliza cada vez más para la detección rápida, específica y sensible de virus porque mejora la eficiencia de la PCR, probablemente se adaptará para la detección simultánea de virus de un cultivo en particular (López et al., 2003).

a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. Basada en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. La enzima más importante en la replicación es el ADN polimerasa, encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Serrato et al, 2014).

b) La transcripción inversa (RT)

La transcripción inversa o retrotranscripción es la síntesis de una molécula de ADN a partir de una hebra de ARN plantilla, catalizada por la enzima retrotranscriptasa o invertasa, característica de los retrovirus, mediante la adición de desoxirribonucleótidos de uno en uno en el extremo 3' de la cadena de ADN naciente y, luego permite análisis posteriores (Southern blot, PCR, NGS) (Saladrigas y Claros, 2002).

2.2.6 Diagnóstico de virus por secuenciación de bajo rendimiento o método de Sanger

Consistió en la mezcla de reacción conteniendo el ADNss, un primer, ADN polimerasa y los cuatro dNTPs marcados radiactivamente con radioisótopos, lo que permitía visualizar las bandas resultantes por autorradiografía (Sanger et al., 1997). Con el desarrollo de la tecnología, se reemplazó por sistemas basados en fluorocromos, en los que cada ddNTP está marcado con un color diferente, permitiendo la lectura automatizada mediante detectores ópticos (Smith et al., 1986). Se divide en cuatro reacciones y se añade uno de los ddNTPs: ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP, a cada reacción. Una vez que el ADN polimerasa incorpora los ddNTPs se detiene la extensión de la cadena de ADN, generándose fragmentos de diferentes tamaños, añadidos en el extremo 5' por el primer y en el extremo 3' por ddNTP o terminador, específicos para esta reacción. Con un equilibrio adecuado entre los dNTP y los ddNTP, se obtiene un conjunto de fragmentos de diferentes tamaños que terminan en todos los nucleótidos de la molécula complementaria a la secuencia de ADN que se necesita seguir, se obtiene un patrón de bandas al separar los fragmentos por

electroforesis capilar y continuando con la secuencia. El orden de los nucleótidos en la molécula de ADN se logra por la velocidad de migración de los fragmentos. (Ongay-Larios y Códiz, 2021; Valderrama et al., 2020).

2.2.7 Diagnóstico de virus por secuenciación masiva de nueva generación (NGS) y secuenciación de alto rendimiento (HTS)

Ambas se refieren esencialmente a un conjunto de tecnologías que permiten hacer ómicas, secuencian millones de fragmentos de ADN o ARN en paralelo, de forma masiva, mucho más rápida y económica que el método tradicional que Sanger. El descubrimiento de nuevos virus/viroides y nuevos huéspedes ha aumentado rápidamente después de la introducción de la secuenciación de próxima generación (NGS). Las tecnologías NGS aportan un enfoque genérico no específico para identificar virus, no requieren conocimiento previo sobre patógenos objetivos, pero pueden ofrecer resultados específicos especie/cepa (Adams & Fox, 2016).

A partir del 2009 se vienen utilizando las tecnologías NGS para detección de virus en plantas y (Adams et al., 2009; Al Rwahnih et al., 2009; Kreuze et al., 2009). Posteriormente, se han desarrollado diferentes métodos de preparación de muestras, basándose más comúnmente en diferentes entradas de ácidos nucleicos: ARN total (totRNA); ARN total empobrecido en ARN ribosómico (ARN tot empobrecido en ARNr); ARN bicatenario (ARNbc); ARN de interferencia pequeño (ARNs) derivado de virus; ARN de partículas virales purificadas o parcialmente purificadas; ARN poliadenilado (ARN poli A); y ARN tras hibridación sustractiva con ARN de plantas sanas (Roossinck et al., 2015; Wu et al., 2015; Adams & Fox, 2016).

La secuenciación genómica, determina el orden o secuencia de los nucleótidos de los genes del genoma del virus, componentes básicos de los ácidos nucleicos ARN o ADN. La mayoría de virus que infectan plantas constan del ARN de cadena simple a diferencia del ADN de cadena doble. Los genes del ARN de los virus están constituidos por cadenas de nucleótidos que están unidas entre sí y cifradas por las letras A, C, G y U.

La cuantificación de las partículas virales permite asociar la intensidad del síntoma con la acumulación de variantes del virus (Solano-Luna et al., 2018).

a. Tecnología ARNseq

Herramienta transcriptómica de secuenciación de ADNc basada en los desarrollos NGS. El ARN total o ARNm, capturado se fragmenta y convierte en una librería de ADNc. Según Wang et al. (2009), la fragmentación del ARN o del ADNc que mayormente se hace posteriormente a su síntesis, se realiza o bien por nebulización, por digestión con enzimas de restricción o a través del uso de cationes divalentes bajo condiciones de presiones elevadas. Los adaptadores de secuencias conocidas que se ligan en los extremos 3' y 5' de cada fragmento de ADNc, son necesarios para su secuenciación. La cantidad del ARNm que se requiere es entre 5 y 10 µg, con una concentración alrededor de 500 ng/µL. Esta tecnología da una cobertura completa de transcritos y los datos que arroja son de una alta precisión con respecto a los niveles de expresión génica que se obtienen a través de la qPCR (Nagalakshmi et al., 2008; Wang et al., 2009; Ward et al., 2012].

a.1 Plataforma illumina

La secuenciación por síntesis de Solexa/Illumina se basa en la amplificación en puente y el uso de nucleótidos terminadores reversibles marcados con fluoróforos descritos en estudios fundamentales sobre tecnologías de secuenciación y ARN-seq (Wang et al., 2009; Metzker, 2010; Garber et al., 2011; Egan et al., 2012).

El proceso inicia con la preparación de la muestra, donde se añaden a los fragmentos de ADN o ADNc unas secuencias específicas denominadas adaptadores. Durante una amplificación por PCR de ciclo reducido, se incorporan motivos adicionales, como los sitios de unión del cebador de secuenciación, los índices (barcodes) y las regiones complementarias a los oligos inmovilizados en la flow cell. (Bentley et al., 2008).

El siguiente paso es la generación de clusters. Los fragmentos con adaptadores se introducen en la flow cell, donde se desnaturalizan (cuando provienen de ADNc) y los adaptadores se hibridan con los oligonucleótidos fijados a la

superficie sólida, que actúan como cebadores en orientación forward o reverse. Esto permite la formación de puentes que facilitan la amplificación isotérmica. Cada ciclo de desnaturalización y amplificación genera múltiples copias del fragmento original, produciendo millones de clusters clonales. Una vez amplificados, los productos se desnaturalizan nuevamente, dejando las plantillas listas para iniciar la síntesis. (Bentley et al., 2008; Metzker, 2010).

El tercer paso corresponde a la secuenciación propiamente dicha. La extensión del primer cebador genera la primera lectura (Read 1). Los nucleótidos fluorescentes compiten por su incorporación y, en cada ciclo, se añade un solo nucleótido determinado por la secuencia molde. Tras cada incorporación, los clusters se excitan mediante una fuente de luz y emiten una señal fluorescente característica. La llamada de bases se realiza en función de la longitud de onda y la intensidad de la emisión. El número total de ciclos define la longitud de la lectura, y millones de clusters se secuencian simultáneamente en un proceso masivamente paralelo (Ju et al., 2006; Guo et al., 2008; Metzker, 2010).

Finalizada la primera lectura, el producto se elimina por lavado y se hibrida el cebador para la lectura del índice 1 (Index 1), que se genera de manera análoga. Luego se lava nuevamente la superficie y se desprotegen los extremos de la plantilla para permitir su plegamiento y exposición del segundo oligo. A continuación, se obtiene la lectura del índice 2 (Index 2). Posteriormente, la polimerasa extiende el segundo oligo formando un puente bicatenario, el cual se linealiza y se bloquean sus extremos. La cadena forward original se escinde, dejando disponible la cadena reverse (Bentley et al., 2008).

Finalmente, se hibrida el cebador correspondiente para la segunda lectura (Read 2) y la secuenciación continúa con el mismo principio que en Read 1. Tras completar esta fase, el producto de la lectura se elimina por lavado. Todo este proceso genera millones de lecturas que representan los fragmentos de la biblioteca, y las secuencias de cada muestra se separan posteriormente en función de sus índices (Metzker, 2010).

Cada flow cell de Illumina contiene ocho carriles o lanes y cada uno de ellos actualmente tiene un rendimiento de 150 millones de lecturas o reads. La longitud de lecturas generadas es del rango de 50-100 nucleótidos, que pueden

ser lecturas sencillas desde un solo extremo, SE (del inglés single end sequencing reads) o bien lecturas desde ambos extremos PE (del inglés pair end sequencing reads) (Wang et al., 2009; & Garber et al., 2011). Aunque las longitudes son relativamente cortas, el alto número de lecturas generadas incrementa la cobertura y permite en muchos casos extender la secuencia hasta poder, en algunos casos, reconstruir transcritos completos o ensamblajes altamente precisos (Wang et al., 2009; Garber et al., 2011). La multiplexación de varias bibliotecas en un mismo carril disminuye proporcionalmente el número de lecturas por muestra, ya que la capacidad total de secuenciación se reparte entre todas las bibliotecas cargadas (Quail et al., 2012; Illumina, 2025a). Debido a esta alta profundidad, las plataformas Illumina son ampliamente utilizadas tanto para transcriptómica como para estudios metataxonómicos basados en marcadores como 16S e ITS, y también para ensamblaje de genomas a partir de fragmentos cortos (Caporaso et al., 2011).

2.2.8 Diagnóstico de virus por proteómica

Las ómicas son disciplinas biológicas, campos de estudio o estrategias analíticas, que estudian de manera global conjuntos completos de moléculas en un organismo, analizando la interacción planta-microbioma. Usan los datos generados por plataformas de secuenciación de nueva generación NGS/HTS (Hassin et al., 2017).

La proteómica en el diagnóstico de virus en plantas se define como el estudio a gran escala del conjunto total de proteínas expresadas por la planta huésped y/o por el virus durante la infección, con el fin de identificar proteínas virales, cambios en la expresión proteica del hospedero, y biomarcadores asociados a la patogénesis viral. Mediante técnicas como la electroforesis bidimensional (2-DE), la espectrometría de masas (MS) y el análisis proteómico dirigido, permite detectar partículas virales, proteínas estructurales, y respuestas de defensa del hospedero, contribuyendo al diagnóstico temprano y a la comprensión de los mecanismos de infección. La proteómica complementa otras ómicas al proporcionar evidencia funcional directa de la presencia y actividad de virus en tejidos vegetales (Lee et al., 2006; Mehta et al., 2008; Silva et al., 2016; Roy et al., 2023).

2.2.9 Indexado biológico

Es una técnica experimental que detecta virus en material vegetal mediante la inoculación de tejido sospechoso en plantas indicadoras susceptibles bajo condiciones controladas. Si el virus está presente, las plantas indicadoras desarrollan síntomas característicos de la infección, confirmando la presencia del virus. Selecciona y valida plantas libres de virus, caso CTV para programas de saneamiento y producción de material de propagación sano. Requiere ambiente controlado y puede tomar semanas a meses según el patógeno (Food and Agriculture Organization & International Plant Protection Convention [FAO/IPPC], 2014).

La técnica del indexado se utiliza para la detección de los principales patógenos transmisibles por injerto en cítricos (CGTPs) y sus enfermedades asociadas. Su objetivo es eliminar estos patógenos de los brotes propagativos y establecer y mantener árboles y viveros libres de enfermedades para producir plantaciones de cítricos saludables y de alto rendimiento. Un buen programa de indexación para identificar los agentes causales de enfermedades transmisibles busca prevenir la propagación de miles o millones de árboles contaminados con patógenos mediante la propagación de yemas infectadas (Roistacher, 1991).

a) Principales enfermedades transmisibles por injerto

Las que provocan pérdidas graves y se transmiten por vectores: tristeza, enverdecimiento y la enfermedad persistente de los cítricos. Las que inducen pérdidas moderadas se transmiten mecánicamente, por yemas o vectores o por medios desconocidos: exocortis, caquexia, enanismo de la satsuma, hoja deshilachada, variegación infecciosa y psoriasis en anillos. Las enfermedades que se pueden controlar fácilmente mediante el uso de yemas libres de virus son principalmente las transmitidas a través de las yemas: la familia de la psoriasis-A y la familia del patrón de la hoja de roble, que incluye la goma cóncava, la impietratura y la cristacortis. Enfermedades transmitidas por vectores, pero de menor impacto económico: enación de las nervaduras. Enfermedades diversas y de etiología desconocida: corteza gomosa y uniones anormales de yemas (Roistacher, 1991).

b) Técnicas complementarias para identificación de CGTPs

El cultivo Celular para el crecimiento e infección de virus en células vivas, si se observan efectos citopáticos que indican la presencia de un virus, puede adaptarse para la detección de virus en plantas (Freshney, 2010).

La PCR, técnica molecular que permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN viral (Mullis & Faloona, 1987).

Secuenciación Genómica, para obtener el genoma completo del virus, ayuda a su identificación y a estudiar su variabilidad genética (Meltzker, 2010).

Inmunofluorescencia, utiliza anticuerpos marcados con fluorocromos para detectar antígenos virales en células infectadas, permite la visualización directa del virus (Cann, 2005).

Western Blot, detecta proteínas virales en muestras, pudiendo ayudar a confirmar la presencia de un virus específico (Towbin et al., 1979). Microarrays, detección simultánea de múltiples virus mediante la hibridación de ácidos nucleicos, lo que es útil para estudios de vigilancia epidemiológica (Agindotan & Perry, 2007).

Espectrometría de masas, para identificar proteínas virales y sus modificaciones, proporcionando información sobre la composición del virus (Chalmers & Gaskel, 2000).

Detección de anticuerpos específicos en suero puede indicar una infección previa y ayudar a identificar el virus responsable (Salazar, 1990).

c) Instalaciones, métodos y consideraciones

El indexado biológico requiere instalaciones adecuadas para el cultivo de plantas y la manipulación de virus, incluye: invernaderos, laboratorios de biología molecular y áreas de cultivo controladas. Deben cumplir con normas de bioseguridad para prevenir la contaminación y la propagación de virus (Calderón et al., 2023).

Los métodos de indexado incluyen uso de plantas indicadores susceptibles a ciertos virus que se inoculan con muestras sospechosas, y se observa si desarrollan síntomas característicos de infección viral (Roistacher, 1991).

Es importante considerar factores como la selección de plantas indicadores, el manejo de muestras, control de condiciones ambientales, regulaciones y normativas locales sobre el manejo de virus y la bioseguridad.

d) Procedimientos de inoculación para la detección de CGTP

El tejido inóculo son los esquejes, corteza y hojas. No se deben recolectar durante climas excesivamente calurosos, por el riesgo de que algunos CGTP pueden inactivarse temporalmente, esperar que bajen las temperaturas. Utilizar hielera para almacenarlos durante la recolección. Desinfestar las tijeras de poda de un árbol a otro con NaClO al 1 %, colocar la corteza en pequeños tubos de plástico no sellados, introducirlos en bolsas de polietileno y guardarlos inmediatamente en una hielera. Etiquetarlos y colocarlos en un refrigerador a 5-6 °C, evitando congelarlo y utilizarlos lo antes posible. Los esquejes se conservan y propagan en el invernadero, convirtiéndose en la planta primaria, y se pueden tomar esquejes de esta planta para la indexación inicial (Roistacher, 1991).

e) Métodos de inoculación

El método más utilizado es la inoculación de yema-injerto que incluye yemas con ojos, fragmentos de tallo sin ojos y yemas en astilla (Scholthof et al., 2011), la propagación vegetativa o reproducción asexual (Sastry, 2013).

Otras técnicas de inoculación, incluyen injertos laterales, injertos de aproximación, injertos de raíz, injertos de fruto, injertos de fragmento foliar o injertos de disco foliar (Hartmann et al., 2011).

La transmisión mecánica en cítricos mediante cortes repetidos con cuchilla en el tallo receptor, seguida del envolvimiento con cinta de injerto, es un método estándar para transferir inóculo desde plantas infectadas a plantas susceptibles (Garnsey et al., 1993).

En general, se prefieren las plántulas como plantas receptoras o indicadoras.

Otros tejidos y técnicas, como injertos de hojas, corteza, raíces o laterales, deben probarse continuamente para encontrar la forma más eficaz de maximizar la expresión de los síntomas para cualquier diagnóstico inicial de enfermedades nuevas o de etiología desconocida (Rostaicher, 1991).

f) Temperatura de mantenimiento y tiempo de la primera aparición de síntomas

Para la detección de tristeza que se transmite por injerto al indicador limón mexicano, se permite el desarrollo de todos los brotes durante las tres primeras oleadas de crecimiento; luego se poda y guía como un solo brote. 24-27 °C es la temperatura de mantenimiento, 18-21 °C mínima.

Los primeros síntomas aparecen 3 a 5 semanas, al final de la primera o segunda oleada de crecimiento.

Los síntomas son aclaramiento de nervaduras, oscurecimiento de nervaduras, ahuecamiento de hojas y picaduras en el tallo. Acorchamiento de las nervaduras en los aislamientos más severos (Rostaicher, 1991).

3. Glosario de términos básicos

3.1 Biblioteca

Representación de todo el conjunto de ADN genómico o ADN Cc a los ARN. Es la colección de fragmentos de ADN en la que se espera esté incluido el mayor número posible de secuencias de un genoma o las secuencias contenidas en un cromosoma (Alberts et al., 1994).

3.2 Bioinformática

Ciencia que surge de la necesidad de interpretar la información contenida en las secuencias de ADN, ARN y proteínas. Desarrolla algoritmos para catalogar secuencias, analizar similitud entre ellas y descubrir sus propiedades estructurales y funcionales y es de naturaleza interdisciplinaria (Martínez Barnetche, 2007).

3.3 Carga viral

Llamada también carga vírica, es la cuantificación de virus en diferentes tejidos de la planta, basado en el número estimado de copias de ácidos nucleicos (ADN o ARN genómico) (Solano-Luna et al., 2018).

3.4 Enfermedad

Resultado de complejas interacciones entre una planta hospedante con un agente causal primario, moduladas por el medio ambiente (Jiménez, 2017).

3.5 Enfermedades emergentes y re-emergentes

Enfermedades emergentes son aquéllas cuya incidencia y gravedad han aumentado recientemente, asociadas con patógenos que infectan nuevos cultivos. Las enfermedades re-emergentes son causadas por patógenos conocidos que eran controlados eficientemente. Cambios en las tecnologías de producción y variaciones medioambientales determinan que causen de nuevo epidemias devastadoras (Fisher et al., 2012; Giraud et al., 2010).

