

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO



**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS
CÍTRICOS (CTV) POR RT-PCR Y POR MALDI-TOF/TOF EN
LIMÓN (*Citrus aurantifolia*) Y EN *Toxoptera citricida* EN
TUMBES, PERÚ.**

ESTEFANÍA AIMI NOUCHI MOROMIZATO

**TUMBES, PERÚ
2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO



**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS
CÍTRICOS (CTV) POR RT-PCR Y POR MALDI-TOF/TOF EN
LIMÓN (*Citrus aurantifolia*) Y EN *Toxoptera citricida* EN
TUMBES, PERÚ.**

ESTEFANÍA AIMI NOUCHI MOROMIZATO

TUMBES, PERÚ
2017

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, ESTEFANÍA AIMI NOUCHI MOROMIZATO, declaro que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, también que, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita, la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y jurado calificador.

ESTEFANÍA AIMI NOUCHI MOROMIZATO

RESPONSABLES

ESTEFANÍA AIMI NOUCHI MOROMIZATO

EJECUTOR

ERIC LOUIS MIALHE MATONNIER

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. CARLOS ALBERTO DEZA NAVARRETE

PRESIDENTE

Dr. MIGUEL ANGEL GARRIDO RONDOY

MIEMBRO

Ph. D. VIRNA ALEXIA CEDEÑO ESCOBAR

MIEMBRO

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	IX
ABSTRACT.	X
1. INTRODUCCIÓN.	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	16
2.1. COLECCIÓN DE MUESTRAS	16
2.2. DETECCIÓN DE CTV MEDIANTE RT-PCR	17
Síntesis de iniciadores	17
Extracción de ARN totales	19
Retro transcripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	19
2.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF "SHOTGUN PROTEOMICS"	21
Extracción de proteínas mediante protocolos de Pirovani et al. (2008) y TRIzol Reagent	21
Migración de péptidos en electroforesis SDS-PAGE 1D, digestión y extracción de péptidos	22
Secuenciación y análisis bioinformático	23
3. RESULTADOS.	24
3.1. DETECCIÓN DE CTV MEDIANTE RT-PCR Y GENOTIPAJE DE CEPAS	24
Detección de CTV	24
Genotipaje de cepas de CTV	25
3.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF "SHOTGUN PROTEOMICS"	28
Comparación de protocolos de extracción de proteínas	28
Detección de péptidos y análisis de secuencias	28
4. DISCUSIÓN.	38
5. CONCLUSIONES.	43
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	44
7. ANEXOS.	52

RESUMEN

La tristeza de los cítricos (CTV: Citrus Tristeza Virus) es considerada como la virosis más importante y devastadora del sector citrícola a escala mundial. En Perú, el CTV ha sido registrado desde 1950, causando la decadencia de la naranja Huando (*Citrus sinensis* cv. Washington Navel). La expresión de síntomas y su severidad dependen principalmente de las cepas virales y de la eficiencia de transmisión de los insectos vectores. La situación epidemiológica actual de esta virosis en el departamento de Tumbes es desconocida, en términos de incidencia y severidad, así como de herramientas más precisas para su detección son aún escasas. En el presente estudio se realizó la detección viral a nivel molecular de CTV por la técnica de RT-PCR y por la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de tipo “*shotgun proteomics*” en árboles de limón sutil (*Citrus aurantifolia*) y en insectos áfidos vectores (*Toxoptera citricida*) considerando los principales sectores productores de Tumbes. Se detectó por RT-PCR el virus con una incidencia del 100% en todas las zonas consideradas, siendo los genotipos T3 y VT los más frecuentes entre los genotipos identificados (T30, T36, T3, VT y B165). Mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de tipo “*shotgun proteomics*” ha sido posible identificar 83 secuencias peptídicas de interés, 41 correspondiendo a proteínas virales (p1a, p1b, p13, p20, p23, p25, p27, p33, p61 y p65), asociadas a diferentes funciones moleculares, tales como: replicación y encapsidación viral, especificidad de infección, silenciamiento de mecanismo de defensa de la planta y fijación del virus dentro del insecto vector. Este trabajo podría ser el primer reporte sobre la utilización de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF aplicada a la detección de CTV en plantas de limón e insectos vectores.

Palabras claves: Citrus Tristeza Virus, *Citrus aurantifolia*, *Toxoptera citricida*, RT-PCR, espectrometría de masas MALDI TOF/TOF.

ABSTRACT

Citrus Tristeza Virus (CTV) is considered the most important and devastating disease for worldwide citrus production. In Peru, the CTV has been registered since 1950, causing the decay of the Huando orange (*Citrus sinensis* cv. Washington Navel). The expression of symptoms and their severity depend mainly on the viral *strains* and the transmission efficiency of the insect vectors. The current epidemiological situation of this virus in the department of Tumbes is unknown, in terms of incidence and severity. In the present study, CTV detection was performed in subtle lemon trees (*Citrus aurantifolia*) and in insect aphid vectors (*Toxoptera citricida*) by the RT-PCR technique and by the MALDI-TOF/TOF mass spectrometry technique through *shotgun proteomics* considering the main producing sectors of Tumbes. The virus was detected by RT-PCR in all the considered areas with an incidence of 100%, being the genotypes T3 and VT the most frequent among the identified T30, T36, T3, VT and B165 genotypes. It has been possible to identify 83 peptide sequences of interest, 41 corresponding to viral proteins (p1a, p1b, p13, p20, p23, p25, p27, p33, P61 and p65) associated with different molecular functions, such as viral replication and encapsidation, infection specificity, plant defense silencing mechanism and virus binding within the vector insect. This work could be the first report on the use of the MALDI-TOF/TOF mass spectrometry technique applied to the detection of CTV in lime plants and insect vectors.

Keywords: Citrus Tristeza Virus, *Citrus aurantifolia*, *Toxoptera citricida*, RT-PCR, MALDI-TOF/TOF mass spectrometry

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es el cuarto país productor de cítricos a nivel sudamericano, donde la producción nacional de naranjas ocupa el primer lugar (450 423 Ton), seguida de mandarinas (339 604 Ton) y finalmente limas y limones (275 520 Ton) (FAOSTAT, 2014). La producción de limón nacional se centra principalmente en la Costa norte, situando a Tumbes como el tercer departamento productor con 1 700 Ha cultivadas y 11 000 Ton producidas, convirtiéndolo en el tercer cultivo de mayor importancia a nivel departamental (INEI, 2015). La producción de limón ha aumentado significativamente en los últimos años, sin embargo, diversos factores, principalmente fitosanitarios, son un problema constante para la sostenibilidad del cultivo causando pérdidas económicas importantes.

Entre las principales enfermedades virales, el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV: Citrus Tristeza Virus) ha sido considerada como la virosis más importante y devastadora del sector cítrico a escala mundial (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra y Moreno, 2000), atribuyéndosele la marchitez y muerte de más de 40 millones de árboles en Sudamérica, Estados Unidos y España (Cambra *et al.*, 2000; Dawson *et al.*, 2015), y más de 85 millones a nivel mundial (Lee y Rocha-Peña, 1992; Bar-Joseph *et al.*, 2010). Su incidencia en el Perú data desde el año 1950, causando el declive de la naranja Huando (*Citrus sinensis* cv. Washington Navel) casi en su totalidad (Villegas y Coto, 1984; Roistacher y Moreno, 1991; Bederski *et al.*, 2005).

El CTV es transmitido verticalmente por propagación vegetativa, injertando yemas infectadas sobre patrones sanos, y transmitido horizontalmente por varias especies de áfidos de forma semipersistente. La adquisición del virus por el insecto requiere entre 30 min. a 24 horas mediante su alimentación sobre una planta infectada, siendo hábil para su transmisión por 1 a 2 días. *Toxoptera citricida* es considerado como el vector más eficiente, debido a que puede transmitir la mayoría de aislados virales y su rango de hospederos es limitado a especies rutáceas (Dawson, *et al.* 2015; Killiny *et al.* 2016).

La infección viral inicia cuando el insecto vector infectado se alimenta de una planta sana, penetrando en la célula del hospedero e inoculando los viriones. Los viriones son desencapsidados e inicia el proceso de replicación, generándose un ARNg (ARN genómico) de cadena negativa mediante la replicasa viral de CTV, usando como molde el genoma viral que es de sentido positivo; para tal fin, genes asociados a la replicasa son traducidos directamente por la maquinaria celular del hospedero. A partir de esta molécula, el CTV acumula altas cantidades de ARNg y ARNsg (ARN subgenómicos) durante la expresión de los 10 ORFs situados a la mitad 3' del genoma, los cuales serán traducidos en proteínas estructurales y no estructurales (Karasev *et al.*, 1995; Hilf *et al.*, 2005; Albiach, 2012; Dawson *et al.* 2013). Este virus exhibe un tropismo limitado al floema, con movimientos a larga distancia y entre células dependientes de la susceptibilidad del hospedero (Harper *et al.*, 2014), donde es usual la infección por poblaciones virales integradas por aislados provenientes de una (*cuasiespecies* virales) o varias cepas (Harper, 2013).

El CTV pertenece a la familia Closteroviridae en la clasificación del ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus) y al grupo IV en la escala de Baltimore, donde se agrupan virus con material genético de ARN segmentados y no segmentados (Dawson *et al.*, 2015). El virión, es de forma helicoidal flexible, mide 2000 nm x 10-12 nm y posee un genoma de ARN de simple cadena positivo que corresponde a 19.3 Kb. aproximadamente, dividido en 12 ORF (*Open Reading Frame*) y dos regiones NTR (*NonTranslation Regions*). Los ORFs 1a y 1b (cercaos al extremo 5'), necesarios para la replicación viral, son las regiones más variables dentro de su genoma. Los 10 ORFs cercaos al extremo 3' codifican proteínas involucradas en el movimiento, ensamblaje e interacción del virus con sus hospederos y vectores, entre ellas: CP, CPm, p23, p20, p65 y p61 (Hilf *et al.*, 2005; Karasev *et al.*, 1995). Para la detección del virus por RT-PCR, se orienta entonces la ubicación de iniciadores en estos ORFs (Satyanarayana y Dawson, 2012; Dawson *et al.*, 2015; Satyanarayana, *et al.* 2014, Roy *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2015; Adkar-Purushothama, *et al.* 2011; Saponari *et al.*, 2008).

Los tres principales síndromes causados en el hospedero son: amarillamiento de plántulas (SY: *seedling yellows*), acanaladura de tallos (SP: *stem pitting*) y el decaimiento rápido o tristeza (D: *decline*), de los cuales, los dos últimos son problemas significativos para el cultivo de cítricos. La expresión de síntomas y su severidad dependen de 3 factores: la especie o cultivar infectado, la especie del patrón sobre el cual se encuentra el injerto, y finalmente, la cepa viral infectante o la mezcla de cepas de CTV. Las principales cepas encontradas son : T30, T3, T36, VT y B165 (Harper *et al.*, 2016 ; Besoain, 2008 ; Dawson *et al.*, 2015 ; Roy *et al.*, 2010, Mendoza, *et al.* 2005). Albiach-Martí (2012), menciona que también interviene la eficiencia específica de transmisión del insecto vector, siendo el áfido marrón de los cítricos (*T. citricida*) el principal vector en Tumbes (SENASA, no publicado).

Hasta el momento, no existe una cura del CTV aplicable en el campo, siendo entonces importante prevenir su infección (Jovel and Ramírez, 2002) mediante varios métodos, como la utilización de patrones resistentes al virus, principalmente *Poncirus trifoliata* (Lee, 2014; Besoain, 2008; Harper *et al.*, 2014), el control de insectos vectores y el uso de injertos proveniente de plantas sanas; asimismo, la utilización de protección cruzada por cepas suaves del virus ha sido sugerido; sin embargo, no se ha aplicado de forma comercial (Roistacher, *et al.* 2010; Lee y Keremane, 2013; Folimonova, *et al.* 2014). Por lo tanto, la utilización de técnicas de detección y diagnóstico en plantas madre es primordial para la prevención de la enfermedad.

La organización de viveros donde se cultiven árboles exentos de virus en condición de protección frente a vectores se vuelve, por tanto, primordial para la sostenibilidad del cultivo de limones (Adkar-Purushothama *et al.* 2011).

Varios métodos han sido utilizados para la detección de CTV. Tradicionalmente, se basa en la observación de síntomas generales (tristeza) y/o específicos en una sección de la planta (acanaladura de la madera), siendo usualmente visibles a una edad avanzada de los árboles. El diagnóstico en plantas jóvenes o asintomáticas es usualmente realizado por pruebas de infectividad mediante inoculación de yemas en plantas indicadoras

o por pruebas serológicas (ELISA). Recientemente, han sido implementadas técnicas moleculares como: inmunofluorescencia, sondas de ADN complementario, PCR cuantitativa y RT-PCR (Moreno and Ambrós, 2011; Ruiz-Ruiz, 2009; Roy *et al.*, 2010; Roistacher, 1991; Satyanarayana, *et al.* 2001; Ambrós, *et al.* 2013).

La técnica RT-PCR permite una detección sensible y rápida, basándose en la amplificación de una sección del material genético viral (ARN), otorgándole mayor especificidad (Mehta *et al.*, 1997; Yang, *et al.* 1999; Huang, *et al.* 2004). Esta técnica ha sido aplicada usando varios iniciadores para reconocer y distinguir diferentes genotipos virales (Roy *et al.*, 2010).

Los virus fitopatógenos tienen una gran influencia sobre el perfil de abundancia de proteínas en el hospedero. En las últimas décadas, la aplicación de proteómica en virología ha despertado gran atención. Estudios sobre hospederos infectados por virus revelaron muchos mecanismos moleculares involucrados en las interacciones hospedero-virus, las cuales proveen información importante para el diagnóstico y prevención de muchas enfermedades virales (Fang *et al.*, 2015).

La espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*) ha sido utilizada para identificar y estudiar una amplia gama de microorganismos y agentes patógenos (Ahmad *et al.* 2012; Singhal *et al.*, 2015), incluyendo virus en plantas (Tan *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016), mostrando un alto rendimiento de información con corto tiempo de obtención (Piao *et al.*, 2012). Mientras las aplicaciones de MALDI-TOF/TOF en patología humana son muy numerosas, muy pocas publicaciones están relacionadas a su uso para la detección de fitopatógenos (Ahmad *et al.*, 2012).

En este estudio, se realizó la detección molecular del Virus de la Tristeza de los Cítricos por medio de las técnicas RT-PCR y espectrometría de masas MALDI TOF/TOF en diferentes tejidos de limón (*Citrus aurantifolia*) y en un insecto vector (*T. citricida*), así como la detección de cepas mediante

genotipaje en los principales sectores productores de Tumbes, con la finalidad de prevenir la diseminación de la enfermedad mediante un diagnóstico rápido y preciso, así como vislumbrar datos sobre la incidencia de la enfermedad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. COLECCIÓN DE MUESTRAS

La colección de muestras se realizó en un lapso de tiempo de 14 meses (Marzo del 2016 hasta Mayo del 2017) en campos de cultivo de limón sutil (*C. aurantifolia*) injertados sobre el patrón de limón rugoso (*C. jambhiri*) de 4 a 15 años de edad, ubicados en el principal sector productor de limón sutil por cada provincia constitutiva del departamento de Tumbes. Las muestras colectadas fueron tomadas a partir plantas presentando síntomas, como: marchitez general, disposición vertical de hojas y la acanaladura de tallos. Así mismo, estos síntomas fueron observados en todos los campos evaluados, siendo predominante la acanaladura de tallos, observándose diferentes grados de severidad (Fig. 1). Árboles expresando acanaladura severa, mostraron frutos pequeños y déficit de producción.

Para la estandarización de ensayos, se colectaron muestras en el sector de La Peña, ubicado en la provincia de Tumbes, reportado como positivo ante la presencia de CTV por SENASA (datos no publicados); las muestras (tejido intervenal, peciolo, nervaduras, corteza y áfidos) fueron colectadas a partir de plantas sintomáticas para su utilización como controles positivos. Como control negativo para el virus, se tomaron muestras a partir de plántulas germinadas de limón sutil (*C. aurantifolia*). Las muestras se transportaron en tubos tipo Falcon de 50 ml. sumergidos en conservador de ARN (C.A. Later) a temperatura ambiente (corteza) o en bolsas plásticas a bajas temperaturas (hojas completas), a excepción de las muestras animales (áfidos), los cuales fueron transportados en tubos tipo falcon a temperatura ambiente.

Para la estimación de la incidencia y el genotipaje de cepas, se colectaron 5 muestras al azar en cada uno de los principales sectores productores de limón. Los lugares de muestreo fueron: parcela perteneciente a la Cooperativa Agraria productora de limón en Cabuyal (3°43'04.9"LS 80°26'08.3"LO) y San Jacinto (3°40'41.1"LS 80°27'13.9"LO), Tumbes; Fundo "El Encanto", propiedad de Granja Sinchi S.A. en Canoas de Punta Sal, Contralmirante Villar (4°03'10.1"LS 80°57'12.3"LO) y parcela perteneciente a la asociación de productores de cítricos APROLIMON en Matapalo, Zarumilla (LS 3°40'43.6"S 80°12'01.3"LO). Las muestras vegetales se transportaron en bolsas plásticas refrigeradas, almacenándose a -20°C para evitar la degradación de la muestra. Los insectos, se transportaron en tubos falcon de 50 ml, manteniéndolos vivos hasta el momento de su maceración.

2.2. DETECCIÓN DE CTV MEDIANTE RT-PCR

Síntesis de iniciadores

Se sintetizaron 6 juegos de iniciadores, un juego utilizado para la detección general del virus, diseñados a partir de secuencias conservadas del gen codificante de la proteína de la cápside viral (Cp), y 5 juegos de iniciadores específicos para cepas (*strains*) virales (T30, T3, T36, VT y B165) diseñados sobre el ORF 1a, ubicado cerca del extremo 5' del genoma viral citados por Roy *et al.*, (2010). Para la amplificación de genes control, se usaron iniciadores dirigidos al gen actina (Rubio-Piña y Zapata-Pérez, 2011) para ensayos en tejidos vegetales y al gen de la subunidad 18S ARN ribosomal para insectos (Buckman, 2012).



Figura. 1. Síntomas observados en campos de cultivos en Tumbes infestados por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) y presencia de su principal insecto vector en árboles de limón sutil (*C. aurantifolia*). (A) Tristeza; (B) acanaladura del tallo (*stem pitting*); (C) Severidad de acanaladura de tallo: suave (arriba) y severo (abajo); (D) Colonia de áfidos (*T. citricida*) en un brote de limón sutil.

Extracción de ARN totales

Se utilizó el protocolo de TRIzol® Reagent (Invitrogen, USA), con leves modificaciones. Se maceraron las muestras utilizando nitrógeno líquido y homogenizaron en presencia de TRIzol Reagent e incubaron sobre hielo. La purificación y precipitación del ARN se llevó a cabo mediante pasos en cloroformo e isopropanol, por un tiempo de 2 horas a -20°C. Se realizaron lavados en etanol al 75% y finalmente el pellet fue resuspendido en agua ultra pura, en volúmenes entre 20 a 60 µl, dependiendo de la cantidad de ARN obtenida. El ARN obtenido se usó inmediatamente para realizar los ensayos de RT-PCR.

Retro transcripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Para la síntesis de la primera cadena de ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit RevertAid (Thermo Fisher Scientific, USA) en un volumen final de 20 µl., utilizando 6 µl. del ARN extraído, 1 µl. de primer reverse específico (cp25, 1a y 18S) u Oligod(T) (para Actina como control interno en plantas), Buffer 5X, 10 mM dNTP's, 20 U/µl. Ribolock (inhibidor de ARNasas) y 200 U/µl. De RevertAid (retrotranscriptasa) incubados en dos tiempos, uno inicial de 5 minutos a 65°C (seguida de incubación en hielo por 5 min.) y otro de 42° C por 60 min. más un paso final de 70°C por 5 min. Primers específicos fueron empleados para la detección del CTV por PCR y controles (Tabla 1).

El mix de reacción de PCR incluyó concentraciones finales de: Buffer Maxima Hot Start Taq 1X (Thermo Scientific); Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase 0.04U/µl (Thermo Scientific); 2 mM MgCl₂ (Thermo Scientific); 0.2 mM dNTP's; 1 pmol de cada primer; 2 µl. de ADN complementario y llevados hasta un volumen final de 25 µl. con agua ultra pura. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador (BIOMETRA UNO-Thermoblock), con los siguientes

parámetros: desnaturalización inicial 95°C por 5min, 35 ciclos de desnaturalización de 95°C por 45 segundos, hibridación a 54°C (genes control) y 57°C (CTV) por 45segundos, y la extensión a 72°C por 45 segundos; y un ciclo de extensión final a 72°C por 6 min.

Se visualizó la amplificación de los productos de PCR utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Cleaver Scientific Ltd. AG500) en buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato; 1 mM EDTA), por tinción con bromuro de etidio (10 mg/ml), en un trans-iluminador (Vilber Lourmot TFX20M) bajo luz 20 a 30 minutos.

Tabla 1. *Primers* utilizados en la detección de CTV y específicos a 5 cepas principales (T3, T30, T36, VT, B165) obtenidos de la publicación de Roy, 2010.

Primer	ORF		Secuencia (5'⇒3')	Peso molecular (pb)
General	p25	F	ATG GAC GAC GAR ACA AAG AAA TTG AAG A	672
		R	TCA ACG TGT GTT RAA TTT CCC AAG CT	
T3	1a	F	GTT ATC ACG CCT AAA GTT TGG TAC CAC T	409
		R	CAT GAC ATC GAA GAT AGC CGA AGC	
T30	1a	F	TGT TGC GAA ACT AGT TGA CCC TAC TG	206
		R	TAG TGG GCA GAG TGC CAA AAG AGA T	
T36	1a	F	TTC CCT AGG TCG GAT CCC GAG TAT A	836
		R	CAA ACC GGG AAG TGA CAC ACT TGT TA	
VT	1a	F	TTT GAA AAT GGT GAT GAT TTC GCC GTC A	302
		R	GAC ACC GGA ACT GCY TGA ACA GAA T	
B165	1a	F	GTT AAG AAG GAT CAC CAT CTT GAC GTT GA	510
		R	AAA ATG CAC TGT AAC AAG ACC CGA CTC	
ActPlant	Actina	F	CAC TAC TAC TGC TAA ACG GGA AA	465
		R	ACA TCT GCT GGA AGG TGC TG	
18SAf	ARNr 18S (áfido)	F	GCT CGT AGT TGG ATC TGT GY	875
		R	GTT AGY AGG YTA GAG TCT CGT TCG	

2.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF “SHOTGUN PROTEOMICS”

Extracción de proteínas mediante los protocolos de Pirovani *et al.* (2008) y TRIzol Reagent.

Las proteínas fueron extraídas mediante el método de precipitación en ácido tricloroacético (TFA)/acetona utilizado por Pirovani *et al.* (2008, citado por Dória *et al.*, 2015), con algunas modificaciones. Se tomó 150 a 200 mg. de hojas y fueron maceradas en nitrógeno líquido (hasta obtener un polvo fino); se siguieron de varios pasos de precipitación y lavados en acetona fría y TCA al 10%, centrifugando las muestras a 10 000 g por 5 min a 4°C, previa exposición a sonicación por 1 minuto. El pellet fue lavado en TCA al 10% y en acetona al 80% previa sonicación por 1 minuto, luego fue resuspendido en un tampón de extracción SDS denso (sucrosa 30%, SDS 2%, 0.1M de tris-HCL pH 8.0, β - mercaptoethanol 5%), incubado en hielo adicionándole fenol saturado pH. 8.0, para recuperar la fase y precipitar con acetato de amonio en metanol al 0.1 M por 14 horas. Finalmente, las proteínas fueron lavadas en acetona fría y etanol al 70%.

Así mismo, se usó el protocolo de TRIzol Reagent descrito por el fabricante con ligeras modificaciones tanto para muestras vegetales como insectos. 200 mg de muestra (hojas de limón o 25 a 30 áfidos adultos) se maceraron en nitrógeno líquido, se resuspendieron en TRIzol Reagent e incubaron sobre hielo por 5 min; se separó la fase orgánica utilizando cloroformo y se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C (previa incubación sobre hielo), recuperándose la interfase y fase orgánica; se precipitaron las proteínas obtenidas a partir de la fase orgánica en etanol absoluto e isopropanol, seguido de lavados en 0.3 M de hidroclorehidrato de Guanidina en etanol 95% tres veces y etanol absoluto. Las proteínas fueron resuspendidas en ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en agua grado HPLC y en buffer de rehidratación

conteniendo 8M urea, 20 mM DTT, 4% CHAPS pH 8.0 y agua grado HPLC.

Migración de péptidos en electroforesis SDS-PAGE 1D, digestión y extracción de péptidos

Las proteínas fueron migradas en un gel de bisacrilamida SDS-PAGE al 12%, conteniendo: un gel de corrida (12% de acrilamida; 0.38 M Tris pH 8.8; 0.1% SDS; 0.1% APS; 0.04% TEMED hasta un volumen final de 5 ml. con agua bidestilada) y un gel de alineamiento (3.3% de acrilamida; 0.083 M pH 6.8; 0.067% SDS; 0.067% APS; 0.067% TEMED hasta un volumen final de 3ml. con agua bidestilada), montados en el casete hasta su solidificación. Para la migración de proteínas, se preparó una mezcla de 30 μ l. de proteínas con 20 μ l. de *Buffer* de carga en un tubo de 0.2 ml., incubado a 95° por 5 min y finalmente 30 μ l. de la mezcla de cada muestra fueron depositadas en el gel, durante 3 horas a 90 voltios (V) y 50 amperajes (A).