3.6 Enfermedades complejas

Son de compleja evolución y en las que interviene más de un patógeno, pudiendo producirse interacciones sinérgicas entre virus, bacterias, hongos y diferentes grupos de patógenos, por lo que su diagnóstico y control son complicados (Nazarov et al., 2020).

3.7 Infección

Presencia y multiplicación de un microorganismo en los tejidos del huésped. Representa la interacción del patógeno y sus factores de virulencia con el huésped. La enfermedad infecciosa es la expresión del proceso infeccioso, traduciendo en signos y síntomas del daño causado (García et al., 2010).

3.8 Patógeno

Organismo causante de enfermedad en plantas que le brindan condiciones para que cumpla su ciclo de vida y de condiciones ambientales que propicien su establecimiento y sobrevivencia en el agro ecosistema (Agrios, 2005).

3.9 Patogenicidad

Habilidad del parásito para interferir con uno o más de las funciones esenciales de la planta, causando así enfermedades (Agrios, 2005).

3.10 RNAlater Solution

Reactivo acuoso y no tóxico que penetra rápidamente en los tejidos para estabilizar, proteger y almacenar el ARN celular, minimizando la necesidad de procesar inmediatamente las muestras de tejido o de congelarlas en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento (Fisher Scientific, s. f.).

3.11 Severidad

Área de tejido de la planta enferma estimada o medida y expresada como área total o proporción o porcentaje de tejido con síntomas (Castaño, 2017).

3.12 Transcriptoma

Conjunto de moléculas de ARNm y de ARN no codificante presente en una célula o tejido. Inicialmente se usaban técnicas de bajo rendimiento, como Northern-blot, hibridación in situ y RT-PCR; luego, aparecieron los microarrays caracterizando niveles de expresión de miles de transcritos simultáneamente; posteriormente, la RT-qPCR y recientemente, la secuenciación de nueva generación (NGs) del ADN y de ARN presentes en una muestra y, por tanto, del transcriptoma completo (Gironella, 2010).

3.13 k-mero

Secuencia de longitud k de caracteres en una cadena de nucleótidos utilizada en informática para el análisis de ADN, ARN o proteínas. Para obtener todos los k-meros de una secuencia, se necesitan los primeros k caracteres y mover sucesivamente solo un carácter para el inicio del siguiente k-mero, creando subsecuencias que se superponen en k-1 posiciones (Clavijo, 2018).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Zonas de estudio, periodo de ejecución y toma de muestras

1.1 Zonas de estudio

La fase de campo de comprendió las observaciones de síntomas y toma de muestras se realizó en los bosques de *N. pallida* de la Comunidad Campesina Ignacio Távara Pasapera – Chulucanas - Morropón, Piura y en el bosque seco de la Universidad de Piura (UDEP), la fase de tinglado en la UDEP, la fase de laboratorio en la empresa IncaBiotec -Tumbes. (Fig. 01).

1.2 Periodo de ejecución

Desde diciembre del año 2023 y concluyó el mes de mayo del año 2025.

1.3 Toma de muestras

Los puntos de muestreo fueron los bosques de algarrobo de la Comunidad Campesina Ignacio Távara – Chulucanas y de la Universidad de Piura (ver Tabla 2).

En cada árbol estudiado, se tomaron muestras de cambium (Ver Fig. 2) en el tronco a 1,20 m de altura y hojas de ramillas terminales solo en algunos árboles. Para la toma de muestras de cambium, primero se limpió bien la corteza tratando de ahuyentar las hormigas, se asperjó alcohol etílico sobre la corteza, con un cuchillo machete flameado a la llama se levantó la zona de la corteza (4-6 cm x 8-10 cm) hasta dejar expuesto el cambium (Figura 2a), con un bisturí se extrajeron segmentos longitudinales de cambium (Figuras 2b-c), que se introdujeron con una pinza a tubos Eppendorf (Figura 2d) y se guardaron en cajas tecnopor con hielo gel pack (Figura 2e).

Se levantó la corteza de la zona de la herida y se pegó con pasta cicatrizante al cambium (Figura 2f). También, se obtuvieron muestras de brotes

Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio de Biotecnología IncaBiotec – Tumbes, donde se mantuvieron a - 80 °C antes de su procesado.

Figura 1. Zonas de estudio de *N. pallida*



(<https://earth.google>)

2. Síntomas y grados de severidad de la enfermedad

Los síntomas de la enfermedad se describieron en base a observaciones hechas en tronco, ramas y ramillas de árboles sanos y enfermos en los diferentes puntos de muestreo.

De acuerdo a la Tabla 1 propuesta por Mormontoy (2015), se establecieron los niveles de decaimiento de los árboles en diferentes grados de severidad en base a observaciones del follaje.

Tabla 1.

Grados de severidad del síndrome de mortandad de *N. pallida*

| Severidad de daño Grados | Magnitud del daño |
|--------------------------|---|
| 0 | Hojas completamente sanas (SA) |
| 1 | Hojas con amarillamiento y caída de folíolos del 1 al 20% |
| 2 | Hojas con amarillamiento y caída de folíolos del 21 al 30% |
| 3 | Hojas con amarillamiento y caída de folíolos del 31 al 50% |
| 4 | Hojas con amarillamiento y caída de folíolos del 51 al 75% |
| 5 | Hojas con amarillamiento y caída de folíolos del 76 al 100% |

Tabla 2.

Puntos de muestreo

| Fecha de muestreo | Ubicación | Código de muestra | Órgano/Tejido | Zona y banda | Coordenadas UTM | | | Altura (m) | GS ⁵ |
|-------------------|--|---------------------|----------------|--------------|-----------------|---------|-----------------------|------------|-----------------|
| | | | | | Este | Norte | DAP ⁴ (cm) | | |
| 06-08-2024 | CC ¹ José Ignacio Távora (Km 41) – Chulucanas | PMA ³ 01 | C ⁶ | 17M | 0587440 | 9428908 | 10,50 | 4,0 | 0 |
| | | PMA 02 | C | 17M | 0587443 | 9428912 | 22,41 | 8,0 | 1 |
| | | PMA 03 | C | 17M | 0587429 | 9428903 | 25,78 | 8,5 | 2 |
| | | PMA 04 | C | 17M | 0587418 | 9428895 | 11,14 | 7,0 | 3 |
| | | PMA 05 | C | 17M | 0587533 | 9428778 | 26,73 | 9,0 | 4 |
| | | PMA 06 | C | 17M | 0587509 | 9428773 | 23,77 | 8,0 | 5 |
| | | PMA 07 | C | 17M | 0587285 | 9428840 | | 13,1 | 3 |
| | | PMA 08 | C | 17M | 0587212 | 9428865 | | 13,7 | 2 |
| | | PMA09 | C | 17M | 0587192 | 9428871 | | 13,5 | 1 |
| | | PMA10 | C | 17M | 0587117 | 9428536 | | 14,2 | 4 |
| 25-10-2024 | CC ¹ José Ignacio Távora (Km 41) – Chulucanas | PMA 11 | C | 17M | 0587440 | 9428908 | 10,50 | 4,0 | 0 |
| | | PMA 13 | C | 17M | 0587429 | 9428903 | 25,78 | 8,5 | 2 |
| | | PMA 14 | C | 17M | 0587418 | 9428895 | 11,14 | 7,0 | 3 |
| | | PMA 16 | C | 17M | 0587509 | 9428773 | | | 5 |
| | | PMA 17 | C | 17M | 0587422 | 9428899 | 24,00 | 5,5 | 1 |
| | | PMA 18 | C | 17M | 0587503 | 9428825 | 42,50 | 8,0 | 4 |
| | | PMA 19 | C | 17M | 0587469 | 9428856 | 42,70 | 9,0 | 5 |
| 23-11-2024 | Bosque seco UDEP ² -Piura | PMA 020 | C | 17M | 0539950 | 9428590 | 11,14 | 5,5 | |
| | | PMA 021 | C | 17M | 0539953 | 9428577 | 6,68 | 5,0 | 0 |
| | | PMA 022 | C/H | 17M | 0539934 | 9428494 | 10,51 | 5,5 | |
| | | PMA 023 | C | 17M | 0539890 | 9428651 | 14,96 | 8,5 | 2 |
| | | PMA 024 | C/H | 17M | 0539877 | 9428637 | 19,09 | 8,0 | 2 |
| | | PMA 025 | C | 17M | 0539882 | 9428627 | 14,64 | 7,5 | 2 |
| | | PMA 026 | C | 17M | 0539924 | 9428652 | 20,05 | 7,0 | |
| | | PMA 027 | C/H | 17M | 0539910 | 9428650 | 15,28 | 7,5 | 4 |
| | | PMA 028 | C | 17M | 0539935 | 9428659 | 16,87 | 7,5 | |

¹Comunidad Campesina Ignacio Távora algarrobo ⁴Diámetro a la altura del pecho

²Univeridad de Piura ⁵Grado de Severidad

³Proyecto Mortandad del ⁶Cambium

Figura 2. Toma de muestras de cambium



3. Extracción de ARN total

Se realizó mediante el protocolo WizPrep Plant RNA Mini kit, siguiendo las indicaciones del fabricante (Wizbiosolutions, 2021) (Figura 3).

Para la activación de buffer, se agregó 48 ml de etanol 100% a los 12 ml de concentrado del tampón RPW2. Previo a la lisis, se lavó con Agua Destilada Estéril (ADE) el material vegetal de cada muestra que consistió de cambium del tronco y tres muestras de hojas, se colocó en papel aluminio para la disección de aproximadamente 1 cm² y se introdujo por separado 100 mg de cambium y 50 mg de hojas de cada muestra en morteros de porcelana estéril. Las muestras se trituraron varias veces agregando nitrógeno líquido (Fig. 3a) a los morteros hasta que quedaron pulverizadas (Figura 3b), se transfirieron en microtubos Eppendorf de 1,5 ml, se les agregó 450 µL de buffer RPL1 más 4,5 µL de β-mercaptoetanol y se vortexearon vigorosamente (Figura 03c); 400 µL de estas

mezclas de lisado se transfirieron a columnas de filtrado y se centrifugaron por 1 min a 13 000 rpm y se descartaron las columnas de filtrado (Figura 3d).

Para la purificación del ARN, en cada microtubo se agregó 200 μ L de etanol para filtrado y se mezclaron pipeteando 5 veces (Figura 3e), se conectaron columnas de centrifugación a los tubos de recolección, se transfirieron las mezclas a las columnas de purificación (Figura 3f) y se centrifugaron por 30 s a 13 000 rpm, se desecharon los flujos y se volvió a acoplar la columna en el tubo de recolección (Figura 3g).

Para el lavado, se agregaron 700 μ L de Buffer RPW1 a las columnas de centrifugado (Figura 3h) y se centrifugaron a 13 000 rpm por 30 s, se desecharon los flujos y se reconectaron las columnas (Figura 3i), se agregó 500 μ L de Buffer RPW2 (etanol agregado) en el centro de las columnas (Figura 3j) y se centrifugaron a 13 000 rpm por 30 s, este paso se repitió pero con una centrifugación de 2 min, se desechó el flujo (Figura 3k), se volvió a conectar la columna (Figura 3l) y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min (Figura 3m).

Para la elución, se conectaron las columnas en nuevos tubos de 1,5 ml, se añadió 50 μ l de agua libre de ARNasa e incubó durante 3 min (Figura 3n), se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min, se desechó la columna de centrifugación (Figura 3ñ) y el ARN eluido purificado se almacenó a - 80 °C para utilizarlo en los siguientes pasos.

3.1 Concentración, pureza e integridad del ARN total

La concentración y pureza del ARN total se midió en el espectrofotómetro nanodrop/Photometer NP80 de Implen (Thermo Scientific, 2012; Thermo Scientific, 2016) (Figura 4a). Se pipeteó 2 μ L de volumen de las muestras de ARN eluido en el pedestal del espectrofotómetro y se inició la evaluación de la pureza del ARN mediante ratios de absorbancia A260/A280, A260/A230 y la concentración de ARN (ng/ μ L).

La integridad de las muestras se visualizó en un gel de agarosa al 1%, conectado al sistema electroforético Cleaver Scientific Ltd (Figura 4b). Se cargó 5 μ L del ARN stock y 2 μ L de buffer de carga junto con un marcador de peso molecular.

Figura 3. Extracción de ARN del algarrobo



Figura 4. Espectrofotómetro NanoDrop/Photometer (a), electroforesis (b)



3.2 Conservación del ARN para el envío a secuenciamiento

Los ARN totales extraídos fueron secados para mejorar su conservación y permitir el transporte a temperatura ambiente. Se añadieron concentraciones $\leq 20 \mu\text{g}$ de ARN en volúmenes de $20 \mu\text{L}$ y se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se mezclaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo suavemente 10 veces para solubilizar y mezclar con la matriz de los tubos GenTegra (GenTegra, 2017).

El sistema de secado consistió de un desecador de vidrio para vacío, una bomba de vacío, una trampa de vapor, una variedad de tubos y un pequeño baño de hielo.

Los tubos se introdujeron en el desecador para el proceso de secado en un tiempo de 2 h y se inspeccionó visualmente que estén completamente secos. Si aún quedaba líquido, se volvía a conectar por un tiempo adicional de media hora. Después del secado, los tubos se taparon y se guardaron a temperatura ambiente. Estos tubos conteniendo las muestras secadas fueron enviados al laboratorio Azenta - Alemania para obtención del transcriptoma por método de secuenciación de próxima generación - ARNseq en la plataforma illumina.

4. Secuenciamiento de ARN (RNA-seq) por Azenta

4.1 Concentración total y pureza de ácidos nucleicos

Azenta analizó las muestras con el espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000 midiéndoles su absorbancia UV para cuantificar las biomoléculas. Estimó la concentración total de ácidos nucleicos a partir de la absorbancia a 260 nm y calculó las relaciones A260/A280 y A260/A230 de las muestras para evaluar indirectamente la presencia de proteínas, fenoles o sales contaminantes. No distinguió entre ADN y ARN, no aportó la integridad del ARN, pureza real ni degradación (Bruijns et al., 2022).

4.2 Medición de la cantidad de ARN

Lo realizó a través del fluorómetro “ARN Qubit”, midiendo la concentración real de ARN (ng/μL) mediante fluorescencia de cuantificación usando colorantes fluorescentes altamente específicos que se unen selectivamente y emiten fluorescencia cuando se unen al ARN (Simbolo et al., 2013; Thermo Fisher Scientific, 2020).

4.3 Evaluación de calidad e integridad del ARN

Lo realizó mediante el sistema de electroforesis capilar Agilent TapeStation, que generó gráficos y calculó el número de integridad del ARN equivalente (RINe) para reflejar el grado de degradación del ARN. Determinó las métricas DV200 que permitieron estimar el grado de degradación y la distribución de tamaños de los fragmentos. Aportó una evaluación directa de la integridad y distribución de tamaños del ARN con una valoración confiable de la idoneidad del ARN para análisis de RNA-seq (Agilent Technologies, 2015; 2025).

4.4 Evaluación del tamaño y distribución de fragmentos

Lo realizó mediante electroforesis automatizada, obteniendo electroferogramas que permitieron visualizar perfiles de tamaño en función de la intensidad de señal y del tamaño modal de los fragmentos. Se visualizaron los picos ribosomales 28S y 18S del ARN, se estimaron las métricas de calidad como la proporción de fragmentos dentro de rangos específicos (por ejemplo, DV200), indicadores

clave de integridad y aseguraron que las muestras presenten una calidad y distribución adecuadas para la preparación de bibliotecas de secuenciación (Agilent Technologies, 2023; Walker et al., 2023).

4.5 Secuenciamiento

El ARNseq se realizó utilizando la tecnología illumina para detectar virus de manera no dirigida (Hadidi et al., 2016), secuenciando el ARN total para hacer una detección dual, analizando simultáneamente cómo responde el algarrobo (genes de defensa) y los genes virales de virus ARN episomales activos causando infección como los de la familia Closteroviridae: géneros Closterovirus (CTV y GLRaV-2), Ampelovirus (GLRaV-1) y Velarivirus (GLRaV-7) (Fuchs et al., 2020), o si son solo fragmentos antiguos integrados en el ADN de la planta (EVEs - Elementos Virales Endógenos) (Katzourakis & Gifford, 2010; Feschotte & Gilbert, 2012).

También, mediante análisis metagenómico del transcriptoma se buscaron virus de ADN de cadena simple (ssDNA) y doble (dsDNA) mediante la detección de sus transcritos de ARN (Greninger, 2018; Zhang et al., 2019).

4.6 Análisis bioinformático de las secuencias para la detección de virus

Seis bibliotecas de RNA-Seq correspondientes a tejidos de *N. pallida* (PMA06, PMA07, PMA08, PMA11, PMA16 y PMA17) se descargaron e importaron en el software CLC Genomics Workbench v25.0.1 para su procesamiento inicial.

Para homogenizar la profundidad entre muestras, cada biblioteca fue submuestreada a 25 millones de lecturas. Las secuencias se sometieron a filtrado de calidad y recorte de adaptadores Illumina empleando los parámetros por defecto del programa, y se hizo el ensamblaje de novo para obtener los contigs. Posteriormente, todos los contigs fueron analizados mediante BLASTX frente a una base de datos viral personalizada construida a partir de RefSeq Virus e incluyendo secuencias adicionales de virus relevantes para plantas. Las secuencias se examinaron manualmente inspeccionando los alineamientos, identificando los ORFs y evaluando la cobertura por lecturas.

4.7 Análisis de las lecturas del ARNseq para estudios del microbioma

A partir de las secuencias obtenidas por Azenta, se importaron las lecturas de ARNseq obtenidas de cada muestra al paquete Pavian R v1.2.0 para obtener una clasificación taxonómica de ellas e interactivamente en una tabla, visualizar y comprender las especies del microbioma presentes, comparando sus identificaciones (Breitwieser & Salzberg, 2020).

Además, se realizó la visualización predeterminada de Pavian R v1.2.0 mediante un diagrama de Sankey de las secuencias asignadas, para mostrar el flujo de lecturas desde la raíz de la taxonomía hasta rangos más específicos para un resumen visual claro. Para interpretación de resultados, se analizó el diagrama de Sankey de la muestra PM05 (GS=4).

5. Secuenciación de Sanger

5.1 Retrotranscripción del ARN (RT-PCR)

5.1.1 Purificación *del* ARN

El protocolo seguido fue dado según referencia del kit RQ1 RNase-Free DNase-Promega (Promega, s.f.). A nuevos tubos de 0,2 ml se mezclaron los siguientes componentes: ARN total (4 μ L), tampón de reacción 10X con $MgCl_2$ (1 μ L), DNasa libre de RNasa (#EN0521) (1 μ L), agua libre de nucleasas (10 μ L). Los tubos se incubaron a 37 °C por 30 min, se les agregó 1 μ L de solución stop (EDTA 50 mM) e incubaron a 65 °C por 10 min. Este ARN preparado se usó como plantilla para la transcriptasa inversa.