El gel fue fijado (metanol 45%, ácido acético 10% y agua bidestilada 45%), teñido (50% metanol, 10% ácido acético, 0.1% azul de Coomasin en agua bidestilada) y decolorado (metanol 45%, ácido acético 10% en agua bidestilada). Las bandas obtenidas fueron cortadas con un bisturí estéril, depositadas en microtubos tipo Eppendorf de 0.2 ml y decoloradas según el protocolo descrito por Schevchenko *et al.* (2007), mediante incubación en bicarbonato de amonio y acetonitrilo (1:1) por 30 min., seguido de incubación en acetonitrilo. La saturación y digestión de las proteínas, se realizó por incubación en buffer tripsina (13 ng. / μ l.) por 3 horas a -4°C, luego de incubar las muestras a 37°C toda la noche. Para la extracción de péptidos, se usó buffer de extracción (1:2 de ácido fórmico 5%/Acetonitrilo), seguido de pasos de incubación, sonicación y secado por 3 horas en condiciones de vacío.

Para la lectura de muestras en MALDI-TOF/TOF, se utilizó una placa opti-TOF 1-1 V/V, depositándose las muestras resuspendidas en TFA 0.1%, mezcladas con matriz CHCA 10 mg/ml (α -cyano- 4-hidroxicinámico acid) resuspendido en 0.1% de TFA en agua grado HPLC y 0.1% TFA en acetonitrilo.

Secuenciación y análisis bioinformático

Los productos amplificados por PCR (en un volumen final de 30 μ l.) fueron enviados para su secuenciación en los laboratorios de la empresa MACROGEN (USA), empleando el método Sanger con electroforesis capilar. Las secuencias se analizaron en la base de datos del GenBank por la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica (BLASTn).

Los ensayos en MALDI-TOF/TOF fueron llevados a cabo en el laboratorio de espectrometría de masas, ubicado en las instalaciones de la Facultad de Pesquería y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes (Puerto Pizarro, Tumbes). Los péptidos obtenidos a partir de los pasos anteriores, se analizaron en el equipo MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System) en modo ion reflector positivo, con una intensidad de láser de 2800 y una velocidad de 600 μ m/segundo (750 disparos por espectro), dentro del rango de masas entre 800 a 4000 m/z; procesándose finalmente mediante el software ProteinPilot™, empleando secuencias (*Toxoptera citricida*, *Aphididae Taxid*, *Citrus Taxid*, *DICER plants*, *Citrus Tristeza Virus*) a partir de la base de datos de UNIPROT. Para la calibración del equipo se utilizó un kit de estándares de masas para instrumentos *Mass Standards AB SCIEX TOF/TOFTM (Mass Standards Kit for Calibration of AB SCIEX TOF/TOFTM Instruments)*. Las secuencias no detectadas por el programa ProteinPilot™ fueron analizadas mediante BLASTP (Protein Blast).

3. RESULTADOS

3.1. DETECCIÓN DE CTV MEDIANTE RT-PCR Y GENOTIPAJE DE CEPAS

Detección de CTV

Todas las muestras de las plantas evaluadas (tejido intervenal, nervaduras, peciolo y corteza) para estandarización de ensayos, mostraron fuerte amplificación (Fig. 2A); sin embargo, se presentaron problemas durante la extracción de ARN en corteza (amplificación leve

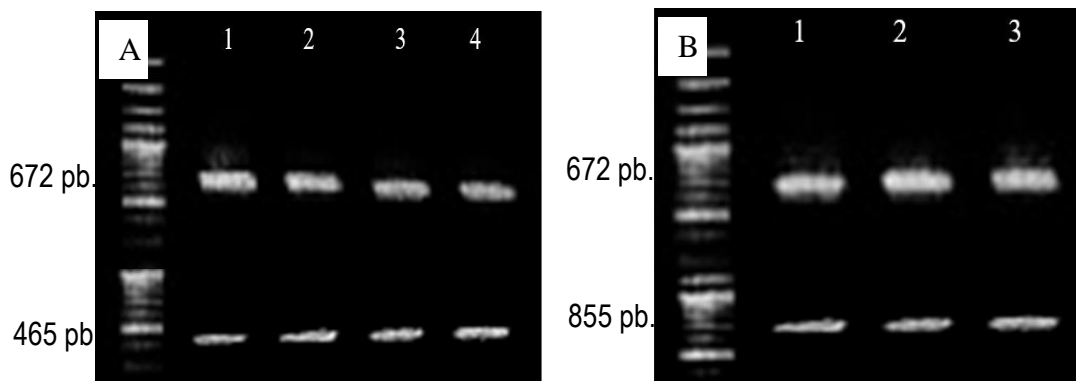


Figura. 2. Estandarización de detección de CTV en diferentes tejidos vegetales e insectos vectores (áfidos) con sus respectivos controles (Actina y 18S ARNr) colectados en el sector La Peña, Tumbes. (2A) Detección en plantas. Líneas: marcador de peso molecular; 1, hojas; 2, corteza; 3, peciolo; 4, nervadura., marcador de peso molecular. (2B) Detección en áfidos (*T. citricida*) Líneas: 1-3, áfidos tomados en diferentes árboles de limón.

o nula), por tal motivo se continuaron los ensayos con hojas enteras (tejido intervenal más nervaduras) tomadas de varias zonas del árbol afectado. Todas las muestras vegetales analizadas para la estimación de la incidencia del CTV, dieron positivo a la detección viral; así mismo, la totalidad de muestras de áfidos colectados a partir de colonias presentes en árboles sintomáticos (sector de La Peña) utilizado para la amplificación general de CTV, fueron positivas (Fig. 2B).

La secuencia de los productos de amplificación obtenidos por PCR al ser analizadas mediante la herramienta de búsqueda BLAST *nucleotide* (BLASTn), identificaron al virus en un rango entre el 96 al 98% de identidad y 98 a 99% de cobertura en 41 aislados detectados a nivel mundial; observándose que los tres primeros aislados (con mayores rangos de cobertura e identidad) han sido relacionados al síntoma de acanaladura de tallos (Tabla 2).

Genotipaje de cepas de CTV.

El genotipaje de cepas reveló la presencia de todas las cepas evaluadas en este estudio (T36, T3, T30, VT y B165) en árboles de limón distribuidas de forma heterogénea e intensidades variables en los 3 principales sectores productores en Tumbes (Fig. 3).

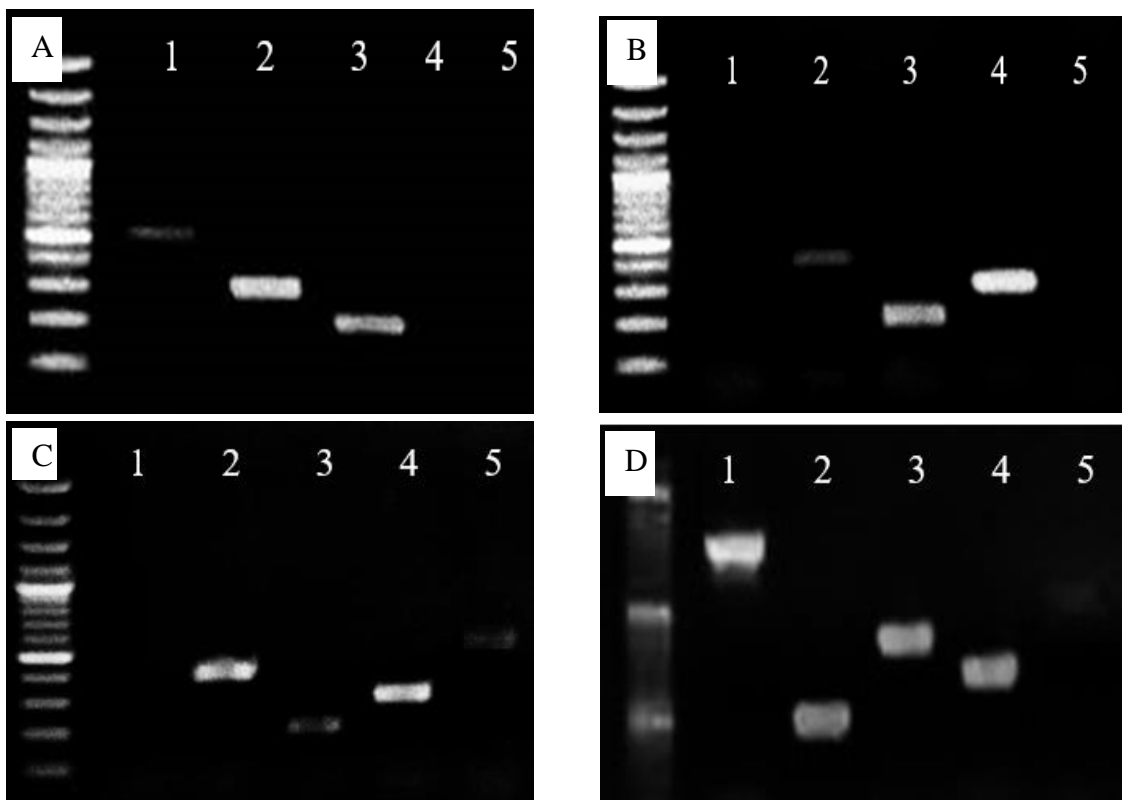


Figura. 3. Detección de principales cepas de CTV en principales regiones productoras. (A) La Peña, Líneas: 1, cepa B165; 2, cepa VT; 3, cepa T30, 4, cepa T3; 5, cepa T36. (B) Cabuyal, Líneas: 1, cepa T36; 2, cepa T3; 3, cepa T30, 4, cepa VT; 5, cepa B165. (C) Matapalo, Líneas: 1, cepa T36; 2, cepa T3; 3, cepa T30, 4, cepa VT; 5, cepa B165. (D) Canoas de Punta Sal Líneas: 1, cepa T36; 2, cepa T30; 3, cepa T3, 4, cepa VT; 5, cepa B165.

Tabla 2. Genes reconocidos mediante secuencia nucleotídica correspondiente a la detección de CTV por RT-PCR.

Nombre	Cobertura	Identidad	Código de Acceso	Fenotipo o genotipo relacionado
Citrus tristeza virus haplotype 443-4 coat protein (CP) gene, partial cds	99%	98%	AY791844.1	SP
Citrus tristeza virus isolate CwS1_C coat protein (CP) gene, complete cds	99%	98%	EU288067.1	SP, SY
Citrus tristeza virus isolate FN_B coat protein (CP) gene, complete cds	99%	98%	EU288061.1	SP
Citrus tristeza virus isolate 443-13 coat protein mRNA, complete cds	99%	97%	EU579420.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate CwS3_F nonfunctional coat protein (CP) gene, complete sequence	99%	97%	EU288082.1	No determinado
Citrus tristeza virus clone SC-Z-2-1-4 minor coat protein gene, complete cds; and coat protein gene, partial cds	98%	98%	KF144768.1	VT
Citrus tristeza virus isolate 441-2 coat protein mRNA, complete cds	99%	97%	EU579418.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate CTV-B5 p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20, and p23 genes, complete cds	99%	97%	HQ912023.1	No determinado
Citrus tristeza virus clone SC-Z-2-3-6 minor coat protein gene, complete cds; and coat protein gene, partial cds	98%	97%	KF144771.1	VT
Citrus tristeza virus isolate SK18 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KR185332.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate sk14 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KR185331.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate SK11 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KR105771.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate SK20 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KR259641.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate SK6 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KR080487.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate K18 coat protein gene, complete cds	99%	97%	GQ475549.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate FN_C coat protein (CP) gene, complete cds	99%	97%	EU288062.1	SP, SY
Citrus tristeza virus haplotype 441-3 coat protein (CP) gene, partial cds	99%	97%	AY791843.1	SP
Citrus tristeza virus isolate Mnp3 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KU530136.1	D
Citrus tristeza virus isolate K33 coat protein gene, complete cds	99%	97%	GQ475556.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate K11 coat protein gene, complete cds	99%	97%	GQ475545.1	No determinado
Citrus tristeza virus coat protein gene, complete cds	99%	97%	AF501867.1	No determinado

Citrus tristeza virus isolate K18 coat protein-like gene, complete sequence	99%	97%	HM853684.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate SK13 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KR185330.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate SK12 coat protein gene, complete cds	99%	97%	KR185329.1	No determinado
Citrus tristeza virus CP gene for coat protein, isolate ARP1 from Bodak Village	99%	97%	LN997804.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate T3, complete genome	99%	97%	KC525952.1	T3
Citrus tristeza virus isolate Kpg1 coat protein gene, complete cds	99%	97%	GQ392062.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate K15 coat protein gene, complete cds	99%	97%	GQ475546.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate K8 coat protein gene, complete cds	99%	97%	GQ475544.1	No determinado
Citrus tristeza virus clone O6 capsid protein gene, partial cds	99%	97%	DQ660349.1	No determinado
Citrus tristeza virus clone C6E coat protein (p25) gene, complete cds	99%	97%	AY896568.1	NZRB
Citrus tristeza virus from India truncated coat protein gene, partial cds	99%	97%	EF647587.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate NG-AKB1 coat protein gene, complete cds	99%	96%	KY083427.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate Maxi, complete genome	99%	96%	KU883266.1	VT
Citrus tristeza virus CP gene for coat protein, isolate AS 1	99%	96%	LT576374.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate K16 coat protein gene, complete cds	99%	96%	GQ475547.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate K2 coat protein gene, complete cds	99%	96%	GQ475540.1	No determinado
Citrus tristeza virus clone P2 capsid protein gene, partial cds	99%	96%	DQ660351.1	No determinado
Citrus tristeza virus clone 15.11 capsid protein gene, partial cds	99%	96%	DQ660344.1	No determinado
Citrus tristeza virus clone C3E coat protein (p25) gene, complete cds	99%	96%	AY896563.1	No determinado
Citrus tristeza virus isolate M9-WB coat protein gene, complete cds	99%	96%	KT981893.1	No determinado

Fenotipos: SP, *stem pitting*; SY, *seedling yellows*; D, *decline*

Genotipos: VT, T3, NZRB

La muestra analizada provenientes del Fundo “El Encanto”, propiedad de Granja Sinchi S.A. en Canoas de Punta Sal, mostró la presencia de todas las cepas virales, difiriendo en la diversidad de genotipos mostrados con otras muestras tomadas provenientes de otros sectores productivos: cuatro en Matapalo (T3, T30, VT y B165), tres en Cabuyal (T3, T30 y VT) y tres en La Peña (T3, VT y B165). Así mismo, puede observarse la predominancia de las cepas VT y T3 en todos los sectores (Tabla 3).