5.1.2 Síntesis de la primera hebra del ADNc

Se utilizaron los cebadores internos anidados nCTVF y nCTVR de 212 pb de la proteína de la capsida del CTV, optimizados por Incabiotec (2021) para comprobar la existencia de material genético viral.

La retrotranscripción se realizó utilizando el kit RevertAid (Thermoscientific, 2024). En microtubos de 0,2 ml mantenidos en hielo, se agregaron: i) Mix 1 compuesto por 8 μ L ARN total purificado (120 ng/ μ L), 3 μ L AUP, 1 μ L del primer universal oligo (dT) (100 μ M) (Sambrook & Russell, 2001) como control y para

detección del virus 1 μL del primer reverse nCTVR específico (10 μM). Se incubaron en un termociclador programado a 70°C por 5 min y 4°C por 5 min. ii) Seguidamente, se agregaron 8 μL del Mix 2 compuesto de 4 μL de buffer de reacción (5X), 2 μL de dNTP'S (10 mM), 1 μL ribolock Rnase Inhibidor (20 U/ μL), y 1 μL RevertAid Transcriptase (200 U/ μL). Los microtubos se incubaron a 42° C por 60 min y finalmente a 70°C por 5 min.

5.2 Detección del CTV mediante la PCR

Con el ADNc obtenido de las muestras, se realizó la PCR con primers del gen CP (dirigido a la cápside del virus) y del gen de la actina (gen constitutivo utilizado como control de la extracción) utilizando el kit de Promega.

Los reactivos utilizados fueron: AUP 15,3 μL , Buffer (5X) 2,0 μL , dNTPs (10 mM) 0,5 μL , Primers Forward – Reverse 0,5 μL para el gen de la actina (Rubio-Piña & Zapata- Pérez, 2011) y primers forward y reverse nCTV (Adkar-Purushothama et al., 2011) (Ver Tabla 3), Taq ADN polimerasa 0,2 μL , ADNc total 1,0 μL . Volumen total de 20 μL .

Los microtubos con el mix y las muestras se incubaron en el termociclador BLUE-RAY Biotech modelo TCST-9622 a 94°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización de 94°C por 45 s, hibridación a 54°C por 45 s, elongación a 72°C por 45 s y una elongación final a 72°C por 6 min.

Tabla 3.

Secuencia de primers del control interno actina y del CTV

| Target | Cebador | Secuencia 5' → 3' | Tamaño del producto (pb) | Uso |
|-----------|---------|-----------------------------|--------------------------|-----------------|
| ACT PLANT | F | CAC TAC TAC TGC TAA ACG GGA | | |
| Actina | R | ACA TCT GCT GGA AGG TGC TG | 465 | Control interno |
| nCTVF | F | GATGAACGATGTGCGTCAGT | 212 | Diagnóstico |
| nCTVR | R | CTTCAACACCCTCCCGAGT | 212 | Diagnóstico |

5.3 Electroforesis en gel de agarosa

Se aplicó un campo eléctrico al gel de agarosa al 1,5% acompañado de un marcador de PM de 1 kb. Se cargó 6 μL de amplicones y 2 μL de buffer de carga.

5.4 Secuenciamiento y análisis informático

Los amplicones separados en alícuotas de 30 µL en tubos eppendorf de 0,2 ml y los primers a una concentración de 15 mM/µL, fueron enviados a la empresa MacroGen – Corea.

El secuenciamiento del ADNc del CTV se hizo con la técnica de Sanger en doble sentido. Una vez recibidas las secuencias, sus calidades fueron evaluadas manualmente por revisión de los pictogramas. Las secuencias seleccionadas fueron alineadas con el software de libre acceso Mega X.

La secuencia revers fué convertida en reversa complementaria para encontrar la zona consenso. La identificación de las secuencias fue realizada contrastando sus secuencias con la base de datos de acceso público del NCBI mediante el software en línea BLASTn.

6. Indexado biológico

6.1 Recolección de ramillas de árboles reservorio

De árboles reservorio de algarrobo del campus de la UDEP (Figura 5) en estados sano-inicial (Figura 5a), intermedio (Figura 5b) y avanzado (Figura 5c) de decaimiento.

Con una tijera de podar desinfectada con alcohol etílico y flameada a la llama cuando se iba a tomar muestras de otro árbol, se cortaron y obtuvieron de la copa de los árboles en estudio ramillas jóvenes aparentemente sanas, de 30-40 cm de longitud (Figura 5d).

Los tres grupos de ramillas correspondientes a los árboles reservorio en estados inicial, intermedio y avanzado, se codificaron y envolvieron en papel, e inmediatamente, en un periodo de tiempo muy breve, se llevaron al invernadero ubicado a corta distancia, donde se les eliminó totalmente el follaje y espinas para obtener las varetas y continuar con las labores de inoculación de corteza en plantones de *N. pallida*.

6.2 Obtención de corteza de varetas reservorio

Previamente, a las varetas se les limpió la superficie de la en papel toalla y se les asperjó alcohol a 70° sobre la corteza.

Luego, utilizando bisturí con hoja estéril, se hicieron tres cortes longitudinales de abajo hacia arriba de la corteza hasta obtener y separar tres segmentos de 1,0-1,5 cm de largo x 0,3-0,5 cm de ancho (Figura 5e).

6.3 Preparación de los plantones indicadores

Plantones de algarrobo sembrados y crecidos en arena cernida de río en bolsas de polietileno color negro (20 x 30 cm) durante nueve meses en el tinglado de la UDEP, se utilizaron como indicadores de virus.

Las heridas en los plantones se hicieron en la corteza del tallo, deslizando longitudinalmente desde arriba hacia abajo una hoja de bisturí estéril y levantando segmentos de 1,0-1,5 cm de largo x 0,3-0,5 cm de ancho, sin separarlos totalmente de la corteza del tallo de los plantones. Se hicieron tres heridas por plantón a partir de 20-25 cm de altura del tallo y a una distancia aproximada de 5-7 cm entre herida y herida (Figura 5f).

6.4 Inoculación de corteza

Se introdujo un segmento de corteza de las varetas de árboles reservorio en cada una de las heridas hechas en los tallos de los plantones indicadores.

Se tuvo cuidado que la parte interna de la corteza quede en contacto directo con el cambium de la planta indicadora, se cubra con el segmento de la corteza del plantón (Figura 5f).

Al final, las zonas de indexado de las plantas indicadoras se forraron con cinta parafilm indicadas por tres flechas en la Fig. 5g. Se utilizaron seis (06) plantones de algarrobo indicadoras por tratamiento: T1 (Figura 5h), T2 (Figura 5i) T3 (Figura 5j), T4. (Figura 5k), T5 (Figura 5l).

Los riegos se hicieron cada 7-10 días de acuerdo a sus necesidades hídricas de los plantones.

6.5 Despunte y primera defoliación de los plantones indicadores

El despunte o poda de la parte superior del tallo de los plantones indicadores de algarrobo, se realizó 25 días después del indexado (DDI) con tijeras desinfectadas con alcohol etílico aproximadamente 5 cm arriba del punto superior de inoculación.

Se realizó con el fin de detener el desarrollo en altura de los plantones y promover el desarrollo de nuevas remillas laterales a partir de las yemas y facilitar la observación de los primeros síntomas.

Seguidamente, con tijeras desinfectadas, se realizó la defoliación total de los plantones en todos los tratamientos en estudio, para estimular la emergencia de nuevos brotes.

En la Figura 5m se observan todas las plantas despuntadas y defoliadas.

6.6 Segunda defoliación de los plantones indicadores

Se realizó 62 DDI utilizando tijeras desinfectadas con alcohol 70°. Se eliminó totalmente el follaje con el fin de promover una segunda emergencia de brotes jóvenes en los cuales se puedan observar los síntomas relacionados a virus.

Las Figuras 5n-q muestran el estado de las plantas indicadoras después de la segunda defoliación total.

6.7 Diseño experimental

Para el análisis de crecimiento de ramillas después de la poda, se aplicó el Diseño Completamente al azar (DCA) con cinco tratamientos y seis (6) repeticiones (plantas) por tratamiento (ver Tabla 4).

Se hizo el análisis de variancia (ANVA) para ver si había significancia entre los tratamientos y una prueba comparativa de medias de Duncan al 95% de confianza para comparación entre cada tratamiento.

Tabla 4.

Tratamientos en ensayo de indexación

| Tratamiento | Descripción |
|-------------|--|
| 01 | Plantones inoculados con segmentos de corteza de árboles reservorio en estado sano-inicial de enfermedad |
| 02 | Plantones inoculados con segmentos de corteza de árboles reservorio en estado intermedio de enfermedad |
| 03 | Plantones inoculados con segmentos de corteza de árboles reservorio en estado avanzado de enfermedad |
| 04 | Plantones inoculados con segmentos de corteza de plantones sanos |
| 05 | Plantones con herida y no inoculados |

6.8 Evaluaciones del crecimiento de nuevas brotes

Se realizaron a 16, 23, 30 y 37 días después de la primera defoliación y a 7, 14, 21 y 28 días después de la segunda defoliación total.

En cada momento de observación, se utilizó una regla graduada en cm.

Al final del experimento, se obtuvo el ritmo promedio de crecimiento diario (cm) de las nuevas ramillas

6.9 Aspecto del follaje

Se evaluó con escala cualitativa para evaluar la calidad del follaje de acuerdo a su colorcolor: V = Verde normal (planta sana), VA = Verde amarillento, C = Clorótico, M = Muerto.

Figura 5. Proceso de indexado



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Sintomatología

La enfermedad se manifiesta mayormente en árboles adultos, aunque también se presenta en árboles jóvenes (Figura 6).

Independientemente de los síntomas de clorosis y defoliación por el ataque de plagas, el síndrome de decaimiento y muerte, se inicia con defoliación y muerte regresiva de ramillas estacionales que ya no se regeneran y avanza lentamente hacia ramas secundarias y luego a ramas primarias.

El árbol afectado pasa desde un estado inicial a estados intermedio y avanzado de la enfermedad, emitiendo rebrotes basales antes de morir (Figuras 6a-f).

Se conoce que es un proceso lento, pero, no se sabe el tiempo que demora un árbol en morir desde que se inicia la enfermedad.

Esta muerte regresiva desde ramillas hasta ramas estaría asociada a eventos adversos en el transporte de agua desde las raíces hacia los meristemas por embolias (burbujas de gas) en los vasos xilemáticos ocasionadas por estrés hídrico (Zweifel et al., 2006).

En estados avanzados de la enfermedad, es frecuente observar que las ramas primarias y secundarias del árbol aparezcan con desprendimientos longitudinales de la corteza y grietas o fracturas en la zona del cambium (Figuras 6g, 6j-k), que se debería a la pérdida de turgencia del cambium por estrés hídrico. Pérez Silva (2010) han reportado desprendimientos de la corteza en ciprés mexicano por ataque del escarabajo *Phoesimus baumannii*.

Otro síntoma, son las exudaciones de resinas fenólicas que se observan al realizar con sierra eléctrica un corte transversal del tronco de un árbol enfermo (Figura 6h). Este importante síntoma, si bien se ha observado en un árbol

enfermo, es posible que sea un patrón común de todos los árboles enfermos e incluso en árboles sanos o con síntomas iniciales, constituyen una respuesta de árboles al mismo proceso de la enfermedad. Según Shigo (1979), son barreras químicas que buscan contener el daño al duramen interno.

Otro síntoma muy importante, son los agujeros de entrada/ salida de larvas de coleópteros debajo de la corteza del tronco y ramas, algunos superficiales (Figura 6i) y otros profundas formando galerías acompañadas de zonas necróticas de avance (Figuras 6j -k).

No se conoce si esta sintomatología es común en todos los bosques secos de *Neltuma* en el norte del Perú; por lo que, sería muy necesario un estudio de estos coleópteros en cuanto a su identificación taxonómica, biología y ecología, incluyendo su ciclo de vida, tasas de infestación, factores que regulan su abundancia, su relación con el clima y la posible asociación con hongos simbioses o patógenos.

Estos síntomas son relevantes y no han sido descritos por Whaley et al. (2020), quienes afirman que la necrosis y caída significativa del follaje por el díptero *Enallodiplosis discordis* contribuye a la dispersión y mortalidad de *N. pallida*. Tampoco. los describe Chipana (2019) al afirmar que esta plaga es una de las principales causantes de la declinación del algarrobo en el Bosque Cañoncillo – Pacasmayo, lo cual no es concordante con lo descrito anteriormente.

E. discordis es una plaga común, tanto en árboles sanos como en árboles enfermos, ya que la defoliación que produce, no es regresiva y está dispersa dentro del árbol aleatoriamente en focos de brotes jóvenes, sí lo debilita, afecta su productividad y vigor, pero no conduce a la mortalidad ya que las ramillas afectadas son capaces de emitir nuevos folíolos en pocas semanas.

En esta investigación, se ha observado que la severidad del decaimiento y muerte del *N. pallida* se intensifica en áreas sometidas a estrés hídrico prolongado independientemente de la textura del suelo (arenoso, limoso o arcilloso), sobre todo en zonas donde se conoce el nivel freático se hace más profundo y hay un acceso limitado del al agua.

Por el contrario, la enfermedad muestra una baja incidencia o nula progresión en sectores del Bajo Piura y zonas costeras, donde la proximidad al mar o una napa freática es más superficial y favorecerá la resiliencia del árbol.

Por esta razón, en los parques y jardines de las ciudades, en las zonas contiguas a la carretera donde los árboles reciben riegos frecuentes y reciben cuidados, la enfermedad no progresa a pesar de tener una baja producción al estar afectados por *E. discordis* y tener perforaciones por larvas de coleópteros.

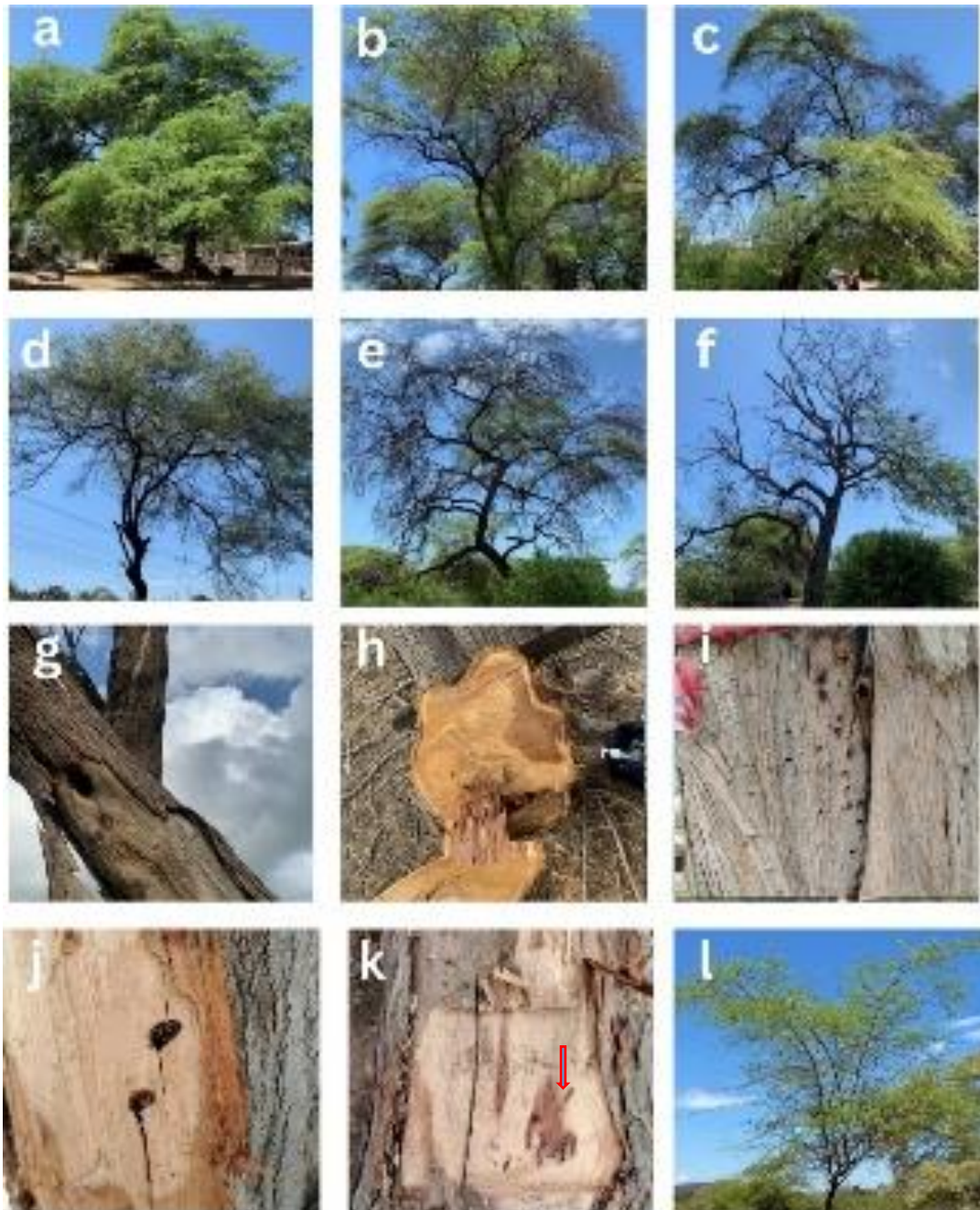
En épocas de lluvias de verano, los árboles enfermos en estados intermedio de decaimiento, emiten nuevos brotes en las ramas y tronco, recuperándose parcial o totalmente, dependiendo del estado de decaimiento (Figura 01).

Esto, indica que, a pesar de la oclusión vascular, el árbol aún posee yemas latentes y reservas de energía en raíces y tronco hasta que se agoten y desencadenen su muerte.

En la Universidad Privada de Piura (UDEP), se ha observado la muerte de árboles jóvenes de algarrobo por mordeduras alrededor del perímetro del tronco por venados.

Los venados son atraídos por la corteza aún es delgada de los árboles jóvenes, corteza no muy leñosa y que no produce compuestos antagónicos como un árbol viejo. Este, es otro aspecto a tener en cuenta en el campo respecto al ganado caprino en los bosques de algarrobo, que podría estar causando el mismo daño.

Figura 6. Síntomas del decaimiento y muerte de *N. pallida*



Cantidad y calidad de ARN

Los resultados del NanoDrop NP80 (Implen) para el ARN total extraído con el kit WizPrep (Tabla 5) muestran que el cambium (C) presentó concentraciones y pureza superiores en comparación con las hojas. La muestra PMA22 (GS=0) alcanzó 673.68 ng/μL, coherente con la intensa actividad transcripcional del cambium como tejido meristemático secundario responsable del crecimiento radial (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales [FCEN], 2018). Estas

concentraciones se ubicaron dentro del rango óptimo para mediciones confiables (20–1000 ng/μL), por debajo del cual la pureza pierde precisión (Thermo Fisher Scientific, 2021).

La relación A260/280 entre 2.1–2.2 indicó ARN libre de proteínas según los rangos aceptados (Thermo Fisher Scientific, 2015, 2023; BANCOADN, 2024). Asimismo, las muestras PMA05, PMA09, PMA10, PMA22, PMA24 y PMA27 mostraron A260/A230 entre 2.2–2.5, señalando ausencia de contaminantes, mientras que PMA07 (0.761) evidenció fuerte contaminación por carbohidratos o sales, probablemente asociada al incremento de metabolitos de defensa en árboles en decaimiento (Porebsky et al., 1997).

La menor concentración y pureza en las hojas (H), es un comportamiento típico en *Neltuma* debido a su alto contenido de polifenoles y polisacáridos (Nizam et al., 2023). Ejemplo de ello es PMA22 (H), con A260/A230 de 0.164, indicativo de contaminación extrema. PMA24 (H) y PMA27 (H) presentaron valores bajos y relaciones fuera de los rangos aceptables, incluyendo contaminación proteica (A260/A280 = 1.5). Esto sugiere que el kit WizPrep no elimina eficientemente los inhibidores presentes en hojas y requeriría pasos de purificación adicionales.

En conjunto, solo las muestras de cambium con relaciones de pureza >2.0 fueron aptas para síntesis de ADNc, mientras que las hojas - altamente afectadas por metabolitos secundarios típicos de *Neltuma* bajo estrés - fueron descartadas (Michel-López et al., 2018).

Tabla 5.**Concentración y pureza de ácidos nucleicos por NanoDrop**

| Código | GS ¹ | Órgano/ Tejido | Concentración | Pureza | |
|--------|-----------------|-------------------|---------------|----------|----------|
| | | | (ng/μL) | A260/280 | A260/230 |
| PMA05 | 4 | C ² | 444,16 | 2,188 | 2,381 |
| PMA06 | 5 | C | 127,52 | 2,144 | 1,770 |
| PMA07 | 3 | C | 229,20 | 2,136 | 0,761 |
| PMA08 | 2 | C | 104,00 | 2,085 | 1,696 |
| PMA09 | 1 | C | 240,00 | 2,172 | 2,221 |
| PMA10 | 4 | C | 139,40 | 2,141 | 2,285 |
| PMA22 | 0 | C | 673.68 | 2.2 | 2.4 |
| PMA24 | 2 | C | 163.44 | 2.1 | 2.5 |
| PMA27 | 4 | C | 317.32 | 2.1 | 2.5 |
| PMA22 | 0 | H ³ | 130.96 | 2.1 | Δ0.164 |
| PMA24 | 2 | H | 12.72 | Δ1.975 | Δ1.882 |
| PMA27 | 4 | H | 18.24 | Δ1.5 | Δ0.030 |

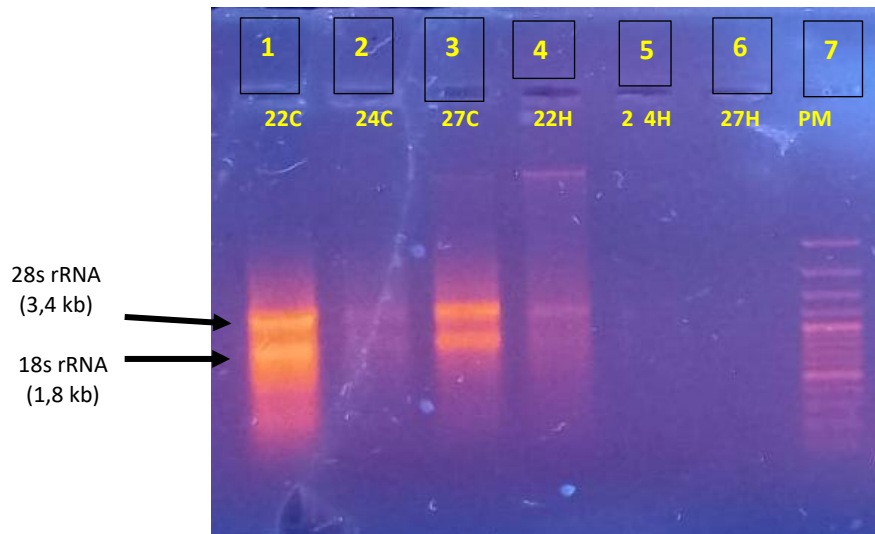
¹Grado de severidad²Cambium³Hojas

En cuanto a la integridad del ARN total de las muestras evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 7), las muestras de cambium 22C y 27C presentaron bandas ribosomales 28S (~3.4 kb) y 18S (~1.8 kb) nítidas y bien definidas, indicando que es un ARN de alta integridad. La muestra 22H presentó bandas visibles, aunque acompañadas de un fondo difuso, posiblemente asociado a la presencia de polifenoles que pueden interferir con la migración electroforética. Las muestras 24C, 24H y 27H mostraron signos claros de degradación, evidenciados por la pérdida de definición de las bandas ribosomales y la presencia de “smear” hacia el fondo del gel.

La integridad del ARN se considera adecuada cuando la banda 28S presenta aproximadamente el doble de intensidad que la 18S, lo que indica ausencia de degradación significativa (Rio et al., 2010). El ARN íntegro constituye un requisito fundamental para análisis moleculares posteriores, como RT-PCR o secuenciación de ARN, ya que la degradación puede afectar la representación de los transcritos y la calidad del ensamblaje transcriptómico. En este contexto, el uso de protocolos optimizados para tejidos vegetales ricos en compuestos

fenólicos, como el descrito por Michel-López et al. (2018), puede mejorar el rendimiento y la estabilidad del ARN extraído.

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ARN de cambium y hojas



2. ARNseq por Azenta

La Tabla 6 presenta los resultados del control de calidad del ARN total previo a los análisis posteriores de secuenciamiento de seis muestras, cada una con su respectiva alícuota respaldo (backup) o copia de seguridad como plan de contingencia de las muestras originales, en caso que estas tengan cantidad insuficiente, pérdida de material o se requiera repetir el análisis.

2.1. Concentración y pureza de ácidos nucleicos

La cuantificación inicial mediante NanoDrop 2000 mostró concentraciones elevadas en las muestras originales (230,20–1187 ng/μL), así como rendimientos totales adecuados para ARNseq (2292,60–15 431 ng), lo que en principio sugeriría un material de calidad según los parámetros de Manchester (1996), valores que deben interpretarse con cautela, ya que el NanoDrop tiende a sobreestimar la concentración cuando existe contaminación por compuestos absorbentes a 260 nm.

Aunque varias muestras (PM05, PM06, PM07, PM08, PM10 y sus respaldos) presentaron relaciones A260/A280 dentro del rango ideal (2,0–2,2) descrito por Thermo Scientific (2012) y Bayardo y Bárcena (2025), este indicador por sí solo

no garantiza pureza, especialmente en matrices vegetales ricas en polifenoles y polisacáridos como *N. pallida*.

El análisis crítico de la relación A260/230 reveló inconsistencias importantes: solo PM06 mostró un valor dentro del rango óptimo (2,11), mientras que PM08 (1,81) fue apenas aceptable y las demás muestras presentaron valores marcadamente bajos. Estos resultados, coherentes con la presencia de contaminantes orgánicos y reactivos residuales (Wilfinger et al., 1997; Healey et al., 2014; Vall d'Hebron Institut de Recerca [VHIR], 2020), indican que la extracción no fue suficientemente eficiente para eliminar compuestos interferentes, lo que puede afectar la integridad del ARN y comprometer etapas posteriores como la construcción de bibliotecas.

Además, dado que el NanoDrop no distingue entre ADN y ARN y pierde precisión por debajo de los 20 ng/μL, su utilidad como único criterio de selección es limitada. En este contexto, el uso de Qubit constituye una herramienta más confiable para determinar la concentración real de ARN utilizable en aplicaciones de secuenciación (Thermo Fisher Scientific, 2021).

2.2. Cantidad total de ARN

La cantidad total de ARN medida por fluorometría con Qubit varió entre 268,80 ng en PMA09 (respaldo) y 18 447 ng en PMA06 (Schipor et al., 2014). Estos valores se encuentran dentro de los rangos requeridos para la preparación de bibliotecas de ARN-seq, que generalmente demandan entre 1 ng y 1 μg de ARN total según el protocolo utilizado (Illumina, 2025b; Thermo Fisher Scientific, 2025c). Las mayores cantidades de ARN suelen asociarse con tejidos metabólicamente activos y con alta actividad transcripcional, mientras que valores más bajos son frecuentes en tejidos leñosos sometidos a estrés (Gambino et al., 2008).

2.3. Calidad e integridad del ARN

La integridad del ARN evaluada mediante los valores RINe obtenidos con TapeStation fue baja en varias muestras: PMA07 (1,2), PMA09 respaldo (1,6), PMA05 (2,0) y PMA06 (3,3). Considerando que valores RIN > 7 indican ARN íntegro, 5–7 calidad aceptable y < 5 degradación, la mayoría de las muestras,

excepto PMA10, presentan distintos grados de degradación (Schroeder et al., 2006). No obstante, el DV200, métrica más informativa en ARN degradado, mostró valores cercanos o superiores al 70 % de fragmentos >200 nt, lo que sugiere que el ARN aún es adecuado para la construcción de bibliotecas de RNA-seq (Adiconis et al., 2013; Illumina, 2016).

La columna de control de calidad (QC) resume las advertencias detectadas: (1) material inicial insuficiente, (2) RIN < 6, (3) DV200 < 70 % y (4) contaminación por ADN > 10 % (Tabla 6). Los resultados obtenidos en las muestras de respaldo confirman que las muestras originales constituyen el material de mejor calidad disponible.

Tabla 6.

Calidad e Integridad del ARN total realizado por Azenta

| ID de la muestra ¹ | ID de Azenta ² | Tipo de muestra ³ | Volumen de muestra (µL) ⁴ | Nanodrop 2000 | | | | ADN Qubit | | ARN Qubit | | TapeStation | | | Nota de Control de Calidad |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|-------------|--------------------------------|----------------------------|
| | | | | Concentración de AN (ng/µL) | Cantidad total (ng) | A260/A280 | A260/A230 | Concent. Real de AN (ng/µL) | Cantidad total (ng) | Concent. Real de AN (ng/µL) | Cantidad total (ng) | Tamaño prom. ADN | RIN del ARN | DV 200 (para ARN) ⁶ | |
| PM05 | SGH46298 | ARN Total | 13 | 350,5 | 4556,5 | 2,15 | 1,68 | 35,36 | 459,68 | 268,8 | 3494,4 | N A | 2,0 | 83,68 | 2, 4 |
| PM06 | SGH46299 | ARN Total | 13 | 1187,0 | 15431,0 | 2,17 | 2,11 | 62,10 | 807,30 | 1419,0 | 18447,0 | N A | 3,3 | 90,09 | 2 |
| PM07 | SGH46300 | ARN Total | 13 | 230,2 | 2992,6 | 2,08 | 1,27 | TL | TL ⁵ | 180,6 | 2347,8 | N A | 1,2 | 62,91 | 2, 3 |
| PM08 | SGH46301 | ARN Total | 13 | 547,4 | 7116,2 | 2,05 | 1,81 | 31,64 | 411,32 | 632,8 | 8226,4 | N A | 3,6 | 88,62 | 2 |
| PM09 | SGH46302 | ARN Total | 13 | 865,2 | 11247,0 | 1,98 | 0,73 | 18,04 | 234,52 | 781,0 | 10153,0 | N A | 4,1 | 84,57 | |
| PM10 | SGH46303 | ARN Total | 13 | 424,0 | 5512,0 | 2,16 | 1,49 | 28,40 | 369,20 | 396,0 | 5148,0 | N A | 5,7 | 91,27 | |
| PM05_b | SGH46267 | ARN Total | 13 | 250,2 | 3252,6 | 2,10 | 1,60 | TL | TL | 210,0 | 2737,8 | N A | 2,5 | 83,92 | 2 |
| PM06_b | SGH46268 | ARN Total | 13 | 197,9 | 2572,7 | 2,09 | 0,60 | 3,12 | 40,56 | 192,0 | 2496,0 | N A | 2,2 | 77,24 | 2 |
| PM07_b | SGH46269 | ARN Total | 12 | 180,3 | 2163,6 | 2,09 | 0,73 | 21,00 | 252,00 | 193,6 | 1483,2 | N A | 2,4 | 81,24 | 2, 4 |
| PM08_b | SGH46270 | ARN Total | 12 | 101,4 | 1216,8 | 1,97 | 1,25 | 4,40 | 52,80 | 53,2 | 638,4 | N A | 2,2 | 72,07 | 2 |
| PM09_b | SGH46271 | ARN Total | 12 | 38,2 | 458,4 | 1,93 | 0,30 | 2,58 | 30,96 | 22,4 | 268,8 | N A | 1,6 | 57,36 | 2, 3, 4 |
| PM10_b | SGH46272 | ARN Total | 12 | 178,4 | 2140,8 | 2,05 | 1,23 | 25,20 | 302,40 | 129,6 | 1555,2 | N A | 2,5 | 82,11 | 2, 4 |

¹Identificador de la muestra por el investigador. ²Código interno asignado por Azenta para seguimiento y procesamiento. ³Tipo de muestra: ARN total extraído). ⁴Volumen de la muestra entregado al laboratorio. ⁵TL: Demasiado bajo ⁶porcentaje de fragmentos de tamaño superior a 200 nucleótidos, a partir del valor del DV200 se determina la cantidad inicial de RNA para la generación de librerías

2.4. Integridad del ARN por tamaño y distribución de los fragmentos

El gráfico de barras derivado de la electroforesis capilar (Figura 8) complementa la evaluación de la integridad del ARN presentada en la Tabla 6 y permite comparar la calidad funcional de las muestras según los parámetros de control de calidad (QC) obtenidos con TapeStation.

Las barras altas con DV200 > 70 % indican que el ARN de las muestras PMA05, PMA06, PMA08, PMA10 y algunos respaldos contiene una proporción adecuada de fragmentos mayores a 200 nt, lo que las hace aptas para la construcción de bibliotecas de RNA-seq.

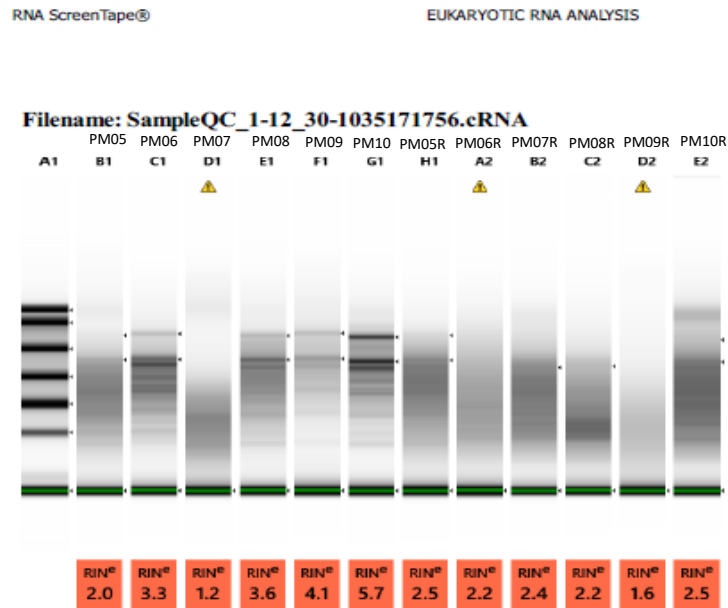
Las barras intermedias (DV200 entre 60–70 %), como en la muestra PMA07 (RIN 1,2), evidencian degradación del ARN ribosomal, observándose una señal difusa en la parte inferior del carril; sin embargo, este material aún podría emplearse en protocolos adaptados para ARN parcialmente degradado.

Por el contrario, las barras bajas (DV200 < 60 %), como en PMA09 respaldo, indican ARN altamente degradado, lo que reduce la probabilidad de obtener bibliotecas transcriptómicas representativas.

En general, las muestras principales presentan valores de DV200 superiores a los de sus respaldos, lo que sugiere que los respaldos pueden corregir problemas de concentración, pero no necesariamente mejorar la integridad del ARN.

A pesar de los valores bajos de RIN observados en algunas muestras, el DV200 constituye una métrica más informativa para evaluar la utilidad del ARN degradado en RNA-seq, ya que refleja la proporción de fragmentos suficientemente largos para la preparación de bibliotecas transcriptómicas (Adiconis et al., 2013; Sigurgeirsson et al., 2014).

Figura 8. Integridad del ARN de muestras de cambium por electroforesis capilar



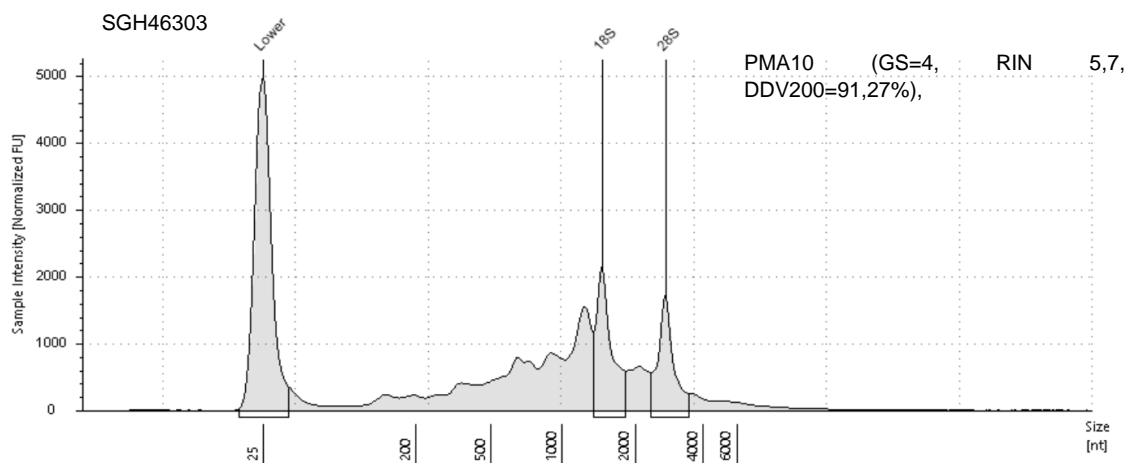
R=respaldo

En el electroferograma de TapeStation de la muestra SGH46303 (PMA10) (GS=4; RIN=5,7; DV200=91,27 %) se observan los picos ribosomales 18S y 28S aproximadamente a 1500 nt y 2700 nt, respectivamente. Ambos picos aparecen definidos, aunque con menor altura y ligero ensanchamiento de la línea de base entre el marcador inferior (25 nt) y el primer pico, lo que indica la presencia de fragmentos de ARN de menor tamaño. Este patrón sugiere fragmentación parcial del ARN ribosomal, probablemente asociada a la actividad de ribonucleasas o a condiciones fisiológicas del tejido, lo que provoca la disminución de los picos ribosomales y el incremento de fragmentos pequeños (Imbeaud et al., 2005; Fleige & Pfaffl, 2006).