Tabla 3. Detección de cepas por sectores productores de limón en el departamento de Tumbes.

Provincia	Distrito	Sector	Cepas				
			T36	T3	T30	VT	B165
Contralmirante Villar	Canoas de Punta Sal	Fundo “El Encanto”	+	+	+	+	+
Zarumilla	Matapalo			+	+	+	+
Tumbes	Pampas de Hospital	Cabuyal		+	+	+	
	San Jacinto	La Peña		+		+	+

3.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF/TOF “SHOTGUN PROTEOMICS”

Comparación de protocolos de extracción de proteínas

Se observó mayor número de bandas y mayor nitidez con el protocolo de Pirovani *et al.* (2015) comparado con el de TRIzol Reagent (Fig. 4), sin embargo, se detectó mayor cantidad de secuencias peptídicas en plantas con este último protocolo (Tab. 4).

Detección de péptidos y análisis de secuencias

El análisis de las muestras (limón sutil y áfidos) mediante la primera fragmentación por láser (primer TOF), nos proporciona un perfil de espectros de masas peptídicas (Fig. 5), para posteriormente obtener

sus secuencias por medio de la segunda fragmentación (segundo TOF).

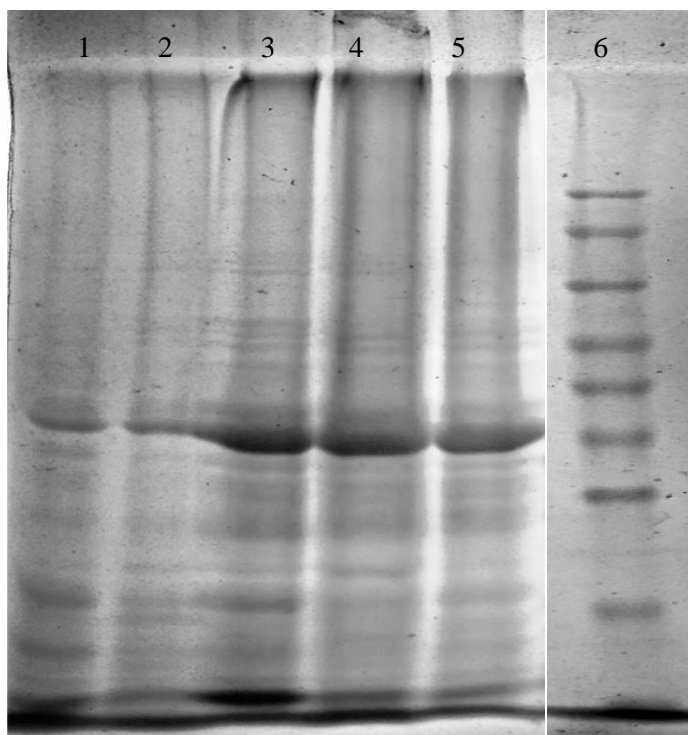


Figura 4. Migración de proteínas en gel de bisacrilamida SDS-PAGE al 12% a partir de las muestras de limón sutil. Línea 1 y 2, protocolo de TRIZOL; líneas 3-5, protocolo de Pirovani; línea 6, marcador de peso molecular.

Se detectaron un total de 83 secuencias peptídicas, 41 correspondientes a 10 proteínas virales que están presentes tanto en muestras de plantas como áfidos (Tabla 4), 22 pertenecen a proteínas de la planta de limón y 22 secuencias a áfidos.

Las 10 proteínas virales identificadas son: las proteínas estructurales p25 (CP) y p27 (CPm) que constituyen la cápside viral, p20 y p23 que actúan conjuntamente con el p25 en el silenciamiento del ARNi del hospedero; p65 y p61, relacionadas a la encapsidación viral por la proteína p27; p33 y p13, proteínas no conservadas a nivel de Familia Closteroviridae; y finalmente la poliproteína 1a, la cual posee varios dominios funcionales, tales como: proteasas, helicasa y metiltransferasa, siendo la proteína más abundante dentro de las secuencias peptídicas virales detectadas.

Tabla 4. Secuencias peptídicas detectadas por espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF en plantas de limón (*C. aurantifolia*) y áfidos (*T. citricida*) evaluados.

Org. detect	Prot. Ext.	Prec MW	Prec m/z	Secuencia	Análisis	Nombre	Organismo	Conf ^a ó Cb/ld ^b	Accesión
Planta	Pirovani	1356.6787	1357.686	IDPTLIAMNDVR	ProteinPilot™	coat protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus aurantifolia</i>	99	W8D0Q6
Planta	Pirovani	1295.6387	1296.646	DFHIAMMLYR	ProteinPilot™	coat protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus aurantifolia</i>	99	W8D0Q6
Planta	Pirovani	939.4645	940.4718	QAKEQLLK	ProteinPilot™	coat protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sp.</i>	0.3	I3NR91
Planta	Pirovani	1881.9467	1882.954	PGPNGTVSVLMPDGVNTAR	PRO-BLAST	coat protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	ABD18630.1
Planta	TRIZOL	1373.6727	1374.6801	QLSTQQNATLNR	PRO-BLAST	p25 [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus grandis</i>	100/100	AFS17305.1
Planta	Pirovani	1759.7437	1760.751	GADEVVVTMSGSLGNSTH	PRO-BLAST	major coat protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	AAT48096.1
Áfido	TRIZOL	1663.7086	1664.7159	GADEIVVTNVRQLGR	PRO-BLAST	coat protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus macrophylla</i>	100/100	AEX56598.1
Áfido	TRIZOL	2741.2068	2742.2141	ETPNALRKYACTYEELHLCMAR	PRO-BLAST	minor coat protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sp.</i>	100/100	AGO66053.1
Planta	Pirovani	1464.7866	1465.7939	HISLLAKVGAVVER	PRO-BLAST	p20 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	AAP87064.1
Áfido	TRIZOL	1224.5847	1225.592	AGLSELSRTHK	PRO-BLAST	p20 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	AAP87052.1
Planta	Pirovani	2656.2046	2657.2119	RKARAFSNAEMSAIELVSYTKER	PRO-BLAST	p23 protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus spp.</i>	100/100	AAB03204.1
Planta	TRIZOL	3049.3516	3050.3589	AMLPDINVNVVGDNEDTSSEYPVSLSLR	PRO-BLAST	P23 [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	ADU02558.1
Planta	TRIZOL	2656.2498	2657.2571	KMNPFIIDALIRKTSYQGARFR	PRO-BLAST	p23 protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	AFK32366.1
Áfido	TRIZOL	2671.3066	2672.314	KMNPFTIDALIRKTNYPQGARFR	PRO-BLAST	p23 [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	CAE30351.1
Planta	TRIZOL	1915.9376	1916.9449	QLAVGLAAEREKTRLAR	PRO-BLAST	p23 protein [Citrus tristeza virus]	<i>Poncirus trifoliata</i>	100/100	ACM49897.1
Planta	Pirovani	2168.9856	2169.9929	ADRANISEIVESHVSDRDR	PRO-BLAST	p13 protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus reticulata</i>	100/100	AFL55393.1
Planta	TRIZOL	1963.8477	1964.855	ADRANISEIVEPHVSDR	PRO-BLAST	p13 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	CAX01589.1
Planta	Pirovani	2657.3008	2658.3081	VESYLMSRGEDSADVTAVEHSWR	PRO-BLAST	p61 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	CAX01521.1
Planta	TRIZOL	1497.7987	1498.806	RSSSRILRGRGAR	PRO-BLAST	p61 protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	AFK32360.1
Áfido	TRIZOL	2735.1907	2736.198	DVESYLMSRGEDSADVTAVEHSWR	PRO-BLAST	p61 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	CAX01521.1

Planta	TRIZOL	2306.1597	2307.167	LPTFAVRSSGGDMNLGGRAIDR	PRO-BLAST	p65 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	CAX01474.1
Planta	Pirovani	1785.7957	1786.803	CYRSTNLGDSSGVQSR	PRO-BLAST	p33 [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	ACH79966.1
Planta	Pirovani	2657.3347	2658.342	SGCLCGLPVIDTSGVVRASVAGIWR	PRO-BLAST	p346 [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sp.</i>	100/100	AAB38755.1
Planta	Pirovani	2169.0198	2170.0271	IGNFTFPRGTVYNAPVDER	PRO-BLAST	p349 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	AAK43640.1
Planta	TRIZOL	2294.1807	2295.188	KPFYTRFENGEDFAVMRR	PRO-BLAST	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus reticulata</i>	100/100	AFL55384.1
Planta	Pirovani	1774.7767	1775.7841	ASDAIMVMQVYDVPLR	PRO-BLAST	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus reticulata</i>	100/100	AFL55384.1
Planta	Pirovani	1644.8467	1645.854	IGDFSFPSSSVYNAR	PRO-BLAST	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus aurantifolia</i>	100/100	AFV13228.1
Planta	TRIZOL	2263.1587	2264.166	AGSDSPSNTSSGGLRAGAAPSLFR	PRO-BLAST	348 kDa polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus latifolia</i>	100/100	ACX48896.1
Planta	Pirovani	1774.8247	1775.832	ASSLFSRRVPRGMRR	PRO-BLAST	p349 protein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	AFK32355.1
Planta	Pirovani	2169.0198	2170.0271	IGNFTFPRGTVYNAPVDER	PRO-BLAST	p349 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	AAK43640.1
Planta	Pirovani	1785.8397	1786.847	VLVTRTEEVTPVCKR	PRO-BLAST	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	ARO38250.1
Planta	TRIZOL	1915.9357	1916.943	TLGMYPTVGAFKTFLLR	PRO-BLAST	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus aurantifolia</i>	100/100	ANW12423.1
Planta	TRIZOL	1684.8097	1685.817	AGSAVATVKAVGSDISGR	PRO-BLAST	401-kDa viral polyprotein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	NP_042860.2
Planta	TRIZOL	2451.1057	2452.113	SSITRGQRSAERKIGDFSFP	PRO-BLAST	p349 protein [Citrus tristeza virus]	No definido	100/100	CAP17858.1
Áfido	TRIZOL	1841.9357	1842.943	AGNAVATVKAVGSDIGGRVR	PRO-BLAST	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	ARO38250.1
Planta	TRIZOL	2278.1326	2279.1399	HGKNSYLPYMGEAALDDILR	PRO-BLAST	p346 [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sp.</i>	100/100	AAB38755.1
Áfido	TRIZOL	2414.1326	2415.1399	ALGMFPTVGALKTYLVREYGR	ProteinPilot™	ORF1a [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus macrophylla</i>	100/100	AGK38322.1
Áfido	TRIZOL	1717.7227	1718.73	AAVRAIKAAGRPIDAPR	ProteinPilot™	ORF1a [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	99	H9BQN3
Áfido	TRIZOL	1717.7227	1718.73	RAVEYGVGRGYFSAPR	ProteinPilot™	ORF1a [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	99	H9BQN3
Áfido	TRIZOL	1197.6356	1198.6429	VIDTSGVVRPR	ProteinPilot™	ORF1a [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	<1	H9BQN3

Planta	TRIZOL	1881.9927	1883	LMSFFSTLHTTGFKLR	ProteinPilot™	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	4.9	W8DXA0
Planta	TRIZOL	1117.5306	1118.538	RVSRNLFNL	ProteinPilot™	polyprotein [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus sinensis</i>	97.5	W8DXA1
Planta	TRIZOL	1881.9927	1883	PFIRGWYVVDAMKLR	PRO-BLAST	RNA-dependent RNA polymerase [Citrus tristeza virus]	<i>Citrus aurantifolia</i>	100/100	ANW12412.1
Planta	Pirovani	2025.0316	2026.0389	SSYEFQKQVARKLGDVK	PRO-BLAST	hypothetical protein CICLE_v10024837mg	<i>Citrus clementina</i>	100/100	XP_006427341.1
Planta	Pirovani	1724.7797	1725.787	RREHYNGSSRKDVR	PRO-BLAST	hypothetical protein CICLE_v10018447mg	<i>Citrus clementina</i>	100/100	XP_006444699.1
Planta	Pirovani	2045.9277	2046.9351	YAADEDAFFADYAEHLK	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_v10024615mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO73105.1
Planta	TRIZOL	1587.7057	1588.713	TNTDFLPYNGDGFK	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_v10025092mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006437083.1
Planta	Pirovani	2657.3347	2658.342	EQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGER	PRO-BLAST	hypothetical protein CICLE_v10033622mg	<i>Citrus clementina</i>	100/100	XP_006436017.1
Planta	Pirovani	1785.7957	1786.803	VIAWYDNEWGYSQR	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_1g013492mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO63479.1
Planta	TRIZOL	1881.9927	1883	LVDTFPGQSIDFFGALR	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_1g012383mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO69148.1
Planta	TRIZOL	2263.1587	2264.166	FVEKDIDYAAAVTVQLPGGER	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_1g019870mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO79409.1
Planta	TRIZOL	1759.8937	1760.901	DGIDYAAVTVQLPGGER	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_1g019870mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO79409.1
Planta	Pirovani	2361.2188	2362.2261	KQPLIRGRGVSYCKNLLSPR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	TRIZOL	1881.9927	1883	TFQMQETIAKFRDGR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	TRIZOL	1587.7057	1588.713	YPQKHEGQLTRMR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	TRIZOL	1759.8937	1760.901	YGVELIFKKQPLIR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	TRIZOL	1497.7987	1498.806	GVELIFKKQPLIR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	TRIZOL	2074.0786	2075.0859	PVVSCKSVDPMNELDWDL	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	TRIZOL	2074.0696	2075.0769	EKETAEAKEKGDENGKKR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	Pirovani	3150.4468	3151.4541	WIGIQVESDPEEVGCPSRPACVPESVLR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1

Planta	TRIZol	1739.7147	1740.722	CENVNGYLVNGKAGGR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1
Planta	TRIZol	2451.1917	2452.199	CIMTEFYHRLLETGDSNLPR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 2 isoform X3	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006480493.1
Planta	TRIZol	3049.4197	3050.427	EVVFESIRPLLEPMITPETMRLQPAR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 2 isoform X2	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006480490.1
Planta	TRIZol	1464.7866	1465.7939	STQVLCIIFVER	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 3 isoform X1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006474519.1
Planta	TRIZol	1915.9576	1916.965	IDYAPYQQRPPHHPHPR	ProteinPilot™	germin-like protein	<i>Citrus limon</i>	99	I6UVE3
Áfido	TRIZol	1717.7227	1718.73	GAVNQVTRVMSIELGK	PRO-BLAST	putative diacetyl/L-xylulose reductase	<i>Aphis citricidus</i>	100/100	AAV31409.1
Áfido	TRIZol	1687.6547	1688.662	DYQVYNEATGIPYR	PRO-BLAST	putative cytosolic thioredoxin peroxidase	<i>Aphis citricidus</i>	100/100	AAU84947.1
Áfido	TRIZol	1798.9006	1799.908	QNFPEYMTKEQIVR	PRO-BLAST	putative cathepsin B-S	<i>Aphis citricidus</i>	100/100	AAU84936.1
Áfido	TRIZol	1877.8737	1878.881	LEIESLDIMFKGTGVAR	PRO-BLAST	S-adenosylmethionine decarboxylase	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	BAB40144.1
Áfido	TRIZol	2414.1326	2415.1399	QLFHPEQLITGKEDAANNYAR	PRO-BLAST	PREDICTED: tubulin alpha-3 chain-like	<i>Diuraphis noxia</i>	100/100	XP_015372163.1
Áfido	TRIZol	2773.2336	2774.241	QTQFTTYSNDNPGVLIQVYEGER	PRO-BLAST	PREDICTED: heat shock 70 kDa protein cognate 4	<i>Diuraphis noxia</i>	100/100	XP_015366002.1
Áfido	TRIZol	1324.5747	1325.582	QLLAAAGFQHIR	PRO-BLAST	PREDICTED: target of rapamycin complex subunit Ist8	<i>Diuraphis noxia</i>	100/100	XP_015364771.1
Áfido	TRIZol	1980.8887	1981.896	AGETMEQAVCDVCKDIR	PRO-BLAST	PREDICTED: uridine-cytidine kinase-like 1	<i>Diuraphis noxia</i>	100/100	XP_015363659.1
Áfido	TRIZol	2741.2927	2742.3	FVNKEGVKMQEDMAWQAEMIVK	PRO-BLAST	PREDICTED: A-kinase anchor protein 10, mitochondrial	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_001943642.1
Áfido	TRIZol	2671.3066	2672.314	EFWMGNENIYMLTSNDEYMLR	PRO-BLAST	PREDICTED: angiopoietin-related protein 2	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_001951011.3
Áfido	TRIZol	2741.2126	2742.22	LNRQNPSRPNIPMDNRYVNSAR	PRO-BLAST	PREDICTED: TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1 isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_008182682.1
Áfido	TRIZol	3150.4468	3151.4541	TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR	PRO-BLAST	PREDICTED: actin-87E-like	<i>Diuraphis noxia</i>	100/100	XP_015366322.1
Áfido	TRIZol	1789.7827	1790.79	SYELPDGQVITIGNER	PRO-BLAST	PREDICTED: actin-42A-like	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_001948128.1
Áfido	TRIZol	2213.9167	2214.9241	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	PRO-BLAST	PREDICTED: actin-42A-like	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_001948128.1
Áfido	TRIZol	2213.9688	2214.9761	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	PRO-BLAST	PREDICTED: actin-42A-like	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_001948128.1

Áfido	TRIZOL	3150.6858	3151.6931	TTGIVLDSGDGVSHSTVPIYEGYALPHAIL R	PRO-BLAST	PREDICTED: actin-42A-like	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_001948 128.1
Áfido	TRIZOL	1403.6057	1404.613	YYVTIIDAPGHR	PRO-BLAST	PREDICTED: elongation factor 1- alpha	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_008182 369.1
Áfido	TRIZOL	1679.7396	1680.7469	VPVSVDRPVPYPVEK	PRO-BLAST	PREDICTED: MAGE-like protein 2 isoform X1	<i>Diuraphis noxia</i>	100/100	XP_015365 528.1
Áfido	TRIZOL	1862.7346	1863.7419	NFKLDNTCVSRCPFR	PRO-BLAST	PREDICTED: furin-like protease 2 isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_008183 106.1
Áfido	TRIZOL	1798.8007	1799.808	PVSCSAHACTNRRQR	PRO-BLAST	PREDICTED: THAP domain- containing protein 1-like	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_016655 729.1
Áfido	TRIZOL	2734.9668	2735.9741	EDCMVFIESYYHAASVYFFWR	PRO-BLAST	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100570038 isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_016658 605.1
Áfido	TRIZOL	1709.7617	1710.769	MTMTMATAASPRPRR	PRO-BLAST	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100571486	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	100/100	XP_003244 576.2

En el caso particular de la poliproteína codificada por el ORF 1a, se detectaron 18 secuencias peptídicas, 3 de ellas, reconocidas por el programa bioinformático ProteinPilot™ y pertenecientes a la poliproteína de 349 KDa (H9BQN3) del CTV. Al realizarse un seguimiento de su código de acceso, se verificó que corresponden a secuencias específicas de la cepa VT. Para comprobar estos resultados, se realizó un seguimiento invertido de la secuencia peptídica (desde aminoácidos hasta nucleótidos), analizado por BLASTp, y reconocido en genomas virales pertenecientes a la misma cepa.

Las 22 secuencias peptídicas correspondientes a proteínas del hospedero (plantas de limón) fueron clasificadas según su función biológica (Fig. 6 y Tabla 5 del anexo); así tuvimos, proteínas relacionadas a la defensa contra patógenos en la planta (germin-like, HSP70, Dicer, etc.) en un 4%, a la fotosíntesis (14%), metabolismo (14%), al estrés oxidativo 4%, plegamiento de proteínas (5%) y principalmente relacionadas al procesamiento de ARN (59%); reconocidas en otras especies más estudiadas como *C. sinensis* (naranja) y *C. clementina* (mandarina).

En el insecto vector, se detectaron 22 secuencias, procedentes de 19 proteínas, encontrándose 3 proteínas putativas (AAV31409.1, AAU84947.1, AAU84936.1) registradas en el mismo insecto analizado (*T. citricida*) y 16 predichas en especies de áfidos modelo (*Acythosiphon pisum* y *Diuraphis noxia*), encontrándose proteínas relacionadas a la estructura y ciclo celular, al metabolismo, a procesos de oxidoreducción, a la expresión de genes, a la respuestas a estrés, a proteínas no caracterizadas, etc.

La mayoría de las proteínas obtenidas a partir de las secuencias peptídicas detectadas en este trabajo (Tabla 4) fueron reconocidas al 100% en cobertura e identidad, o al 99% de confianza al ser analizadas mediante los programas bioinformáticos de búsqueda

BLASTp (PRO-BLAST), Protein Pilot (ProteinPilot™) y UniProt Blast (UNI-BLAST), a excepción de la secuencia QAKEQLLK (*Coat protein*) reconocida en un 0.3% de confianza; sin embargo, en la misma muestra se detectó dos secuencias peptídicas (IDPTLIAMNDVR y DFGIAMMLYR) identificadas en dicha proteína.

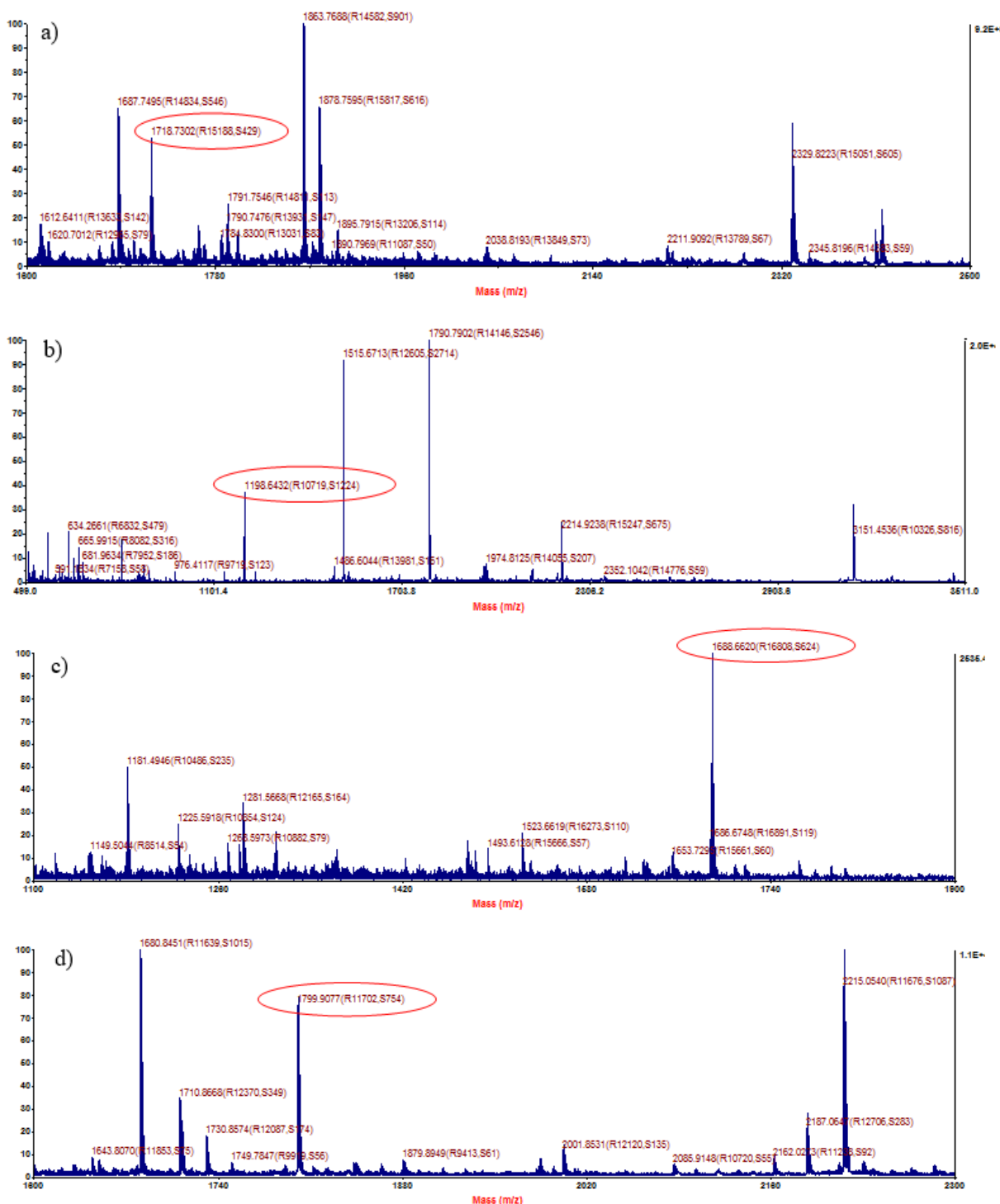


Figura 5. Espectros de masas obtenidos a partir del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF mostrando masas representativas de secuencias peptídicas correspondientes a: a) y b) secuencias peptídicas del ORF1a [Citrus tristeza virus], c) putative cytosolic thioredoxin peroxidase, d) putative cathepsin B-S.