Los tamaños ideales de los fragmentos ribosomales son aproximadamente 1800 nt para el 18S y 3500–5000 nt para el 28S (Thermo Fisher Scientific, 2025a). En esta muestra, el 28S presenta un tamaño menor al esperado, lo que explica el valor de RIN de 5,7, inferior al valor óptimo (>7), ya que este índice depende principalmente de la integridad de los picos ribosomales. En consecuencia, la relación 28S/18S fue de 1,8, ligeramente menor al valor ideal cercano a 2 (Thermo Fisher Scientific, 2025b).

No obstante, el alto DV200 (>90 %) indica que la mayoría de los fragmentos de ARN supera los 200 nt, lo que sugiere que la muestra conserva material funcional suficiente para la construcción de bibliotecas y análisis de RNA-seq (Matsubara et al., 2020). Este comportamiento es consistente con la naturaleza del tejido leñoso de *Neltuma pallida*, donde la presencia de metabolitos secundarios puede interferir en la extracción y estabilidad del ARN (Michel-López et al., 2018) (ver Figura 9)

Figura 9. Electroferograma TapeStation para medir la calidad del ARN



3. Detección de virus por illumina

Se obtuvo entre ~80 000 y ~346 000 contigs mayores a 250 nt por muestra, con longitudes promedio entre 415 y 526 nt. El análisis de los contigs ensamblados reveló ausencia de virus episomales infectando *N. pallida*. Ningún contig mostró similitudes compatibles con virus fitopatógenos activos, incluyendo miembros de Closterovirus, grupo previamente sospechado.

No obstante, el análisis BLASTX permitió identificar tres tipos de secuencias con afinidad viral, todas consistentes con elementos endógenos previamente reportados en otras plantas (ver Tabla 7):

a) Secuencias relacionadas con rhabdovirus endógeno: en los seis conjuntos de datos se detectaron contigs homólogos a la nucleocápside (proteína N) de rhabdovirus. previamente descrito como un fragmento viral integrado en el genoma de *Melia azedarach*. La ausencia de otros genes esenciales

(polimerasa, glicoproteína, fosfoproteína) y la baja cobertura uniforme confirmaron que se trata de EVEs (Endogenous Viral Elements) y no de un virus infectivo, el cual se origina por eventos de transferencia horizontal de material genético viral hacia el genoma nuclear del hospedador, son "fósiles genéticos" que, a diferencia de los virus episomales, se heredan verticalmente y han perdido su capacidad infectiva autónoma (Katzourakis & Gifford, 2010; Feschotte & Gilbert, 2012).

Se sugiere un rol adaptativo de los EVEs en la inmunidad antiviral, que actúan como moldes para la biogénesis de ARN interferente pequeño (siRNA), proporcionando un mecanismo de resistencia derivado del patógeno que permite a la planta reconocer y silenciar virus exógenos emparentados mediante la vía del ARNi (Feschotte & Gilbert, 2012; Whitfield et al., 2018).

b) Secuencias homólogas a pararetrovirus endógenos (EPRVs): se identificaron contigs parcialmente similares a proteínas de pararetrovirus integrados en *Citrus*, con secuencias típicas de pararetrovirus hibernantes, no se detectó organización genómica compatible con un genoma viral activo.

Geering et al. (2014) demostraron que los EPRVs están ampliamente distribuidos en las plantas con flores y que muchas de estas secuencias son "reliquias" de infecciones hace millones de años.

De acuerdo a Richert-Pöggeler et al. (2021), la mayoría de los EPRVs están fragmentados y silenciados epigenéticamente por el hospedero (metilación del ADN y siRNAs) para evitar su reactivación.

c) Secuencias asociadas a mitovirus integrados: Se identificaron múltiples contigs con similitud a mitovirus (familia Mitoviridae) endógenos, que corresponden a regiones del genoma mitocondrial de *N. pallida*.

Nibert et al. (2018) afirman que los mitovirus endógenos ARN positivos, son un fenómeno común en plantas leñosas, donde han coevolucionado con sus hospederos a lo largo de periodos extensos.

La integración de estas secuencias en el ADN mitocondrial sugiere de eventos de transferencia horizontal de genes ocurridos en el pasado evolutivo de la especie (Silva et al., 2020).

La ausencia de formas episomales activas en los tejidos analizados de *N. pallida* refuerza la hipótesis de que estos elementos han perdido su capacidad de replicación autónoma y se encuentran integrados de forma estable, un patrón documentado ampliamente en la paleovirología de plantas superiores (Bruenn et al., 2015).

A pesar del extenso análisis, no se encontró evidencia de Closterovirus (CTV o similares).

La anotación funcional realizada mediante EggNOG-mapper reveló la presencia de varias proteínas predichas en *N. pallida* con similitud a proteínas virales, incluyendo proteínas de multiplicación de tobamovirus, proteínas de movimiento viral, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y dominios asociados a recombinasas o ubiquitina ligasas tipo RING.

Este tipo de anotaciones, aunque inicialmente sugieren un origen viral, deben interpretarse con cautela en el contexto genómico y evolutivo.

La detección de virus en plantas leñosas mediante el estudio de los pequeños ARN interferentes (siARN) derivados como respuesta inmune hacia los virus, podrían determinarse mediante secuenciamiento de alto rendimiento (HTS), para reconstruir genomas virales y dar mayores alcances a esta investigación (Ruíz García & Olmos Castelló, 2021).

Tabla 7.

Anotación funcional de proteínas predichas mediante EggNOG-mapper

| Query ID | Descripción | Secuencias repetitivas en blast | % Identidad |
|-------------|--|---|-------------|
| NPAL_003079 | Homólogo de la proteína del sitio 5 de integración viral ecotrópica | Isoforma X1 similar al ortólogo del sitio de integración viral ecotrópico 5 [<i>Neltuma alba</i>] | 90.28 |
| NPAL_004214 | Proteína de multiplicación similar a la del tobamovirus 1 | Proteína de multiplicación del tobamovirus 1 similar [<i>Abrus precatorius</i>] | 68.71 |
| NPAL_004669 | Pertenece a la familia de proteínas de choque térmico pequeñas (HSP20) | Proteína inactiva TEV MOVIMIENTO RESTRINGIDO 2-like [<i>Neltuma alba</i>] | 95.09 |
| NPAL_004670 | Pertenece a la familia de proteínas de choque térmico pequeñas (HSP20) | Proteína inactiva similar a TEV RESTRINGIDO MOVIMIENTO 2 [<i>Neltuma alba</i>] | 94.25 |
| NPAL_004960 | El dominio variante RING es un motivo similar al dedo de zinc C ₄ HC ₃ presente en diversas proteínas celulares y virales. Se ha demostrado que algunas de estas proteínas poseen actividad de ubiquitina E3 ligasa, tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> . | Proteína no caracterizada LOC114745677 isoforma X3 [<i>Neltuma alba</i>] | 93.21 |
| NPAL_011913 | proteína de multiplicación del tobamovirus | Isoforma X2 similar a la proteína de multiplicación 2A del tobamovirus [<i>Neltuma alba</i>] | 92.17 |
| NPAL_003954 | El dominio variante RING es un motivo similar al dedo de zinc C ₄ HC ₃ presente en diversas proteínas celulares y virales. Se ha demostrado que algunas de estas proteínas poseen actividad de ubiquitina E3 ligasa, tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> . | Proteína no caracterizada LOC114722954 [<i>Neltuma alba</i>] | 99.34 |
| NPAL_014929 | ARN polimerasa dependiente de ARN de mitovirus | PROTEÍNA DE BAJA CALIDAD: proteína no caracterizada LOC114757245 [<i>Neltuma alba</i>] | 98.39 |
| NPAL_020862 | Proteína de movimiento viral (MP) | Proteína no caracterizada LOC114711795 [<i>Neltuma alba</i>] | 95.28 |
| NPAL_000210 | Dominio de recombinasa viral similar a YqaJ | Proteína no caracterizada LOC114744997 isoforma X1 [<i>Neltuma alba</i>] | 97.58 |
| NPAL_010050 | Factor de virulencia de la pectina liasa (InterPro IPR011050), repetición paralela de beta-hélice (InterPro IPR006626) | Poligalacturonasa QRT3 similar, parcial [<i>Neltuma alba</i>] | 82.2 |

Query ID: Identificador del gen en el genoma anotado

3.1. Metatranscriptómica de *N. pallida*

En la Tabla 8, se presenta el resumen de cómo se clasificaron taxonómicamente las lecturas de ARN-Seq del ARN de *N. pallida*, basado en clasificación taxonómica tipo Kraken2 y visualizado mediante Pavian, donde cada muestra tiene un rango entre 13 y 22 millones de lecturas.

El análisis metatranscriptómico de las muestras de *N. pallida* reveló que la mayoría de las lecturas ARNseq clasificadas corresponden a secuencias de origen vegetal entre ~78 % y 85 % en su mayoría, lo que confirma una adecuada representación del transcriptoma vegetal.

No obstante, una fracción consistente de lecturas fue asignada a orígenes microbianos, representando aproximadamente 20–25 % de las lecturas clasificadas en la mayoría de las muestras, con variaciones entre individuos.

Dentro de las lecturas microbianas, las bacterias constituyeron el grupo predominante, mientras que las lecturas asignadas a hongos y protozoarios fueron minoritarias (<0.2 % y <0.4 %, respectivamente), lo que refuerza la interpretación de una microbiota asociada estable y no patogénica.

Cabe destacar que no se detectaron lecturas clasificadas como virales en ninguna de las muestras.

Este resultado es relevante y consistente con los análisis funcionales previos, ya que respalda la ausencia de infecciones virales activas en *N. pallida*.

Así mismo, refuerza la interpretación de que las secuencias con anotaciones virales identificadas en el análisis proteómico corresponden a elementos virales endógenos o dominios conservados de origen viral, y no a virus exógenos en replicación.

Tabla 8.

Clasificación taxonómica de las lecturas ARNseq por Azenta

| Nombre | Número de lecturas sin procesar | Lecturas clasificadas (%) | Lecturas de Cordados (%) | Lecturas artificiales (%) | Lecturas no clasificadas (%) | Lecturas microbianas (%) | Lecturas fúngicas (%) | Lecturas protozoarias (%) | GS |
|--------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|----|
| PM05 | 22,002,391 | 78.91 | 2.939 | 0 | 21.09 | 75.94 | 0.1689 | 0.01028 | 4 |
| PM06 | 21,962,869 | 84.59 | 2.772 | 0 | 15.41 | 81.79 | 0.114 | 0.007645 | 5 |
| PM08 | 17,913,220 | 82.79 | 4.083 | 0 | 17.21 | 78.68 | 0.1089 | 0.01052 | 2 |
| PM09 | 21,985,100 | 85.19 | 2.401 | 0 | 14.81 | 82.77 | 0.05818 | 0.005777 | 1 |
| PM10 | 15,964,637 | 83.64 | 2.995 | 0 | 16.36 | 80.62 | 0.1074 | 0.007028 | 4 |
| PMA06 | 16,070,913 | 75.08 | 0.9341 | 0 | 24.92 | 74.14 | 0.1261 | 0.009296 | 5 |
| PMA07 | 14,466,949 | 73.49 | 0.9699 | 0 | 26.51 | 72.51 | 0.1828 | 0.008806 | 3 |
| PMA08 | 13,016,132 | 62.32 | 1.19 | 0 | 37.68 | 60.92 | 0.172 | 0.02266 | 2 |
| PMA11 | 13,413,532 | 72.69 | 1.218 | 0 | 27.31 | 71.4 | 0.107 | 0.008946 | 0 |
| PMA16 | 14,877,593 | 31.77 | 8 | 0 | 68.23 | 23.62 | 0.1733 | 0.1409 | 5 |
| PMA17 | 13,443,531 | 49.98 | 1.852 | 0 | 50.02 | 48.01 | 0.1835 | 0.3248 | 1 |

El diagrama de Sankey que se observa en la Figura 10 es la representación gráfica asignada a cada nivel taxonómico de la muestra PMA05 (GS=4) y presenta la ruta taxonómica de las lecturas clasificadas. Dentro del dominio bacteria, se detectaron los géneros endófitos *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* e *Hydrogenophaga* (Pseudomonadota).

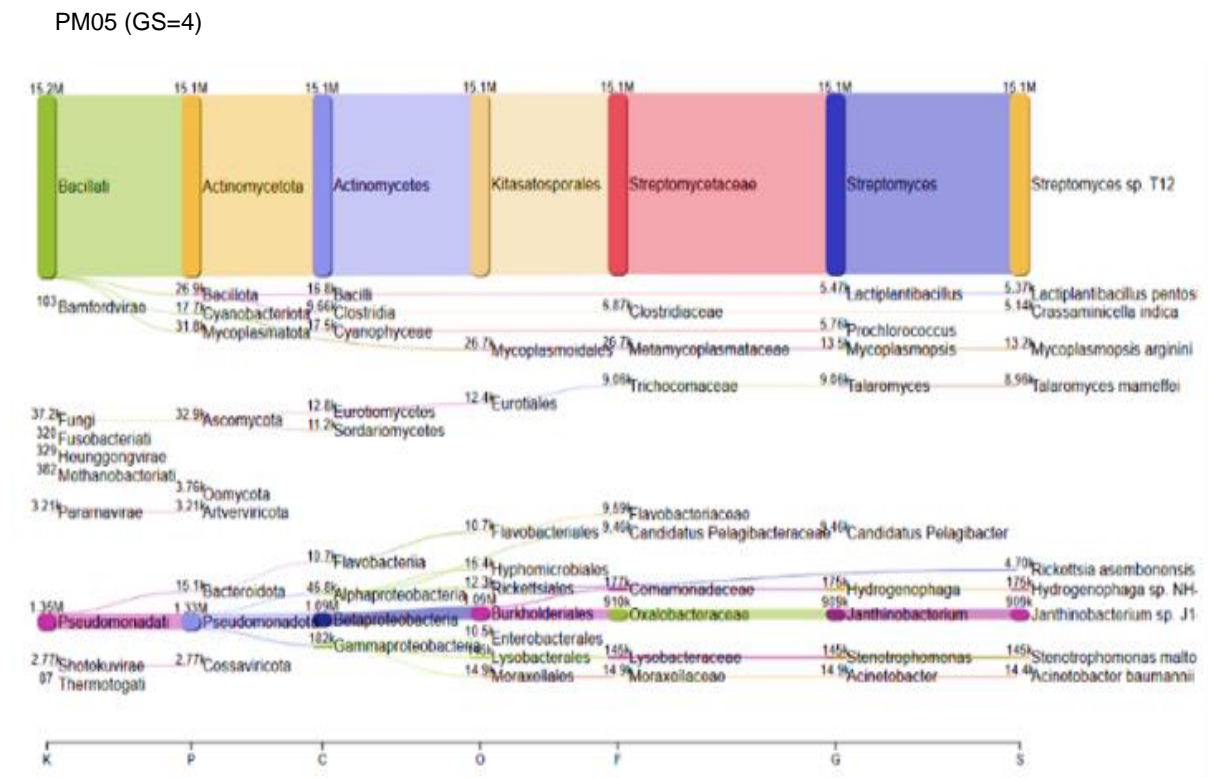
Turner et al. (2013) y Spooren et al. (2024), postulan que la interacción entre la planta y microbios presentes en el suelo, aire y semillas forma un holobionte o equipo biológico, seleccionado y guiado por el ADN de la planta para obtener ventajas que le permitan adaptarse mejor a su entorno.

Gao et al. (2021) demostraron que plantas de pimiento enfermas por *Fusarium* podría reclutar bacterias beneficiosas y mitigar los cambios en el microbioma de los órganos reproductivos para facilitar su supervivencia, pudiendo atraer a microbios beneficiosos mediante la modulación de las vías de señalización entre la planta y el microbioma.

Li et al. (2022) revelaron cómo los microbiomas de la filosfera difieren entre hojas de cítricos infectadas y no infectadas por *Diaporthe citri*. Identificaron

posibles mecanismos por los cuales el cambio observado en el microbioma podría haber ayudado a las plantas a afrontar la presión de los patógenos.

Figura 10. Diagrama de Sankey: ruta taxonómica de las lecturas microbianas

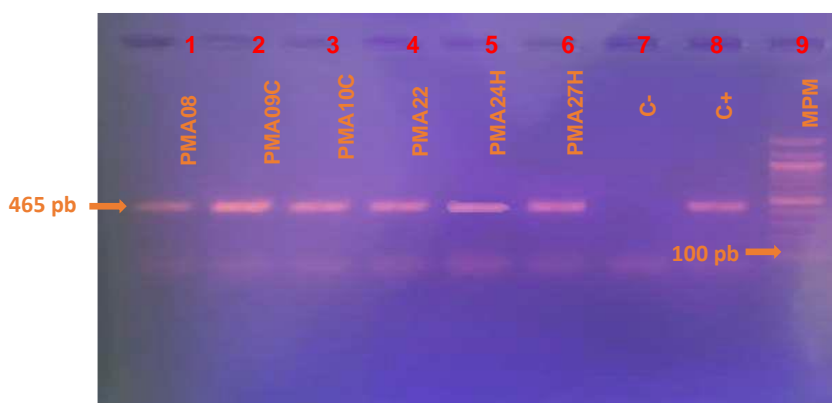


4. Secuenciamiento por Macrogen

4.1 Detección del gen de la actina y de la proteína de la cápside del CTV

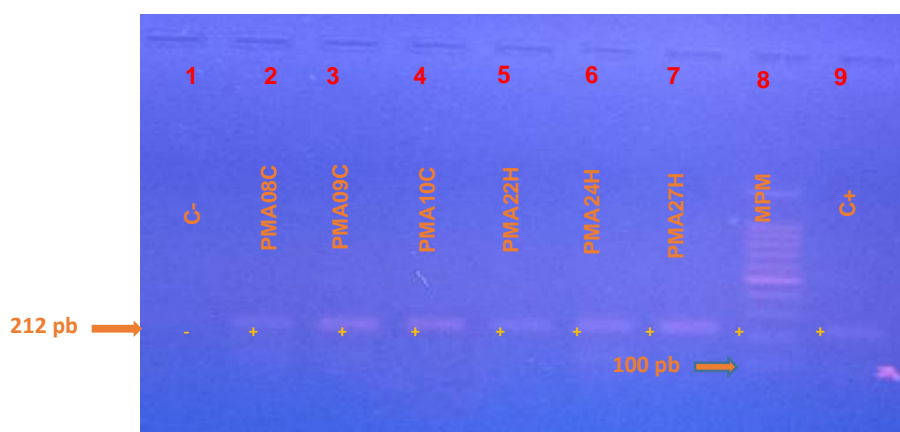
La amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de 465 pb del gen actina a partir de ADNc sintetizado con oligo(dT) fue positiva en todas las muestras analizadas. Este resultado confirma la adecuada integridad del ADNc y la eficiencia del proceso de retrotranscripción. Debido a que actina es un gen constitutivo ampliamente conservado en células vegetales, se emplea como control interno para la normalización de la expresión de genes diana y la comparación de los niveles de ARNm entre las diferentes muestras (ver Figura 11).

Figura 11. Amplificación del gen constitutivo de Actina



La amplificación del gen de la proteína de la cápside (CP) del Virus de la tristeza de los cítricos (CTV), perteneciente al género Closterovirus, se observó en las siete muestras de ADNc obtenidas por retrotranscripción. La RT-PCR realizada con los iniciadores nCTV-F y nCTV-R generó un amplicón de aproximadamente 212 pb en muestras de *Neltuma pallida* con diferentes grados de severidad del síndrome de decaimiento. El tamaño esperado del fragmento amplificado fue confirmado mediante un marcador de peso molecular de 1 kb. En algunos carriles las bandas se observaron con menor intensidad, lo que podría asociarse a bajas concentraciones del producto amplificado, fragmentación del ARN, variaciones en la eficiencia de amplificación o condiciones de visualización en el gel (ver Figura 12).

Figura 12. Amplificación del gen de la proteína de la cápside del CTV



La amplificación inespecífica o la presencia de secuencias virales endógenas (EVEs) en el genoma de la planta, pueden presentar similitud con genes virales funcionales y ser amplificadas por iniciadores diseñados para detectar virus,

generando productos de PCR que no corresponden necesariamente a infecciones virales activas o secuencias homólogas del hospedero, lo cual explicaría la detección por RT-PCR y su ausencia en el análisis metatranscriptómico de RNA-seq (Boutanaev & Nemchinov, 2021; Wang et al., 2024).

Tabla 9.

Secuencias amplificadas para CTV por Sanger

| Código | Descripción | Especie | Puntuación Máxima | Puntuación Total | Valor E | Cobertura de Consulta (%) | % de Identidad | Accesión |
|---------------|--|---------|-------------------|------------------|---------|---------------------------|----------------|-------------------|
| <u>PMA10C</u> | Gen de la proteína de cubierta Bhu-Ts-14 (P25) del aislado del CTV | CTV | 237 | 237 | 2e-63 | 100 | 96,55 | <u>MN366297.1</u> |

4.2 Secuenciamiento

Las secuencias obtenidas por secuenciación de Sanger del producto amplificado por PCR correspondiente a la muestra PMA10 fueron analizadas mediante BLAST. El análisis mostró una identidad nucleotídica máxima de 96,55 % y una cobertura del 100 % con secuencias reportadas de virus pertenecientes a la familia Closteroviridae, incluyendo aislamientos del Citrus tristeza virus (CTV). Este resultado se obtuvo tanto mediante el análisis directo como utilizando un filtro taxonómico específico para Closteroviridae (taxid: 69973) (ver Tabla 9).

El amplicón analizado presentó una longitud de 212 pb, correspondiente a la región amplificada con los iniciadores nCTVF/nCTVR. A continuación, se muestra la secuencia nucleotídica obtenida a partir de la muestra proveniente del norte del Perú:

Secuencia: H201222-020_E07_02CV_nCTVF.ab1 (212 pb)

GATGAACGAATTGCGTCAGTTGAGTACCCAACAGCACGCTGCCTTTGACAGAGAC
 TTTCTTCTTTACTTTGAAAGGGAAGCATCCCTAACTTACCTGATAAAGATAAGGA
 CTTCTCACATAGCTATGATGTTGTATCGTTTAGCAGTTAAGAGTTCATCATTACAAA
 GCGATGACGACACCACGGGCATAACGTACACTCGGAGGGTGTGAA

No obstante, el nivel de identidad obtenido corresponde a un fragmento parcial del genoma viral, por lo que este valor no resulta suficiente para confirmar de manera concluyente la presencia específica de CTV en *Neltuma pallida*, siendo necesario complementar la evidencia con secuencias de mayor longitud o con análisis genómicos adicionales.

Si bien, mediante RT-PCR se obtuvo una amplificación positiva con los iniciadores nCTVF y nCTVR, generando un amplicón de aproximadamente 212 pb, que en la secuenciación Sanger mostró 96,55 % de identidad con secuencias reportadas del closterovirus que infecta *Neltuma*. El hecho que este virus no fue detectado en el análisis transcriptómico mediante RNA-Seq, sugiere que la amplificación observada no es suficiente, por sí sola, para confirmar de manera inequívoca la infección específica por dicho closterovirus.

Por un lado, esta diferencia puede atribuirse a un bajo nivel de infección viral en el tejido analizado, lo que habría permitido su detección mediante una técnica altamente sensible y dirigida como la RT-PCR, pero no su identificación a través de un enfoque no dirigido como el RNA-Seq. En este contexto, se ha demostrado que la RT-PCR es capaz de detectar cantidades extremadamente bajas de ARN viral, incluso cuando estas se encuentran por debajo del umbral requerido para el ensamblaje o la anotación confiable de secuencias virales en análisis transcriptómicos masivos (Adams et al., 2009; Wu et al., 2015).

No obstante, el nivel de similitud obtenido (96,55 %) corresponde a una región parcial del genoma viral y no alcanza los valores generalmente aceptados para una asignación taxonómica específica concluyente en virología vegetal. Identities inferiores al 98–99 % en fragmentos cortos pueden reflejar la amplificación de variantes no caracterizadas, virus filogenéticamente cercanos o productos inespecíficos, particularmente cuando se emplean cebadores de carácter genérico (Simmonds et al., 2017).

En este sentido, no puede descartarse la posibilidad de contaminación cruzada proveniente de otra fuente de ARN capaz de amplificarse con los iniciadores nCTVF/nCTVR diseñados para detectar un amplio rango de closterovirus. Esta

falta de especificidad puede verse exacerbada por condiciones subóptimas de amplificación, como una temperatura de hibridación baja, favoreciendo la unión inespecífica de los cebadores y la generación de falsos positivos (Bustin et al., 2009).

Adicionalmente, la ausencia del closterovirus en los datos de RNA-Seq podría estar relacionada con diversos factores metodológicos, tales como una profundidad de secuenciación insuficiente, una baja proporción de ARN viral en relación con el ARN total del hospedero o la degradación diferencial del ARN viral. Asimismo, se ha reportado que problemas de especificidad en regiones genómicas altamente variables, en particular en el extremo 5', pueden limitar tanto la detección bioinformática como la correcta asignación taxonómica de virus de plantas (Massart et al., 2014). De manera adicional, la posible presencia de secuencias virales integradas en el genoma del hospedero podría generar señales positivas espurias en ensayos de RT-PCR convencional (Feschotte & Gilbert, 2012).

De acuerdo con las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF, 2016), la RT-PCR convencional para la detección de Citrus tristeza virus (CTV) presenta limitaciones importantes en términos de sensibilidad y especificidad. Dichas normas recomiendan el uso de RT-PCR con inmunocaptura (IC-RT-PCR) empleando anticuerpos policlonales o monoclonales específicas para CTV, dado que la RT-PCR convencional sin inmunocaptura puede no ser suficientemente sensible y generar resultados no concluyentes. Además, los inhibidores en tejidos vegetales pueden afectar significativamente la eficiencia de la transcripción reversa y la amplificación, incrementando la probabilidad de resultados inconsistentes (EPPO, 2016).

No obstante, estas limitaciones, la aplicación de RNA-Seq continúa siendo una herramienta de alto valor para el estudio de interacciones hospedero-patógeno, ya que permite una detección amplia y no sesgada de virus, así como la caracterización simultánea de la respuesta transcriptómica del hospedero. En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la complementariedad entre técnicas dirigidas (RT-PCR/Sanger) y no dirigidas (RNA-Seq), resaltando que la ausencia de detección viral mediante RNA-Seq no necesariamente

implica la ausencia del virus, sino que puede reflejar niveles de infección bajos, transitorios o limitaciones inherentes a cada metodología (Barba et al., 2014; Massart et al., 2017).

5. Indexado

5.1 Crecimiento de brotes (cm)

El ANOVA (ver Tablas 12, y 13 del Anexo) del ritmo promedio diario de crecimiento (RPDC) de los nuevos brotes en diferentes periodos de observación después de la poda total, indica que, en ambos casos, todos los tratamientos en las dos fases fueron estadísticamente iguales, sin diferencias entre ellos. Los resultados de la prueba comparativa de medias de Duncan indican que no hubo diferencias significativas en el crecimiento de los brotes (ver Tabla 10).

Tabla 10.

Prueba de Duncan: ritmo promedio de crecimiento (cm) de brotes ($\alpha=0,0$)

| Tratamientos | Primera defoliación de los plantones | Segunda defoliación de los plantones |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Indexado de Árboles en Estado Inicial de Decaimiento (IAEID) | 1,6775 a | 3,5475 a |
| Indexado de Árboles en Estado termedio de Decaimiento (IAEIntD) | 1,7100 a | 1,0800 a |
| Indexado de Árboles en Estado Avanzado de Decaimiento (IAEAD) | 1,8376 a | 0,9325 a |
| Indexado de Plantones Sanos (IPS) | 2,0400 a | 1,0425 a |
| Sin Indexado (SI) | 1,7200 a | 0,6475 a |

Figura 13. Curva de crecimiento de brotes después de la primera

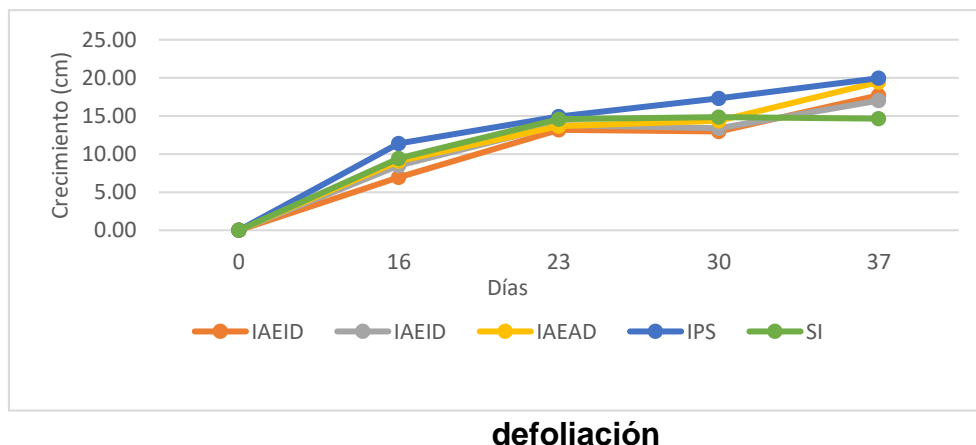
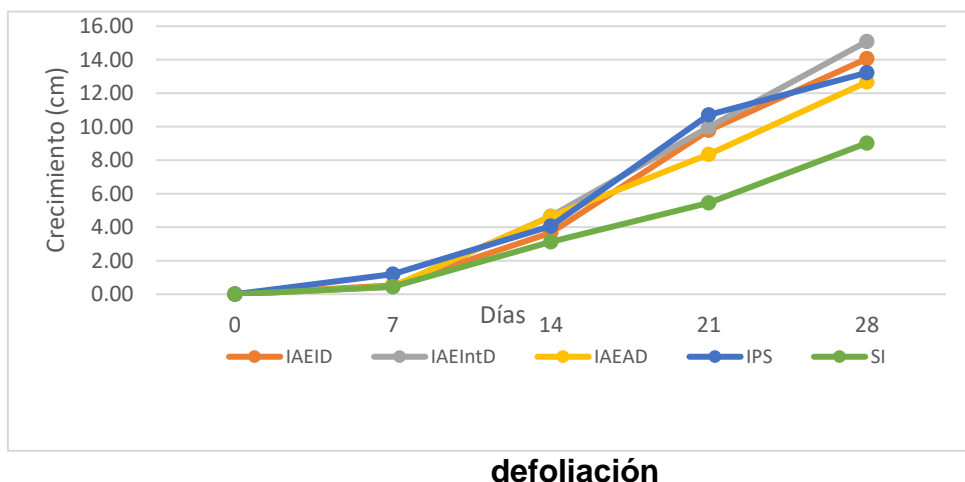


Figura 14. Curva de crecimiento de brotes después de la segunda



El crecimiento de los brotes 62 días después del indexado y 37 días después de la primera defoliación total varió desde 14,65 cm en el Testigo sin indexado (SI) hasta 19,96 cm en el Testigo indexado con plantón sano (IPS) (Ver Fig. 13).

El crecimiento 90 días después del indexado y 28 días después de la segunda defoliación total, varió desde 9,02 cm en el Testigo sin indexado (SI) hasta 15,09 cm en el tratamiento Indexado de Árboles en estado avanzado de decaimiento (Ver Figura 14).

5.2 Aspecto externo del follaje de los plantones

En las Figuras 15a-e, 41 días después del indexado (DDI) y 16 días después de la primera defoliación y despunte (DDPD), se observan los nuevos brotes con buen aspecto del follaje, verde y en apariencia sanos en todos los tratamientos.

Las Figuras 15f-j muestran que a 48 DDI y 23 DDPD, los nuevos brotes seguían creciendo en todos los tratamientos, con buen aspecto del follaje y sin síntomas de enfermedad.

Las Figuras Fig. 15k-ñ, muestran que a 55 DDI y 30 DDPD, los brotes sanos y con buen aspecto.

En las Figuras 15o-s, se visualiza que a 62 DDI y 37 DDPD, los nuevos brotes crecieron sanos, con buen aspecto del follaje y sin presencia de síntomas de enfermedades.

Terminada esta evaluación, se realizó la segunda defoliación de todos los plántones.

69 DDI y 07 días después de la segunda defoliación (DDSD), las Figuras 16a-e, muestran que los primeros y pequeños brotes de todos los tratamientos seguían mostrando un buen aspecto del follaje, verde y en apariencia sanos.

Las Figuras 16f-j, a 76 DDI y 14 DDSD, siguen mostrando nuevos brotes crecieron normalmente en todos los tratamientos y con un buen aspecto del follaje.

Igualmente, en las Figuras 16k-ñ y 16p-s se observa que a 83 DDI y 21 DDSD y a 90 DDI y 28 DDSD, seguían creciendo notoriamente, con buen aspecto y sanos y sin síntomas de enfermedades.

Un importante aspecto que no se tuvo en cuenta fue la temperatura, teniendo en cuenta que los ensayos preliminares se iniciaron desde el mes setiembre del 2024 y se prolongaron hasta febrero del 2025, meses en que las temperaturas internas pueden superar los 30°C en horas de la tarde en el tinglado de la UDEP con malla raschel. De acuerdo a Rostaicher (1991), en ensayos de indexado con el CTV, la temperatura de mantenimiento es 24-27 °C es y la temperatura mínima es 18-21 °C, condiciones con las que los primeros síntomas aparecen en 3 a 5 semanas. Según el mismo autor, el CTV a temperaturas altas se inactiva.

De acuerdo a NIMF (2016), el CTV se transmite con facilidad a nivel experimental al injertarse sobre cítricos sanos el material vegetal infectado, es una técnica antigua y confiable que consistentemente confirma la presencia o ausencia de un patógeno transmisible.

no transmisibilidad de enfermedad durante los 90 días de estudio corrobora los resultados del ARNseq obtenidos por Azenta y los resultados del secuenciamiento por MacroGen.

Roistacher (1991), afirma que los primeros síntomas del CTV aparecen en hojas jóvenes y maduras de lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) como: aclarmiento de venas, moteado foliar leve, ahuecamiento de las hojas, acorchamiento de venas, picaduras de los tallos y retraso del crecimiento. Tampoco se evidenciaron cambios fisiológicos, a pesar de haber defoliado totalmente los plántones en dos oportunidades.

Los resultados obtenidos con el indexado refuerzan los resultados obtenidos por la plataforma ilumina del ARNseq que, no encontró secuencias de Closterovirus activos en el ARN del algarrobo, objetivo de este estudio.

Figura 15. Aspecto del follaje después de la primera defoliación



Figura 16. Aspecto del follaje después de la segunda defoliación



6. CONCLUSIONES

Conclusión general

El análisis metatranscriptómico mediante secuenciación de próxima generación (RNA-seq Illumina), complementado con secuenciación Sanger y pruebas de indexado biológico, no evidenció la presencia de virus transmisibles ni de virus episomales en *Neltuma pallida*, incluidos miembros de la familia Closteroviridae. En consecuencia, los resultados obtenidos no sustentan la hipótesis de que closterovirus estén asociados con el síndrome de decaimiento y muerte del algarrobo evaluado en este estudio.