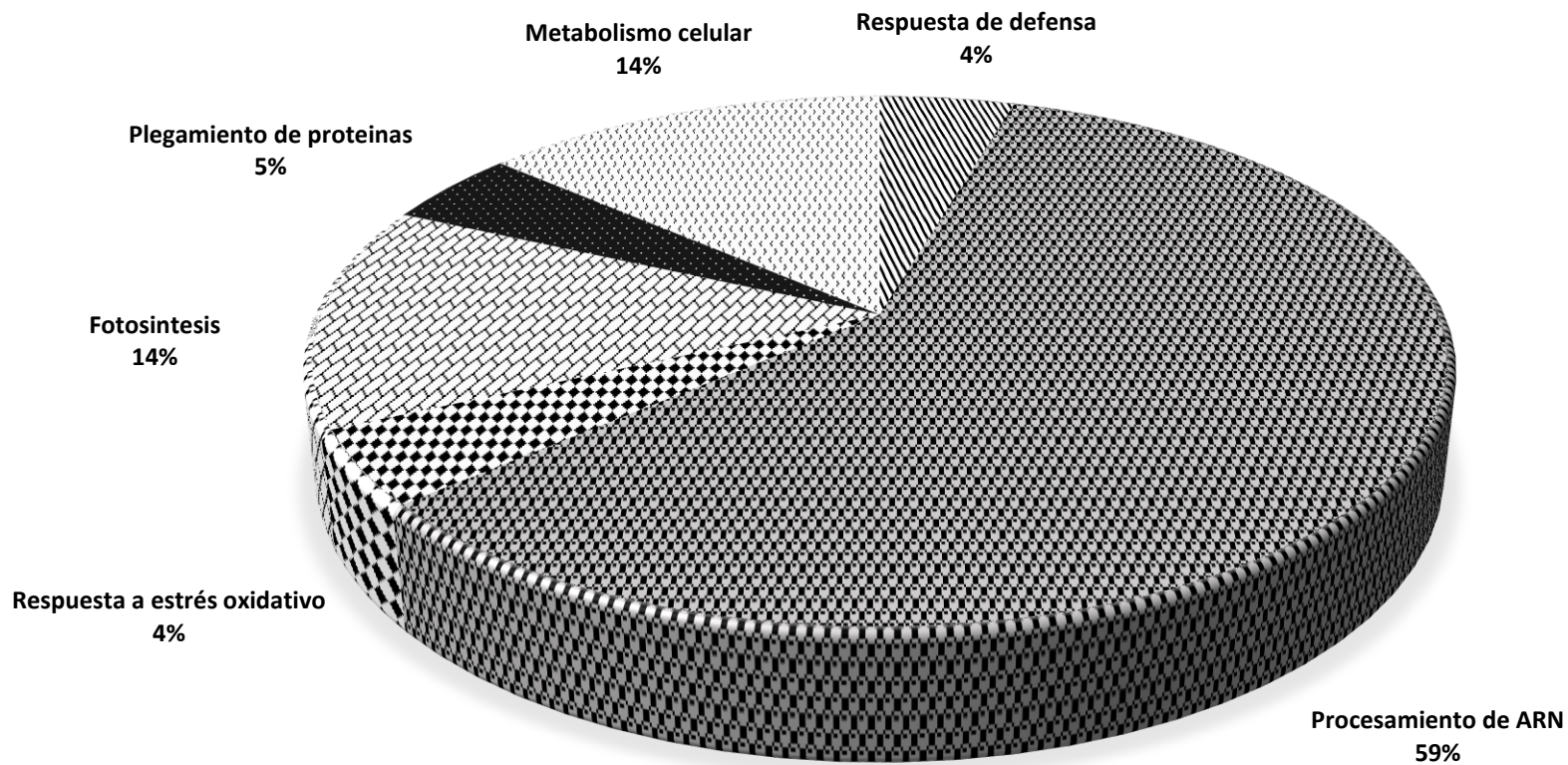


Figura 6. Funcionalidad de las proteínas detectadas mediante secuencias peptídicas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en plantas de limón sutil.

4. DISCUSIÓN

El Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) es el agente patógeno de cítricos más importante a nivel nacional, detectándose en el norte del Perú (principal región productora de limón) y la única enfermedad viral presente en el departamento de Tumbes (SENASA, datos no publicados); sin embargo, no se encuentran reportes o estudios en Tumbes referentes a CTV.

Diversos métodos de detección se han desarrollado a lo largo del tiempo; Saponari *et al.* (2008) mencionan, que técnicas basadas en PCR son más sensibles y útiles que ELISA para detectar el virus en muestras de campo cuando no posee una carga viral adecuada para pruebas serológicas. La técnica de RT-PCR ha sido ampliamente utilizada en la detección de CTV a escala mundial, gracias a su sensibilidad y graduable especificidad, orientado a la detección general o de genotipos virales, según la región amplificada del genoma viral.

El presente estudio describe ensayos de RT-PCR e implementación de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para la detección eficiente, específica y sensible de CTV y 5 genotipos virales en plantas de limón sutil (*C. aurantifolia*) y un insecto vector (*T. citricida*) ubicados en los principales sectores productores en el departamento de Tumbes.

Los resultados analizados a partir de ensayos de RT-PCR, nos proporcionan una estimación de la incidencia del 100%, al detectarse en la totalidad de muestras tomadas en los diferentes sectores productores (Canoas de Punta Sal, La Peña, Cabuyal y Matapalo); sin embargo, esta estimación deberá estar precisada con más análisis en futuras investigaciones a cargo de SENASA.

El CTV tiene una alta tasa de variabilidad genética, generando gran diversidad de aislados, agrupados en genotipos o cepas, ya sean severas o suaves (Dawson *et al.*, 2015). Las 5 principales cepas reportadas (T36, T3, T30, VT, B165) han sido detectadas en el departamento de Tumbes. El sector de

Canoas de Punta Sal (Contralmirante Villar, Tumbes) mostró mayor diversidad de genotipos, correspondiendo posiblemente a la predominancia de otras cepas en provincias de origen del material vegetal (varas yemeras) utilizado para obtención de plantones (o plantones mismo), sembrados posteriormente en campo definitivo; este material vegetal es adquirido por el personal de la empresa en viveros ubicados en provincias cercanas a Tumbes (Piura y Chiclayo). Así mismo, en el distrito de Matapalo, correspondiente a la provincia de Zarumilla, se detectaron 4 genotipos (T3, T30, VT, B165), deduciendo la posibilidad de encontrarse mayor diversidad de cepas en sectores colindantes a otros departamentos o territorios, donde es usual el ingreso de material vegetal infectado foráneo. La mayoría de estas cepas fueron detectadas por Hilf y colaboradores (2005) en países como Colombia, Argentina y Hawaii, donde muestran un patrón de detección similar.

El análisis en conjunto de los sectores evaluados mostró la presencia de las cepas en intensidades variables, dejando entrever la posibilidad de predominancia entre cepas, confirmando lo citado por autores como Harper *et al.* (2014) y Dawson *et al.* (2015), quienes mencionan que las poblaciones virales pueden estar conformadas por un aislado específico, aunque es muy usual encontrar una mezcla de aislados provenientes de cepas diversas. Cada cepa es considerada por expresar un síntoma específico y en una intensidad determinada (fenotipo).

En Tumbes, el mayor síntoma mostrado en campo es la acanaladura de tallos (*stem pitting*) producto de una inhibición en el crecimiento de nuevo xilema, aparentemente debido a las alteraciones provocadas por la infección viral en el tejido del cambium (Brlansky *et al.* 2002, citado por Dawson *et al.*, 2013). Este fenotipo, ha sido ampliamente relacionado a las cepas VT y T3 (Rossi, 2014; Xiao *et al.*, 2016), correspondiendo a las principales cepas detectadas en este trabajo. Asimismo, puede observarse que la concentración viral (relacionada a la intensidad de amplificación por análisis de RT-PCR) varía de acuerdo a las zonas evaluadas; sin embargo, la intensidad del síntoma es similar entre muestras de diversas zonas. Moreno *et al.* (2008) mencionan que los genotipos que expresan este síntoma, tienen una mayor aptitud (fitness) a

comparación de variantes suaves y se vuelven predominantes entre infecciones co-inoculadas, proveyendo una relación consistente entre los hallazgos en campo y los resultados del análisis de genotipaje; a pesar de la recombinación de genotipos y su presencia dentro del mismo hospedero pueden promover también la aparición de síntomas varios. Así mismo, estos resultados son semejantes a los mostrados por Hilf y colaboradores (2005), quienes al analizar 19 aislados virales provenientes de Perú, determinaron que la mayoría correspondían a las cepas T3 y VT.

Adicionalmente, la vida útil promedio de árboles de limón en Tumbes oscila entre los 7 a 25 años (datos no mostrados), muchos de estos afectados por CTV y mostrando síntomas severos de acanaladura, concordando con lo citado por Moreno y Ambrós (2011), los cuales mencionan que el síndrome de “*stem pitting*” usualmente no causa la muerte súbita del árbol, comparado con el síndrome de tristeza, además de reducir fuertemente su producción, rendimiento y calidad de fruto, intensificándose en variedades sensibles como *C. aurantifolia*.

Dentro de la implementación de la detección de CTV por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, 83 secuencias peptídicas fueron detectadas, de las cuales 41 corresponden a 10 proteínas virales (p1a, p1b, p13, p20, p23, p25, p27, p33, p61 y p65). Las proteínas estructurales p25 (CP) y p27 (CPm) constituyen la cápside viral; Dolja y Koonin (2013), así también, Satyanarayana *et al.* (2014), mencionan que estas proteínas encapsidan el 95 y 5% de genoma respectivamente, dejando entrever una posible relación directa entre el porcentaje de encapsidación del virión por las proteínas y su detección. Las proteínas p65 y p61 son relacionadas a la encapsidación debido a que interactúan directamente con la CPm, esta última fue detectada en el insecto vector en este trabajo; según Killiny *et al.* (2016), CPm es determinante en la habilidad de transmisión por el vector, al ser responsable de la fijación de la partícula viral en el tracto digestivo (*Cibarium*) del áfido, pudiendo sugerirse una mayor detección de la proteína dentro del insecto al encontrarse adherida. p20 y p23 actúan juntamente con la CP e intervienen en el silenciamiento de ARNs de interferencia antiviral del hospedero; estas

proteínas fueron ampliamente detectadas en tejido vegetal infectado mostrando síntomas severos, lo cual puede comprobar su rol de proteínas silenciadoras del sistema de defensa del hospedero, favoreciendo la infección viral. p33 y p13, proteínas no conservadas a nivel de familia (Closteroviridae) con funciones determinantes en la infección viral en algunos hospederos, influyen en la especificidad de infección de cepas (Satyanarayana y Dawson, 2012). Finalmente, la poliproteína 1a, la cual posee varios dominios funcionales, tales como: proteasa, helicasa y metiltransferasa, es codificada a partir del ORF con mayor porcentaje de variabilidad entre cepas virales; Albiach-Martí (2013) menciona que esta poliproteína forma parte del complejo replicativo viral, por tal motivo debe ser la primera proteína viral en traducirse, dando una posible explicación a la alta tasa de detección en diferentes tejidos. En este último caso, el análisis de las secuencias peptídicas para esta proteína pudo sugerir una posible asignación a genotipos virales establecidos.

Las secuencias peptídicas restantes, corresponden a proteínas del hospedero y del insecto vector, al no ser organismos ampliamente estudiados, son reconocidas en otros organismos modelos relacionados al ser analizados en bases de datos (NCBI protein y UNIPROT). Plantas mostrando estrés biótico, como infecciones virales, generalmente reaccionan a cambios en su perfil proteico o desarrollan una respuesta secundaria, tales como el incremento de especies oxígeno reactivo (Dória *et al.*, 2015). Tomando esto en consideración, el análisis de secuencias peptídicas detectado en *C. aurantifolia* reveló proteínas relacionadas al estrés oxidativo. Según Gandía, *et al.* (2007), la actividad de los radicales libres derivados del oxígeno ha sido asociada a desórdenes fisiológicos en plantas relacionados a estrés ambiental, induciendo la producción de enzimas envueltas en la detoxificación ROS (entre ellas peroxidasas), asociadas a la respuesta de la planta contra infecciones virales e induciendo muerte celular por altas concentraciones en especies susceptibles; mientras que Dória *et al.* (2015) concluye que la peroxidasa tipo APX (ascorbate peroxidasa, detectada en este estudio) predomina entre otras peroxidasas en plantas infectadas con CTV.