Conclusiones específicas

1. El síndrome de decaimiento del algarrobo se caracteriza por muerte regresiva de ramillas que progresa hacia ramas de mayor tamaño, acompañada de descortezamientos longitudinales, estallamientos del cambium y perforaciones en tronco y ramas.
2. El ARN extraído del cambium presentó mayor calidad que el obtenido de hojas. Aunque los valores de RINe indicaron cierto grado de degradación, la proporción de fragmentos mayores de 200 nt permitió su utilización en la construcción de librerías de RNA-seq.
3. El análisis de RNA-seq y el ensamblaje de contigs no evidenciaron virus episomales en *N. pallida*. Las secuencias con similitud viral detectadas correspondieron a elementos virales endógenos y las lecturas mostraron predominio de asignaciones bacterianas.
4. El 96,55 % de similitud obtenido mediante secuenciación Sanger y los resultados del indexado biológico no confirmaron la presencia ni la transmisibilidad de un closterovirus asociado al decaimiento del algarrobo.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios basados en secuenciación de ARN pequeños (small RNA-seq) para detectar virus de ARN mediante el análisis de ARN interferentes derivados de virus (vsiRNA), lo que permitiría identificar infecciones virales de baja abundancia o altamente divergentes no detectadas por RNA-seq convencional.
2. Continuar las investigaciones sobre posibles agentes etiológicos no virales, mediante el aislamiento e identificación de hongos y bacterias asociados a tejidos sintomáticos de *Neltuma pallida*, complementando estos estudios con pruebas de patogenicidad.
3. Desarrollar estudios de transcriptómica comparativa mediante secuenciación de nueva generación, con el fin de identificar genes y rutas metabólicas asociadas a respuestas de estrés en árboles afectados por el síndrome de decaimiento.
4. Evaluar el carácter multifactorial del síndrome de decaimiento, investigando la posible interacción entre estrés hídrico, insectos xilófagos barrenadores y hongos lignolíticos asociados a pudrición del duramen.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., & Boonham, N. (2009). *Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology*. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537–545. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545>
- Adams, I., & Fox, A. (2016). *Diagnosis of plant viruses using next generation sequencing and metagenomic analysis*, *Current Research Topics in Plant Virology*, eds. A. Wang and X. Zhou (Cham: Springer), 323–335. doi: 10.1007/978-3-319-32919-2_1
- Adiconis, X., Borges-Rivera, D., Satija, R., DeLuca, D. S., Busby, M. A., Berlin, A. M., Sivachenko, A., Thompson, D. A., Wysoker, A., Fennell, T., Gnirke, A., Pochet, N., Regev, A., & Levin, J. Z. (2013). *Comprehensive comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low input samples*. *Nature Methods*, 10(7), 623–629. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2483>
- Adkar-Purushothama, C. R., Maheshwar, P. K., Sano, T., & Janardhana, G. R. (2011). *A sensitive and reliable RT-nested PCR assay for detection of Citrus tristeza virus from naturally infected citrus plants*. *Current Microbiology*, 62(5), 1455–1459. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9883-7>
- Agilent Technologies. (2015). *Agilent 4200 TapeStation System: RNA ScreenTape assay user guide* (Publication No. G2991-90310). Agilent Technologies.
- Agilent Technologies. (2023). *RNA quality assessment using automated electrophoresis* (Publication No. 5994-7327EN). <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/overview-rna-quality-automated-electrophoresis-5994-7327EN-agilent.pdf>
- Agilent Technologies. (2025). *RNA Screen Tape Assay for TapeStation Systems Quick Guide*. [/https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/RNA_QuickGuide.pdf?srsId=AfmBOoq914aAzbJFooWcATEBaO8MEORy2TnkUYLYxDdD61IHAdf0yUMH](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/RNA_QuickGuide.pdf?srsId=AfmBOoq914aAzbJFooWcATEBaO8MEORy2TnkUYLYxDdD61IHAdf0yUMH)

- Agindotan, B., & Peery, K.L. (2007). *Macroarray Detection of Plant RNA Viruses Using Randomly Primed and Amplified Complementary DNAs from Infected Plants*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0119>
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Ed. Department of Plant Pathology University of Florida. Elsevier Academic Press. 922 p.
- Aguilera, R. (2014). *Algarrobo tropical (Prosopis pallida): Recurso biológico estratégico para la sostenibilidad del bosque tropical seco. Caso: Comunas provincia de Santa Elena – Ecuador*. *Revista Desarrollo Local Sostenible*, 7(20). <https://ojs.revistadelos.com/ojs/index.php/delos/article/view/244>
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., & Rowhani, A. (2009). *Deep sequencing analysis of RNAs from a Grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a Novel virus*. *Virology* 387, 395–401. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.028
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). *Biología molecular de la célula*. Tercera Edición. Ed. Omega. Reino Unido: Garland Publishing.
- Álvarez, L. A., Pérez-Sierra, A., García-Jiménez, J. & Javier-Alva, J. (2007). *Bleeding Canker on Mesquite in Peru caused by Phytophthora syringae*. *Plant Disease / Vol. 91 No. 2*. DOI: 10.1094/PDIS-91-2-0226A
- Ayanu, Y., Jentsch A, Müller-Mahn, D., Rettberg, S., Romankiewicz C., Koellner, T. (2015) *Ecosystem engineer unleashed: Prosopis juliflora threatening ecosystem services?* *Regional Environmental Change* 15(1): 155–167. <https://doi.org/10.1007/s10113-014-0616-x>
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). *Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology*. *Viruses*, 6(1), 106–136. <https://doi.org/10.3390/v6010106>
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., & Gonzalves, D. (1970). *The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses*. *Adv. Virus Res.* 25: 93-168.
- Bayardo, M.P., & Bárcena, A. (2025). *Métodos para analizar ácidos nucleicos*. Métodos instrumentales básicos para muestras agroforestales. Fundamentos y procedimientos para el análisis de muestras en el laboratorio Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP.

[/https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/179557/Documento_completo.pdf?sequence=1](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/179557/Documento_completo.pdf?sequence=1)

- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., ... & Smith, A. J. (2008). *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. *Nature*, 456, 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>
- Berry, R., Livesly, S.J., & Aye, Lu. (2013). *Tree canopy shade impacts on solar irradiance received by building walls and their surface temperature*. *Building and Environment*, vol. 69, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2013.07.009>
- Boutanaev, A. M., & Nemchinov, L. G. (2021). Genome-wide identification of endogenous viral sequences in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Virology Journal*, 18, 185. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01650-9>
- Breitwieser F.P, & Salzberg S.L. (2020). *Paving: Interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification*. *Bioinformatics*. 15;36 (4):1303-1304. doi: 10.1093/bioinformatics/btz715. PMID: 31553437; PMCID: PMC8215911
- Bruenn, J. A., Warner, B. E., & Yerramsetty, P. N. (2015). *Widespread dual reproductive strategies in plant mitochondria and their host–virus interactions*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 740. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00740>
- Bruijns, B., Hoekema, T, Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). *Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods*. *Analytica* 3, 371-384. <https://doi.org/10.3390/analytica3030025>
- Burkart, A. (1976). *A Monograph of the Genus Prosopis (leguminosae Subfam. Mimosoideae)*. *Journal of the Arnold Arboretum*. 1976, vol. 57, n° 4, p. 450–525. <https://www.jstor.org/stable/43781999>.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). *The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

- Cairati, E. (2013). *Historia cultural del algarrobo, desde la cuenca del Mediterráneo hasta la costa norte de Perú*. [Tesis de maestría, Università degli Studi di Milano]. <https://www.academia.edu/attachments/xyz>
- Calderón Moncca, M. G., Gonzáles Galván, K. G., & González Salinas, R. A. (2023). *Diseño del modelo de laboratorio especializado en enfermedades de cultivos agrícolas – Laboratorio de Fitopatología a través de un caso de estudio*. *Informes de la Construcción*, 75(569), 481. <https://doi.org/10.3989/ic.91118>
- Cann, A. J. (2005). *Principles of molecular virology* (4.^a ed.). Elsevier Academic Press.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fiere, N., & Knight, R. (2011). *Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Suppl 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cardich Briceño E. (1997). "Una historia sobre los quilates y los algarrobos. Aspectos naturales, culturales e históricos del algarrobo", *Plural. Revista del Programa de Estudios Generales de la Universidad de Lima*, 4-5, pp. 103-111. <http://blog.pucp.edu.pe/item/157929/los-algarrobos-en-el-peru>
- Castaño Zapata, J. (2017). Conferencia Magistral: Conceptos básicos de fitoepidemiología. *Revista Palmas*. Bogotá (Colombia), 38 (4): 67 – 70.
- Caycho Ortiz, E.N. (2023). *Ensamblaje, anotación y análisis del genoma cloroplastidial del árbol de algarrobo Neltuma pallida (subfamilia: Caesalpinioideae)*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>
- Chalmers, M.J., Gaskell, S.J. (2000). *Advances in mass spectrometry for proteome analysis*. *Curr Opin Biotechnol*, 1(4):384-90. doi: 10.1016/s0958-1669(00)00114-2. PMID: 10975458.
- Chipana Auris, K.G. (2019). *Ocurrencia estacional de un Cecidomyiidae en Algarrobo (Prosopis pallida) H.B.K. en Pacasmayo – Perú*. [Tesis de pregrado Universidad Nacional Agraria La Molina]. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNAL_0f270212cec7d1d2111e20848f0752c0/Details

- Clavijo, B.J. (2018). *k-mer counting, part I: Introduction*. <https://bioinfologics.github.io/post/2018/09/17/k-mer-counting-part-i-introduction/>
- Cruzado, J., Chávez-Villavicencio, L., Lautaro, C. y Charcape-Ravello, J.M. (2019). *Uso y selección de las partes aéreas del algarrobo *Prosopis pallida* (Fabaceae) por reptiles, aves y mamíferos en Sechura (Piura – Perú)*. Revista peruana de Biología. 2019, 26(1), 81–86. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15417>.
- Dal Bó, E. (2020). Virus fitopatógenos. P. A. Balatti & C. I. Mónaco (Coords.), *Introducción a la fitopatología vegetal (127–157)*. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata.
- De La Torre-Almaráz, R., Cota-Trujillo, F. M., García-Rojas, J. L., Campos, J. E., & San-Martín, F. (2009). *Etiología de la muerte descendente del mezquite (*Prosopis laevigata* L.) en la Reserva de la Biósfera del Valle de Zapotitlán, México*. Agrociencia, 43(2), 197-208.
- Depenthal, J., & Meitzner Yoder, L.S. (2017). *Community Use and Knowledge of Algarrobo (*Prosopis pallida*) and Implications for Peruvian Dry Forest Conservation*. Revista de Ciencias Ambientales. 2017, vol. 52, nº1, 49. DOI: <http://dx.doi.org/10.15359/rca.52-1.3>.
- Díaz Celis, A. (1995). *Los Algarrobos*. CONCYTEC, Lima, Perú.
- Dolja, V. V., Kreuze, J. F., & Valkonen, J. P. T. (2020). *Family Closteroviridae*. A. M. Q. King et al. (Eds.), *Virus taxonomy: 10th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (1069–1087)*.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre M.I., y Weigend, M. (2012). *Hoja botánica: Algarrobo *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth*. <https://repositoriodigital.minam.gob.pe/bitstream/handle/123456789/184/BIV01201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Egan, A., Schlueter, J., Spooner, D. (2012). *Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology*, American Journal of Botany 99 (2): 175-185.
- EPPO. (2016). PM 7/31 (2) *Citrus tristeza virus*. EPPO Bulletin, 46(1), 68–86. <https://doi.org/10.1111/epp.12267>
- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN). (2018). *Histología 1: Meristemas*. Universidad Nacional de Cuyo. <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/clase-132018-histologiameristemas.pdf>

- Feschotte, C., & Gilbert, C. (2012). *Endogenous viruses: Insights into viral evolution and impact on host biology*. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrg3199>
- Fisher Scientific. (s.f.). *Invitrogen™ Solución de estabilización RNAlater™*. <https://www.fishersci.es/shop/products/ambion-rna-i-later-i-stabilization-solution-7/10594445>
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., Gurr, S.J. (2012). *Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health*. *Nature* 484: 186-194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Fleige, S., Pfaffl, M.W. (2006). *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. *Molecular Aspects Med.* 27(2-3):126-39. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.003.
- Food and Agriculture Organization [FAO]/International Plant Protection Convention [IPPC]. (2014). *Protocolos de diagnóstico para el virus tristeza de los cítricos (Citrus tristeza virus – CTV) (PD 01)*. FAO/IPPC.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (s. f.). *Las especies del género Prosopis (algarrobos) de América Latina con énfasis en aquellas de interés económico*. <https://www.fao.org/4/ad314s/ad314s08.htm>
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (6th ed.). Wiley-Blackwell.
- Fuchs, M., Bar-Joseph, M., Candresse, T., Maree H.J., Martelli, G.P., Melzer, M.J., Minafra, A., Sabanadzovic, S., & ICTV Report Consortium. (2020). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Closteroviridae*. *Journal of General Virology* 101:364–365. DOI 10.1099/jgv.0.001397.
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). *A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants*. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Gao, M., Xiong, C., Gao, C., Tsui, C.K.M., Wang, M.M., Zhou, X., Zhang A.M., & Cai, L. (2021). *Disease-induced changes in plant microbiome assembly and functional adaptation*. Gao et al. *Microbiome*, 9:187. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01138-2>

- Garber, M., Grabherr, M., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). *Computational Methods for Transcriptoma Annotation and Quantification Using RNAseq*. *Nature Methods* 8: 469-478, EE.UU., 2011.
- García Palomo, J.D., Agüero Balbín, J., Parra Blanco, J.A., Santos Benito, M.F. (2010). *Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación*. *Medicine (Madr)*. 10(49):3251-3264. Spanish. doi: 10.1016/S0304-5412(10)70027-5.
- Garnsey, S. M., Permar, T. A., Cambra, M., & Henderson, C. T. (1993). Procedures for biological, serological, and molecular diagnosis of citrus tristeza virus. In P. Moreno, J. V. da Graça, & R. K. Yokomi (Eds.), *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (pp. 193–197). IOCV.
- Geering, A. D., Maumus, F., Copetti, D., Choisine, N., Zwickl, D. J., Zytnicki, M., McCombie, W. R., Vauthier, V., Jeschke, H. J., Teycheney, P. Y., & Quesneville, H. (2014). *Endogenous florendoviruses are major components of plant genomes and record past exposures to pararetroviruses*. *Nature Communications*, 5(1), 5269. <https://doi.org/10.1038/ncomms6269>
- GenTegra. (2017). *A Guide to Ambient Storage of DNA and RNA. Active Chemical Protection*. https://lobov.com.br/downloads/literatura/gentegra/a_guide_to_ambient_storage_of_dna_and_rna_first_edition.pdf
- Gergerich R.C. & Dolja, V.V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
- Giraud, T., Gladieux, P., & Gravilets, S. (2010). *Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation*. *Trends Ecol. Evol.* 25: 387-395. doi: 10.1016/j.tree.2010.03.006
- Gironella, M. (2010). *Transcriptómica (mARN y miR). Nuevos métodos de diagnóstico molecular. Grupo de Oncología Gastrointestinal y Pancreática*. CIBERehd. Hospital Clínic. Barcelona. España, 9(4):169-163.

- Greninger, A. L. (2018). *A decade of RNA virus metagenomics is (not) enough*. *Virus Research*, 244, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.014>
- Guo, J., Xu, N., Li, Z., Zhang, S., Wu, J., Kim, D., M. Marma, M., Meng, Q., Cao, H., Li, X., Shi, S., Yu, L., Kalachikov, S., Russo, J., Turro, N., Ju, J. (2008). *Four-Color DNA Sequencing with 32 -O-Modified Nucleotide Reversible Terminators and Chemically Cleavable Fluorescent Dideoxynucleotides*, *PNAS* 105 (27): 9145-9150.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., & Barba, M. (2016). *Next-generation sequencing and genome editing in plant virology*. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1325. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01325/BIBTEX>
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., Jr., & Geneve, R. L. (2011). *Plant propagation: Principles and practices* (8th ed.). Prentice Hall.
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusic, A. (2017). *Multi-omics approaches to disease*. *Genome Biology*, 18, 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Henry, R. J. (2014). *Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species*. *Plant methods*, 10(1), 21. [/https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1746-4811-10-21.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1746-4811-10-21.pdf) <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.043>
- Hughes, C.E., Ringelberg, J.J., Lewis, G.P. & Catalano S.A. (2022). *Desintegration of the genus Prosopis. (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade)*. *PhytoKeys* 205: 147-189. <https://dx.doi.org/10.3897/phytokeys.205.75379>
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5th ed.). Academic Press.
- Hunziker, J. H., Poggio, L., Naranjo, C.A. Palacios, R.A. (1975) Cytogenetics of some species and natural hybrids in *Prosopis* (Leguminosae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* ,17, 253-262.
- illumina (2016). "Evaluating RNA Quality from FFPE Samples". *Guidelines for obtaining high-quality RNA sequencing results from degraded RNA with Illumina RNA enrichment assays*. (Technical Note: RNA Sequencing). Illumina Inc.

- Illumina. (2025a). *Sequencing by synthesis (SBS) technology*. <https://www.tst-web.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html>
- Illumina. (2025b). *TruSeq RNA Library Prep Kit v2: Input quantity specifications*. Illumina Inc. <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-rna-v2.html>
- Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., Mueller, O., Schroeder, A. & Auffray, C. (2005). *Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces*. <https://doi.org/10.1093/nar/gni054>
- Investigación y Capacitación en Biotecnología Molecular [INCABIOTEC]. (2020). *Primer reporte de presencia de virus en "Algarrobo" (Prosopis spp.)*. Mediante MALDI TOF/TOF.
- Investigación y Capacitación en Biotecnología Molecular [INCABIOTEC]. (2021). *Consultoría para el desarrollo de un método de análisis molecular basado en ácidos nucleicos para el diagnóstico de virus de la familia Closteroviridae en árboles de algarrobo (Prosopis spp.)*. Tumbes, Perú.
- Jiménez Díaz, R. M. (2017). *Las enfermedades de las plantas: impactos, amenazas y control*. Boletín de la Real Academia de Córdoba, BRAC, 166:11.130.
<https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/17828/P%C3%A1ginas%20desdeBRAC-14.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Joo-jin, J., Ho-jong J., and Jaejong, N. (2014). *A Review of Detection Methods for the Plant Viruses*. Research in Plant Disease. 20:173-181.
<http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
- Ju, J., Kim, D., Bi, L., Meng, Q., Bai, X., Li, Z., Li, X., Marma, M., Shi, S., Wu, J., Edwards, J., Romu, A., N. Turro. (2006). *Four-Color DNA Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators*. PNAS 103: 19635-19640.
- Juárez-Noé, G., y Gonzales –Coronado, U. (2020). *Lista taxonómica actualizada de los insectos asociados a Prosopis pallida (Humb. & Bonpl. ex. Wild.) Kunth (Fabaceae) de la region Piura, Perú*. Graellsia 76 (2). <https://graellsia.revistas.csic.es/index.php/graellsia/article/view/624>

- Katzourakis, A., & Gifford, R. J. (2010). *Endogenous viral elements in animal genomes*. PLoS Genetics, 6(11), e1001191. <https://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1001191&type=printable>
- Koenen EJ, Kidner C., de Souza É.R..., Simon M.S., Iganci J.R., Nicholls J.A., Brown G.K., Queiroz L.P. de, Luckow M., Lewis G.P., Pennington R.T., Hughes C.E. (2020). *Hybrid capture of 964 nuclear genes resolves evolutionary relationships in the mimosoid legumes and reveals the polytomous origins of a large pantropical radiation*. American Journal of Botany 107(12): 1710–1735. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1568>
- Kometter, R., & Reynel, C. (2022). *Los Bosques de "Algarrobo (Prosopis spp) Están Muriendo en la Costa Norte del Perú ¿Qué Hacer?* <https://www.researchgate.net/publication/366204932>
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., et al. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388, 1–7. doi: 10.1016/j.virol.2009.03.024
- Lee, B.J., Kwon, S. J., Kim, S. K., Kim, K. J., Park, C.J., Kim, Y.J., Park, O.K., Paek, K.H. (2006). Functional study of hot pepper 26S proteasome subunit RPN7 induced by Tobacco mosaic virus from nuclear proteome analysis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 351 (2): 405-411. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.071>
- Lesney, M.S. and Felker, P. (1995) Two field and greenhouse diseases of *Prosopis* (mesquite). *Journal of Arid Environments* 30:417-422.
- Li, P.D., Zhu, Z.R., Zhang, Xu, J., Wang, H., Wang, Z., Li, H. (2022). The phyllosphere microbiome shifts toward combating melanose pathogen. *Microbiome* 10, 56. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01234-x>
- Llontop Llaque, J.A. (2013). Impactos del cambio climático y medidas de adaptación para la conservación del bosque seco y sostenibilidad de la cadena de valor de derivados de algarroba en la Región Piura. GOBIERNO REGIONAL DE PIURA [GORE]-GIZ
- López, M.M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M.T., Llop, P., Penyalver, R., Cambra, M. (2003). Innovative tools for detection of plant

- pathogenic viruses and bacteria. *Int Microbiol* 6: 233–243 DOI 10.1007/s10123-003-0143-y
- Manchester, K.L. (1996) Use of UV Methods for Measurement of Protein and Nucleic Acid Concentrations, *BioTechniques*, 20:6, 968-970, DOI: 10.2144/96206bm05
- Martínez Barnetche, J. (2007). La bioinformática como herramienta para la investigación en salud humana. *Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca, México*, 49: 64-66. <https://www.redalyc.org/pdf/106/10649028.pdf>
- Massart, S., Chiumenti, M., De Jonghe, K., Glover, R., Haegeman, A., Koloniuk, I., Komínek, P., Kreuze, J., Kutnjak, D., Lotos, L., Maiss, E., Marais, A., Olmos, A., Pappi, P., Rwahni, M., Saldarelli, P., Škorić, D., Vainio, E. J., & Wetzel, T. (2017). Virus detection by high-throughput sequencing of small RNAs: Large-scale performance testing of sequence analysis strategies. *Phytopathology*, 107(9), 1046–1056. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0067-R>
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., & Candresse, T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.029>
- Matsubara, T., Soh J., Morita, M., Uwabo, T., Tomida, S., Fujiwara, T., Kanazawa, S., Toyooka, S., & Hirasawa, A. (2020). DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing. *Biomed Res Int*. 9349132. doi: 10.1155/2020/9349132. PMID: 32185225; PMCID: PMC7063185.
- Mehta, A., Brasileiro, A.C.M., Djair, D.S.L. Souza, Romano, E., Campos, M.A., Grossi-de-Sa´, M.F., Silva, M.S., Franco, O.L., Fragoso, R.R., Bevitori, R., & L. Rocha, T. (2008). Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? *FEBS Journal*, 275, 3731–3746. *The Authors Journal compilation. FEBS*. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06528.x
- Metzker, M. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11, 31-46. EE.UU., 2010.
- Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., Bermúdez-Guzmán M. de J. (2018). Evaluación de

- tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9,6. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788>
- Ministerio de Agricultura [MINAGRI]. (2015). *Situación fitosanitaria del algarrobo (Prosopis pallida) en la costa norte del Perú*. Subdirección de Análisis de Riesgo y Vigilancia Fitosanitaria Dirección de Sanidad Vegetal.
- Mormontoy, S. (2015). *Infestación, daños y enemigos naturales del “psílido del algarrobo” Heteropsylla texana Crawford (Hemiptera- Psyllidae) en el bosque seco de la comunidad de Tongorrape – Motupe – Lambayeque* [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2103>
- Mostacero León, J., Mejía, F, Zelada, W. & Medina, C. (2007). *Biogeografía del Perú* (1ª. Ed.). Primera Edición. Asamblea Nacional de Rectores.
- Mostacero León, José. (2011). *Plantas medicinales del Perú: taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica* (1ª. Ed.). Asamblea Nacional de Rectores.
- Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Nagalakshmi, O.U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder M. (2008). The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing, 320(5881), 1344-1349.
- Nazarov, P. A., Baleev, D. N., Ivanova, K. I., Sokolova, L. M., & Karakozova, V. (2020). Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection. *Acta Nature* 12(3), 4659. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7604890/pdf/AN20758251-12-03-046.pdf>
- Nibert, M. L., Vong, M., Fugate, K. K., & Debat, H. J. (2018). Evidence for contemporary gene gene transfers from mitovirus-like elements to various plant genomes. *Virus Research*, 243, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.019>
- Nizam, A., Kalath, H., & Kumar A. (2023). A modified method for efficient RNA isolation from mangrove root tissues rich in secondary metabolites. *Biotechniques*. 74(6), 302-316. <https://doi: 10.2144/btn-2022-0078>.

- Normas Internacionales Para Medidas Fitosanitarias [NIMF-27]. (2016). *Protocolo de Diagnóstico 15: Virus de la tristeza de los cítricos*. FAO: Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. [/https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2018/02-012018-01.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2018/02-012018-01.pdf)
- Okin, G.S., y Gillete, D. A. (2001). Distribution of vegetation in wind dominated landscapes: Implications for wind erosion modeling and landscape processes. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, Vol. 106 (9), 9673–9683. <https://doi.org/10.1029/2001JD900052>
- Ongay-Larios, L. & Códiz, G. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. *Mens. Bioquim.* 45: 23-34
- Pasiecznik, N., Felker, P., Harris, P.J.C., Harsh, L.N., Cruz, G., Tewari, J.C., Cadoret, K., and L.J. Maldonado, L.J. (2001). *The Prosopis juliflora-Prosopis pallida Complex: A Monograph*. HDRA, Coventry, UK. DOI:10.1016/S0378-1127(02)00559-5. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378112702005595?via%3Dihub>
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., & Ravnkar, M. (2017). Next Generation Sequencing for Detection and Discovery of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches. *Front. Microbiol.* Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>
- Pérez Silva, M. (2010). Diagnóstico sanitario del arbolado del parque Bicentenario >Siervo de la Nación, Ecatepec, Edo. De Mex. Tesis para obtener el título de Biólogo. UNAM. [/https://ru.dgb.unam.mx/server/api/core/bitstreams/8bf76f02-a0f3-4cbd-9556-bd03e2194cf0/content](https://ru.dgb.unam.mx/server/api/core/bitstreams/8bf76f02-a0f3-4cbd-9556-bd03e2194cf0/content)
- Perú Ecológico. (2009). ALGARROBO (*Prosopis pallida*) Generador de Vida en el Desierto. https://www.peruecologico.com.pe/flo_algarrobo_1.htm
- Porebski, S., Bailey, L.G., & Baum, B.R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15, 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>

- Promega. (s. f.). RQ1 RNase-Free DNase (Technical Bulletin N° 518).
<https://science.umd.edu/biology/cichlid/protocols/RealTime/DNAseProtocol.pdf>
- Quail, M. A., Smith, M. E., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13, Artículo 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>
- Richert-Pöggeler, K. R., et al. (2021). Endogenous viral sequences in plant genomes: from markers of evolution to sources of genetic diversity. *Frontiers in Plant Science*, 12, 651286
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). *RNA: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Roistacher, C.N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus. Hand book for detection and diagnosis. [/https://ia801306.us.archive.org/19/items/bub_gb_9zY1uFGchAgC/bub_gb_9zY1uFGchAgC.pdf](https://ia801306.us.archive.org/19/items/bub_gb_9zY1uFGchAgC/bub_gb_9zY1uFGchAgC.pdf)
- Roossinck, M. J., Martin, D. P., and Roumagnac, P. (2015). Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. *Phytopathology* 105, 716–727. doi: 10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW
- Roy, B.G., DeBlasio, S., Yang, Y., Thannhauser, T., Heck, M., & Fuchs, M. (2023). *Journal of Proteome Research*. 22 (6), 1997-2017 DOI: 10.1021/acs.jproteome.3c00069
- Rubio-Piña, J.A., & Zapata-Pérez, O. (2011). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5).
- Ruíz García, A.B., & Olmos Castelló, A. (2021). La secuenciación masiva en el diagnóstico de virus de cultivos leñosos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) Moncada, Valencia. [/https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/8140/2021_Ruiz_Garc%C3%ADa_La%20Secuenciaci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/8140/2021_Ruiz_Garc%C3%ADa_La%20Secuenciaci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Saladrigas, V., & Claros, G. (2002). Vocabulario inglés español de bioquímica y biología molecular (1ª entrega). *Panace@* Vol. 3 (9-10).

- Salazar Zarzosa, P., Mendieta-Leiva, G., Navarro-cerrillo, R.M., Cruz, G., Grados, N. & Villar, R. (2021). An ecological overview of *Prosopis pallida*, one of the most adapted dryland species to extreme climate events. *Journal of Arid Environments*. 2021, vol. 193, 104576. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104576>
- Salazar, L. F. (1990). Metodología Para La Detección De Virus De Papa: Pasado, Presente Y Futuro. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 3:1-12
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://books.google.com.co/books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sastry, K. S. (2013). Plant virus transmission through vegetative propagules (asexual reproduction). En K. S. Sastry, *Seed-borne plant virus diseases* (pp. 187–214). Springer. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6_9
- Schipor, S., Vladiu, S., Baci, A.L., Niculescu, A.M., Caragheorghopol, A., Iancu, J., Plesa, A., Popescu, A.I., Manda, D. (2016). A comparative Analysis of Three Methods Used for RNA Quantitation. *Romanian Reports in Physics*, Vol. 68, No. 3, P. 1178–1188
- Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., ... Hohn, B. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., & Ragg, T. (2006). The RNA integrity number (RIN) for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7, 3. [/https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1471-2199-7-3.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1471-2199-7-3.pdf)
- Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre [SERFOR]. (2019). Informe del Inventario Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú, Panel 1. Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre – SERFOR. <https://sniffs.serfor.gob.pe/inventarios/#/publicacion/1>

- Serrato Díaz, A., Flores-Renttería, L., Aportela Cortez, J., Sierra-Palacios, E. del C. (2014). CR: reacción en cadena de la polimerasa. https://www.researchgate.net/publication/266856169_PCR_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa
- Shackleton, R.T., Le Maitre, D.C. Pasiecznik, N.M. and Richardson, D.M. (2014). Prosopis: a global assessment of the biogeography, benefits, impacts and management of one of the world's worst woody invasive plant taxa. *AoB Plants* 6: plu0. doi:10.1093/aobpla/plu027
- Shigo, A. L. (1979). Tree decay: An expanded concept. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. Bulletin number 419
- Silva, F. A. C., de Sousa Oliveira, M., de Souza, J. M., & Silva Martins, P. G. (2016). *Plant proteomics and peptidomics in host–pathogen interactions: The weapons used by each side. Current Protein and Peptide Science*, 17, Article 999. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160724192305>
- Silva, J. M., Debat, H. J., & Bejerman, N. (2020). *Endogenous mitoviruses: Not only in fungi, but also in plant genomes. Planta*, 252, 56. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03463-x>
- Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., & Scarpa, A. (2013). DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PLoS ONE*, 8(6), e62692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.006269>
- Simmonds, P., Adams, M. J., Benkő, M., Breitbart, M., Brister, J. R., Carstens, E. B., Davison, A. J., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Hull, R., King, A. M. Q., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Orton, R., Roossinck, M. J., ... Zerbini, F. M. (2017). *Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. Nature. Reviews Microbiology*, 15(3), 161–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>
- Sigurgeirsson, B., Emanuelsson, O., & Lundeberg, J. (2014). Sequencing degraded RNA addressed by 3' tag counting. *PLoS ONE*, 9(3), e91851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091851>
- Skolmen, Roger G. (1990). *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.B.K. Kiawe. En: Burns, Russell M.; Honkala, Barbara H., eds. *Silvics of North*

- America: 2. Hardwoods. Agric. Handb. 654. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 583-586.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C., Heiner, C., Kent, S. B. H., & Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321, 674–679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>
- Solano-Luna, L.M., Chavarro-Mesa, E., y Ángel-Díaz, J.E. (2018). PCR cuantitativa para la detección del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n1.2018.7789>
- Spooren, J., van Bentum, S., Thomashow, L. S., Pieterse, C. M. J., Weller, D. M., & Berendsen, R. L. (2024). Plant-Driven Assembly of Disease-Suppressive Soil Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 62(1), 1-30. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622-100127>
- Srivastava, K.K., & Mishra, D.K. (1998). Diseases of *Prosopis juliflora* in Rajasthan (pp. 109-110). En *Prosopis species in the Arid and Semi-Arid Zones of India*. (Eds.) J. C. Tewari, N. M. Pasiecznik, L. N. Harsh and P. J. C. Harris. Prosopis Society of India; Henry Doubleday Research Association.
- Thermo Fisher Scientific (2021). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer User Guide. [Manual técnico].
- Thermo Fisher Scientific. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity: Technical Note 52646. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2020). Qubit™ RNA Assay Kits User Guide. Thermo Fisher Scientific. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_RNA_Assay_Kits_UG.pdf
- Thermo Fisher Scientific. (2021). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids: Limits of detection and reproducibility (Technical Note No. T162).
- Thermo Fisher Scientific. (2023). Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers Nucleic acid measurements.

- [/https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf](https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf)
- Thermo Fisher Scientific. (2025a). Ribosomal RNA Sizes. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/ribosomal-rna-sizes.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2025b). RNA Quality and RNA Sample Assessment: The 28S:18S rRNA Ratio of 2 - Is It Important? <https://www.thermofisher.cn/es/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2025c). Collibri™ RNA Library Prep Kit: Input RNA range. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A38994096>
- Thermo Scientific (2012). Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. T123 – TECHNICAL BULLETIN. <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
- Thermo Scientific (2016). NanoDrop One Guía del usuario. Espectrometría micro –UV/Vis NanoDrop. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf>
- Thermo Scientific. (2012) *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. (T123 Technical bulletin). [/https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf](https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf)
- Thermoscientific. (2024). RevertAid RT Kit. User Guide. [/https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012955_RevertAid_RT_UG.pdf](https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012955_RevertAid_RT_UG.pdf)
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(9), 4350-43544. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- Turner, T.R.; James, E.K.; Poole, P.S. (2013). The Plant Microbiome. *Genome Biol*, 14, 1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209.r>

- Valderrama, J.M., Ortigosa, F., & Cañas, R.A. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA. VOL.XIII No.173. 19-25 p. [/https://encuentros.uma.es/assets/journals/13/173singles/173.7_secuenciacion.pdf](https://encuentros.uma.es/assets/journals/13/173singles/173.7_secuenciacion.pdf)
- VALL D'HEBRON INSTITUT DE RESERCA [VHIR]. (2020). Cuantificación de ácidos nucleicos mediante diferentes técnicas. <https://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://vhir.vallhebron.com/sites/default/files/2022-06/UAT-quantificacio-fluorometrica-acids-nucleics.pdf>
- Verano, I. V., & Sánchez, L. C. (2024). *Virus de la Tristeza de los Cítricos: Una revisión crítica de su biología, transmisión y control en la industria cítrica*. Hechos Microbiológicos, 15(2). <https://doi.org/10.17533/udea.hm.v15n2a04>
- Walker, J.R., Oliver, J.C., Stewart, A.M. Beh, S.T., Arce, R.A., Glass, M.J. Vargas, D.E., Qiji, S.H., Intorcía, A.J., Serrano, G.E. (2023). *Measuring Up: A Comparison of TapeStation 4200 and Bioanalyzer 2100 as Measurement Tools for RNA Quality in Postmortem Human Brain Samples*. <https://doi.org/10.3390/ijms241813795>
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009). *RNA-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics*, Nature Reviews, Genetics 10: 57-63, EE.UU.
- Wang, Z., Qi, X., Liu, J., Su, D., Yang, J., & Cui, X. (2024). Research progress on the endogenous viruses of plants. Biodiversity Science.
- Ward, J., Ponnala, L., & Weber, C. (2012). *Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants*, American Journal of Botany 99 (2): 267-276.
- Whaley, O.Q., Borda, C., Moat, J., Wilkinson, T., Bravo Sánchez, A., Gagné, R.J. (2020). *Ecología y diagnóstico de Enallodiplosis discordis* (Diptera:Cecidomyiidae). Revista Peruana de Biología. 27 (4).
- Whitfield, A.E., Brian Huot, O., Martin, K.M., Kondo, H., and Dietzgen, R.G. (2018). *Plant rhabdoviruses- cheira origins and vector interactions*. <https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). *Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity*. BioTechniques, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>

- Wizbiosolutions (2021). *Minikit de ARN vegetal WizPrep*. República de Korea.
https://www.wizbiosolution.com/product_view.php?idx=50
- Wu, Q., Ding, S. W., Zhang, Y., and Zhu, S. (2015). *Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology- dependent and homology- independent algorithms*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 425–444.
doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120030
- Zhang, Y. Z., Shi, M., & Holmes, E. C. (2019). *Using metagenomics to characterize an expanding virosphere*. *Cell*, 172(6), 1168–1172.
- Zweifel, R., Zimmermann, L., Zeugin, F., & Newbery, D. M. (2006). *Intra-annual radial growth and water relations of trees: Implications for cracking phenomena*. *Tree Physiology*, 26(6), 759–767.

ANEXO

Tabla 12

ANOVA del Ritmo Promedio Diario de Crecimiento Diario – RPDC de brotes después de la primera defoliación. Piura, 2026

| FV | SC | GL | CM | FV | Sig. ($\alpha=0,05$) |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| Tratamientos | 0,354 | 4 | 0,088 | 0,118 | 0,974 |
| Error | 11,226 | 15 | 0,748 | | |
| Total | 76,164 | 20 | | | |

Tabla 13

ANOVA del Ritmo Promedio Diario de Crecimiento Diario – RPDC de brotes después de la segunda defoliación. Piura, 2026

| FV | SC | GL | CM | FV | Sig. ($\alpha=0,05$) |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| Tratamientos | 22,457 | 4 | 5,614 | 0,887 | 0,495 |
| Error | 94,680 | 15 | 6,331 | | |
| Total | 159,467 | 20 | | | |