Se detectaron otras proteínas relacionadas a la respuesta de defensa y resistencia contra patógenos, como HSP70, NBS-LRR y Germin-like. En efecto, se ha mostrado una relación directa entre la acumulación de proteínas pertenecientes a la familia HSP70 y el posterior desencadenamiento de la respuesta de defensa de la planta en tomate (Piterková *et al.*, 2013; citado por Laino *et al.* 2016); proteínas NBS-LRR están asociadas a un clúster de genes, pertenecientes a *P. trifoliata* (Rutácea), las cuales inducen la resistencia contra CTV en comparación con otros cítricos (Laino *et al.*, 2016); asimismo, Gandía *et al.* (2007), detectaron la proteína Germin-like altamente expresada en el análisis proteómico de *C. aurantifolia* contra CTV, resaltando que son una familia de proteínas relacionadas a la patogénesis, siendo inducidas en la respuesta de resistencia a infecciones bacterianas y virales.

En *T. citricida* se detectaron tres secuencias no conservadas entre dominios, pertenecientes a 3 proteínas con secuencias específicas a la especie. Estas fueron analizadas por Blastp, dando como resultado una cobertura e identidad del 100% en proteínas relacionadas al metabolismo celular y actividades oxidoreductasa, sin embargo, solo una secuencia (*putative diacetyl/L-xylulose reductase*) reconoce específicamente a *T. citricida* sin reconocer en el mismo nivel de confianza e identidad a otras especies.

La alta sensibilidad y especificidad de la secuenciación proporcionada por el doble TOF del espectrómetro de masas MALDI, vislumbra posibles aplicaciones para la identificación de cepas virales, así como para la identificación de especies en insectos, tal cual se ha realizado trabajos en otras familias de insectos como Culicoides (Sambou, *et al.* 2015).

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se detectó a nivel molecular el Virus de la Tristeza de los Cítricos en las principales zonas productoras de limón en Tumbes por medio de RT-PCR, y una estimación de su incidencia es vislumbrada, el cual asciende al 100%.

Utilizando esta misma técnica, se realizó el genotipaje de cepas presentes en los 3 principales sectores productores de limón en el departamento de Tumbes, comprobando la relación entre las cepas detectadas y el fenotipo expresado en las plantas en campo.

Adicionalmente, se logró implementar la técnica por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF como una herramienta eficiente para la detección viral; incluso, su alta resolución permitió entrever posibles aplicaciones futuras en el genotipaje de cepas, así como en la determinación de especies en organismos eucariotas mayores, como insectos.

Este trabajo de investigación podría ser el primer reporte de acceso público sobre la detección molecular de CTV en Tumbes, así como el primero de la aplicación de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF sobre la detección en plantas de limón sutil (*C. aurantifolia*) y en el áfido marrón de los cítricos (*T. citricida*). Asimismo, podría servir como referencia para próximos trabajos en interacción planta-virus o virus- vector por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adkar-Purushothama C. R., P. K. Mahesh war, T. Sano, Janardhana & G. R. (2011). A sensitive and reliable RT-nested PCR assay for detection of Citrus Tristeza Virus from naturally infected citrus plants *Curr Microbiol*, 62:1455–1459. DOI 10.1007/S00284-011-9883-7
2. Ahmad F., Babalola O. O. and Tak H. I. (2012). Potential of Maldi-Tof Mass Spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: Identification of plant-associated microorganisms. *Anal Bioanal Chem* Doi 10.1007/S00216-012-6091-7
3. Albiach-Marti, M. R. (2012). Molecular Virology and Pathogenicity of Citrus Tristeza Virus. INTECH Open Access Publisher.
4. Albiach-Marti, M. R. (2013). The Complex Genetics of Citrus Tristeza Virus. *Current Issues in Molecular Virology-Viral Genetics and Biotechnological Applications*, 1-26.
5. Ambrós A, S. Ruiz-Ruiz, L. Peña and Moreno P. (2013). A genetic system for Citrus Tristeza Virus using the non-natural host *Nicotiana benthamiana*: An Update. *J. Frontiers in Microbiology, Virology*. Volume 4, Art. 165.
6. Bar-Joseph, M., Batuman O., Androis- Tacher and C. N. (2010). “The history to Citrus Tristeza Virus – Revisited,” *In Citrus Tristeza Virus complex and tristeza diseases*. St. Paul, Mn: American Phytopathological society, 3–26.
7. Bar-Joseph, M., Marcus, M.R. and Lee, R.F. (1989). The continuous challenge of Citrus Tristeza Virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27: 291-316.

8. Bederski K., C. N. Roistacher and Müller G. (2005). Cross protection against the severe *Citrus Tristeza Virus stem pitting* in Peru. *Sixteenth IOCV Conference, 2005*.

9. Besoain, X. (2008). Incidencia, caracterización y epidemiología del Virus de la Tristeza de los Cítricos en Chile. IVIA. Valencia. España. Pp. 12, 18, 20, 69, 72.

10. Brlansky, R. H., Howd, D. S., Broadbent, P., & Damsteegt, V. D. (2002). Histology of sweet orange *stem pitting* caused by an Australian isolate of Citrus Tristeza Virus. *Plant disease*, 86(10), 1169-1174.

11. Buckman, R. S. (2012). Phylogenetics of Thysanoptera (Insecta: Paraneoptera). Brigham Young University – Provo.

12. Cambra M., M. Gorris, C. Marroquín, M. P. Román, A. Olmos, M. Martínez, A. de Mendoza, A. López & Navarro L. (2000). Incidence and epidemiology of *Citrus Tristeza Virus* in the Valencian community of Spain. Ivia. Valencia, España. *Virus Research*. 71. 85–95. *Citrus Tristeza Virus. Journal Of Virology. Vol. 86, N° 15 P. 7850–7857*

13. Cambra, M. y Moreno, P. (2000). Tristeza. enfermedades de los cítricos. P. Moreno, N. Durán-Vila (eds.). Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. N°2. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 213 pp.

14. Dawson W., M. Bar-Joseph, S. M. Garnsey & Moreno P. (2015). *Citrus Tristeza Virus: Making an ally from an enemy*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2015. 53:7.1–7.19

15. Dawson, W. O., Garnsey, S. M., Tatineni, S., Folimonova, S. Y., Harper, S. J., & Gowda, S. (2013). Citrus Tristeza Virus-host interactions. *Frontiers in microbiology*, 4.

16. Dolja V. & E. V. Koonin. (2013). The *Closterovirus* derived gene expression and RNA interference vectors as tools for research and plant biotechnology. J. Frontiers in Microbiology. Virology, Vol. 4, Art. 83.
17. Dória, M. S., de Sousa, A. O., de Jesus Barbosa, C., Costa, M. G. C., da Silva Gesteira, A., Souza, R. M., ... & Pirovani, C. P. (2015). Citrus Tristeza Virus (CTV) causing proteomic and enzymatic changes in sweet orange variety "Westin". PloS one, 10(7), e0130950.
18. Fang, X., Chen, J., Dai, L., Ma, H., Zhang, H., Yang, J. & Yan, C. (2015). Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. Proteomics, 15(9), 1525-1543.
19. Folimonova S. Y., S. Harper, M. Leonard, E. Triplett & Shilts T. (2014). Superinfection exclusion by Citrus Tristeza Virus does not correlate with the production of viral small RNAs. Virology, 468-470. 462–471
20. Gandía, M., Conesa, A., Ancillo, G., Gadea, J., Forment, J., Pallás, V., ... & Guerri, J. (2007). Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by Citrus Tristeza Virus. Virology, 367(2), 298-306.
21. Harper, S. J. (2013). Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups. Frontiers in microbiology, 4.
22. Harper S.J., S.J. Cowell, C.J. Robertson & Dawson W.O. (2014). Differential tropism in roots and shoots infected by Citrus Tristeza Virus. J. Virology 460-461, 91–99
23. Harper, S. J., Killiny, N., Tatineni, S., Gowda, S., Cowell, S. J., Shilts, T., & Dawson, W. O. (2016). Sequence variation in two genes determines the efficacy of transmission of Citrus Tristeza Virus by the brown citrus aphid. Archives of virology, 161(12), 3555-3559.

24. Hilf M. E., V. A. Mavrodieva & Garnsey S. M. (2005). Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus Tristeza Virus*: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. The American Phytopathological Society, 2005. Vol. 95, No. 8, 2005
25. Huang, Z., Rundell, P. A., Guan, X., and Powell, C. A. (2004). Detection and isolate differentiation of Citrus Tristeza Virus in infected field trees based on Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis.* 88:625-629.
26. INEI, (2015). Perú: Panorama económico departamental. Tumbes, Enero 2015. Informe Técnico N° 3. Marzo. Available from: https://www.inei.gob.pe/media/.../informe-tecnico-n03_panorama-dptal-ene2015.pdf. Accessed: 31 de mayo del 2016
27. Jovel J. y P. Ramírez (2002). Silenciamiento de genes virales: el contraataque de las plantas frente a infecciones de virus fitopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* No. 66 p. 49 - 61
28. Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowsky, D.J. & Dawson, W.O., (1995). Complete sequence of the Citrus Tristeza Virus RNAs genome. *Virology* 208, 511–520.
29. Killiny, N., Harper, S. J., Alfaress, S., El Mohtar, C., & Dawson, W. O. (2016). Minor coat and heat shock proteins are involved in the binding of Citrus Tristeza Virus to the foregut of its aphid vector, *Toxoptera citricida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), 6294-6302.
30. Laino, P., Russo, M. P., Guardo, M., Reforgiato-Recupero, G., Valè, G., Cattivelli, L., & Moliterni, V. (2016). Rootstock–scion interaction affecting

- citrus response to CTV infection: a proteomic view. *Physiologia plantarum*, 156(4), 444-467.
31. Lee R. (2014). Control of virus diseases of citrus. *Advances In Virus Research* # 2014, Issn 0065-3527. 143-173
 32. Lee R. & Keremane M. L. (2013). Mild *strain* cross protection of Tristeza: Are view of research to protect against decline on sour orange in Florida. *J. Frontier in Microbiology*. Vol. 4, Art. 259.
 33. Lee, R. F. and Rocha-Pena, M. A. (1992). "Citrus tristeza virus," In plant diseases of international importance. Vol. III, Edsa. N. Mukhopadhyay, H. S. Chaube, J. Kumarandu. S. Singh (New Jersey: Prentice hall),226–249.
 34. Mehta, P., Brlansky, R. H., Gowda, S., and Yokomi, R. K. (1997). Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction detection of Citrus Tristeza Virus in aphids. *Plant Dis*. 81:1066-1069.
 35. Mendoza A., C. Salazar, O. Alvarado, M. A. Cruz & Barrera H. (2005). Caracterización molecular de razas severas y débiles del Virus de la Tristeza de los Cítricos. *Rev. Ciencia UANL*. Vol. VIII, No. 2, 250-258.
 36. Moreno P. y Ambrós S. (2011). bases para el control de las enfermedades causadas por el Virus de la Tristeza de los Cítricos. *Ivia*. Valencia, España.
 37. Moreno, P., AmbroS, S., Albiach-Marti, M. R., Guerri, J., & Pena, L. (2008). Citrus Tristeza Virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251-268.
 38. Osman F., E. Hodzic, S. Kwon, J. Wang & Vidalakis G. (2015). Development and validation of a multiplex Reverse Transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection Of Citrus Tristeza Virus, Citrus Psorosis Virus, And Citrus Leaf Blotch Virus. *J. Virol. Methods* [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Jviromet.2015.04.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.013)

39. Piao, J., Jiang, J., Xu, B., Wang, X., Guan, Y., Wu, W., ... & Zhao, J. (2012). Simultaneous detection and identification of enteric viruses by PCR-mass assay. *PloS one*, 7(8), e42251.
40. Roistacher C. N. y P. Moreno. (1991). The Worldwide threat from destructive isolates of Citrus Tristeza Virus-A Review. *Eleventh ZOCV Conference*
41. Roistacher C.N., J. V. Da Graça & Müller G. W. (2010). Cross protection against Citrus Tristeza Virus - A review. *Proceedings, 17th Conference, 2010*.
42. Roistacher, C.N., (1991). Graft-transmissible diseases of citrus. In: *Handbook for detection and diagnosis*. Fao, Rome, Italy.
43. Rossi, V. (2014). Scientific opinion on the pest categorisation of Citrus Tristeza Virus. *The EFSA Journal*, 12(Dicembre), 1-32.
44. Roy A, A. Fayad, G. Barthe & Brlansky R.H. (2005). A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *Journal of Virological Methods* 129, 47–55
45. Roy, A., Ananthkrishnan, G., Hartung, J. S., & Brlansky, R. H. (2010). Development and application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of Citrus Tristeza Virus isolates. *Phytopathology*, 100(10), 1077-1088.
46. Rubio-Piña J. & Zapata-Pérez O. (2011). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *J. Biotechnology*. Vol. 14, N° 5. Doi:10.1094/Phyto-04-10-0102

47. Ruiz-Ruiz, S. (2009). El Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV): Desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz. Ivia. Valencia, España.
48. Sambou, M., Aubadie-Ladrix, M., Fenollar, F., Fall, B., Bassene, H., Almeras, L., ... & Parola, P. (2015). Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and molecular biology techniques for identification of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) biting midges in Senegal. *Journal of clinical microbiology*, 53(2), 410-418.
49. Saponari, M., Manjunath, K., & Yokomi, R. K. (2008). Quantitative detection of Citrus Tristeza Virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 147(1), 43
50. Satyanarayana T. and Dawson W.O. (2012). Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus Tristeza Virus*. *Journal of Virology*. Vo. 86, N° 15. p. 7850–7857.
51. Satyanarayana T., S. Gowda, M. A. Ayllón & Dawson W. O. (2014). *Closterovirus* bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307747100-
52. Satyanarayana, T., Bar-Joseph, M., Mawassi, M., Albiach-Martí, M. R., Ayllón, M. A., Gowda, S., ... & Dawson, W. O. (2001). Amplification of Citrus Tristeza Virus from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology*, 280(1), 87-96.
53. Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860.

54. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK & Viridi JS. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6:791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791
55. Tan, S. W. L., Wong, S. M., & Kini, R. M. (2000). Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC-and/or MALDI-mass spectrometry. *Journal of virological methods*, 85(1), 93-99.
56. Villegas C. y L. Coto. (1984). Tristeza de los Cítricos: Bibliografía parcialmente anotada. Documentación e información agrícola. N° 100. ISSN 0301. 438X. Programa de sanidad vegetal. IICA. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=BPOV5K0rloYC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=true>. Accessed: 31 de mayo del 2016
57. Xiao, C., Yao, R. X., Li, F., Dai, S. M., Licciardello, G., Catara, A., ... & Deng, Z. N. (2017). Population structure and diversity of Citrus Tristeza Virus (CTV) isolates in Hunan province, China. *Archives of virology*, 162(2), 409-42
58. Xu, Q., Ni, H., Chen, Q., Sun, F., Zhou, T., Lan, Y., & Zhou, Y. (2013). Comparative proteomic analysis reveals the cross-talk between the responses induced by H₂O₂ and by long-term rice black-streaked dwarf virus infection in rice. *PloS one*, 8(11), e81640.
59. Yang, Z, D. M. Mathews, J. A. Dodds & Mirkov T. E. (1999). Molecular characterization of an isolate of Citrus Tristeza Virus that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* 19:2, 131±14
60. Zhang, Y. L., Pennerman, K. K., Wang, H., & Yin, G. (2016). Characterization of a Sorghum mosaic virus (SrMV) isolate in China. *Saudi journal of biological sciences*, 23(2), 237-242.

Anexos

Anexo A.

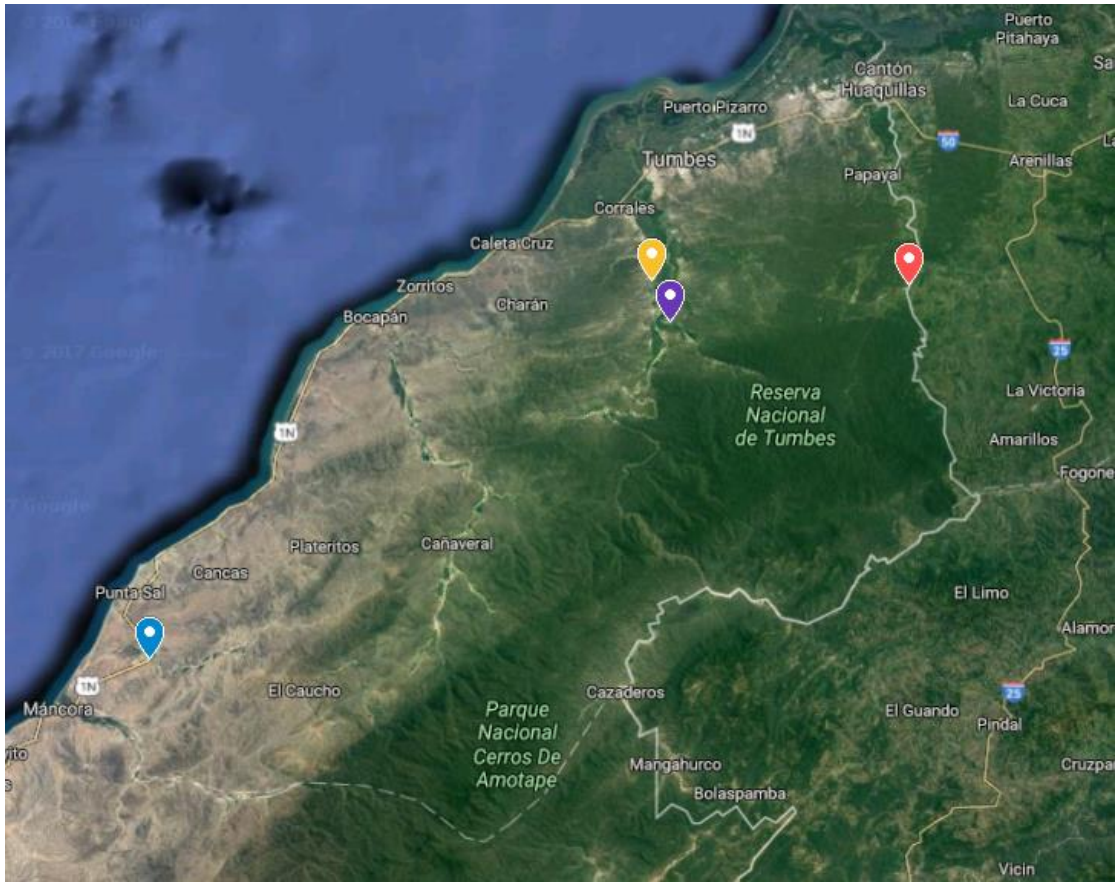


Figura 7. Principales sectores productores de limón por provincia en el departamento de Tumbes y ubicación de puntos de muestreos. Amarillo, La Peña – San Jacinto; Azul, Canoas de Punta Sal-Contralmirante Villar; Morado, Cabuyal – Pampas de Hospital; Rojo, Matapalo-Zarumilla.

Anexo B.

Tabla 5. Secuencias peptídicas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en *Citrus aurantifolia*, con sus respectivas funciones moleculares y procesos biológicos en los que participan.

Prec MW	Prec m/z	Prec z	Secuencia	Análisis	Nombre	Organismo	Conf. o Cb/lid.	Accesión	Función molecular	Proceso biológico
2025.0316	2026.0389	1	SSYEFGKQVARKLGDKV	PRO-BLAST	NBS-LRR type disease resistance protein	<i>Poncirus trifoliata</i>	100/100	XP_006427341.1	ADP binding	Respuesta de defensa
1724.7797	1725.787	1	RREHYNGSSRKDVR	PRO-BLAST	hypothetical protein CICLE_v10018447mg	<i>Citrus clementina</i>	100/100	XP_006444699.1	fijacion de ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
2045.9277	2046.9351	1	YAADEDAFFADYAEHLK	UNI-BLAST	Ascorbate peroxidase	<i>Citrus unshiu</i>	100	A0A0K2SS54	fijacion heme, actividad peroxidasa	Respuesta a estrés oxidativo
1587.7057	1588.713	1	TNTDFLPYNGDGFK	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_v10025092mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006437083.1	fijacion de ion calcio	Fotosíntesis
2657.3347	2658.342	1	EQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGER	PRO-BLAST	hypothetical protein CICLE_v10033622mg	<i>Citrus clementina</i>	100/100	XP_006436017.1	fijacion de ATP	Plegamiento de proteínas
1785.7957	1786.803	1	VIAWYDNEWGYSQR	UNI-BLAST	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	A0A067F804	actividad oxidoreductasa, aceptor NAD o NADP	Metabolismo celular
1881.9927	1883	1	LVDTFPGQSIDFFGALR	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_1g012383mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO69148.1	fijacion de ATP	Metabolismo celular
2263.1587	2264.166	1	FVEKDGIDYAAVTQLPGGER	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_1g019870mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO79409.1	fijacion de ion calcio	Fotosíntesis
1759.8937	1760.901	1	DGIDYAAVTQLPGGER	PRO-BLAST	hypothetical protein CISIN_1g019870mg	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	KDO79409.1	fijacion de ion calcio	Fotosíntesis
2361.2188	2362.2261	1	KQPLIRGRGVSYCKNLLSPR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
1881.9927	1883	1	TFQMQETIAKFRDGR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
1587.7057	1588.713	1	YPQKHEGQLTRMR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN

1759.8937	1760.901	1	YGVELIFKKQPLIR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
1497.7987	1498.806	1	GVELIFKKQPLIR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
2074.0786	2075.0859	1	PVVSDKSVDPMNELDWDL	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
2074.0696	2075.0769	1	EKETAEAKEKGDENGKKR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
3150.4468	3151.4541	1	WIGIQVESDPPEVGCPSRPACVPESVLR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
1739.7147	1740.722	1	CENVNGYLVNGKAGGR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006491399.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
2451.1917	2452.199	1	CIMTEFYHRLLETGDSNLPR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 2 isoform X3	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006480493.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
3049.4197	3050.427	1	EVVFESIRPLLEPMITPETMRLQPAR	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 2 isoform X2	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006480490.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
1464.7866	1465.7939	1	STQVLCIIFVER	PRO-BLAST	PREDICTED: endoribonuclease Dicer homolog 3 isoform X1	<i>Citrus sinensis</i>	100/100	XP_006474519.1	fijacion ATP, actividad ribonucleasa III, fijacion de ARN	Procesamiento de ARN
1915.9576	1916.965	1	IDYAPYQRRPPIHPR	ProteinPilot™	Germin-like protein	<i>Citrus limon</i>	99	I6UVE3	activacion reservorio nutrientes	de de Metabolismo celular

Anexo C.

```
ATGGACGACGAGACAAAGAAATTGAAGAACAAAAACAAGGAGACGAA  
AGAAGGCGACGATGTTGTTGCAGCAGAGTCTTCTTTCCGGTCCGTGAAC  
TTACACATCGATCCGACTCTGATAGCGATGAACGATGTGCGTCAGTTGG  
GAACCCAACAGAACGCCGCATTGAACAGAGACTTGTTTCTTACTCTGAA  
AGGGAAGTATCCTAACTTGCCTGACAAGGATAAGGATTTCCACATAGCT  
ATGATGTTATATCGTTTAGCGGTTAAGAGTTCATCGTTGCAAAGTGATGA  
TGACACCACGGGTATAACATATACTCGGGAGGGTATTGAAGTGGATTTG  
TCTGACAAGCTTTGGACTGACGTCGTGTTTAACTCCAAGGGTATTGGTA  
ACCGTACTAATGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGACTAACGATGCCCTTTA  
TTAGCTTTCTGTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGTGGACGTCCG  
CTAGATGCAGGGATTCCGGCTGGATATCATTACCTATGTGCAGATTTCT  
TGACCGGAGCTGGCTTGACTGATTTAGAATGATGCTGTGTACATAACAAG  
ACTAAGGAACAATTGTTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTA  
CTAATGTCAGGCAGCTTGGGAAATAACACACGTTGA
```

Figura 8. Secuencia peptídica del gen cp25 detectado en este trabajo (672 pb.), mostrando secuencia de primer Forward (negrita) y secuencia complementaria a primer Reverse (gris negrita).

Dedicatoria

A mis padres, por el apoyo incondicional en cada momento suscitado, por ser mi guía en momentos de oscuridad.

A mis abuelos, por inculcarme el amor a la naturaleza y las ciencias.

A mi hija, por ser mi fuerza y motivo más grande, por su amor y comprensión incondicional.

Agradecimientos.

Agradezco profundamente a los integrantes y ex integrantes del equipo técnico y científico de la empresa INCA BIOTEC S.A.C., conformado por César Santos, Pedro Masias, Petter Baca, Juan Quimi, Benoit Diringer y Max Salvatierra; a mis compañeros César Mogollón, Erick Suárez, Jean Silva, Manuel Saucedo, Carlos Condemarín y Savina Gutiérrez; a la cooperativa Agraria productora de limón de Cabuyal, APROLIMON en Matapalo y al Fundo “El Encanto”, propiedad de Grupo Sinchi S.A. por proporcionar material para muestras; a Rigoberto Rojas, perteneciente a la Agencia Agraria de Zarumilla; a Juan Farías del Proyecto Binacional Puyango Tumbes; al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Principalmente a Eric Mialhe, Virna Cedeño y Emmerik Motte por la asesoría científica y apoyo incondicional; al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación tecnología del Perú (CONCYTEC), CIENCIACTIVA, FONDECYT; a la Universidad Nacional de Tumbes por el desarrollo y financiamiento de la maestría en Biotecnología Molecular y a todas las personas involucradas en el desarrollo de este trabajo.