

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ciencias de la Vida**

Título del trabajo

**Prevalencia de raspberry bushy dwarf virus y rose ilarvirus-2 en Ecuador para la propagación de plantas de mora**

**Proyecto Integrador**

Previo la obtención del Título de:

**Biólogo**

Presentado por:

Raul Bolívar Cifuentes Morales

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

## Dedicatoria

---

El presente proyecto lo dedico a mis padres, el principal pilar sobre el cual me he apoyado durante toda mi carrera universitaria. A mi tutor, el Ph D. Diego Quito-Ávila, por su guía, consejos, enseñanzas, oportunidades, y por confiar en mí. Al Blgo. Joseph Berruz por impulsarme a dar siempre lo mejor de mí en toda situación y por cada una de sus enseñanzas.

## Agradecimientos

---

Mi más sincero agradecimiento a mi madre Mayra Cristina y a mi padre Raul por ser quienes me han inspirado a cumplir todas mis metas siempre. A mis hermanos por ser mi consorte siempre. A Carla y Cristhian por su amistad y ser un apoyo mutuo durante los momentos más difíciles. A la Escuela Superior Politécnica del Litoral por todas las oportunidades que he tenido por ser parte de su comunidad universitaria. Y a todo el equipo del laboratorio de Virología Molecular por su incondicional ayuda durante el desarrollo de este proyecto.

## Declaración Expresa

---

Yo Raul Bolivar Cifuentes Morales acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, \_\_\_\_\_ del 2024.



Raul Bolivar Cifuentes  
Morales

**Evaluadores**

---

**Diego Arturo Gallardo Polit**

Profesor de Materia

---

**Diego Fernando Quito Avila**

Tutor de proyecto

## Resumen

Se tuvo como objetivo de este estudio determinar la prevalencia y variabilidad genética de *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) y *Rose ilarvirus-2* (RIV-2) en cultivos de mora andina (*Rubus glaucus*) en Ecuador. La problemática radica en la propagación de estos virus, que afectan negativamente el rendimiento y la calidad del fruto, amenazando la producción sostenible. Se abordaron como preguntas de investigación el cómo estos virus impactan los cultivos y qué medidas pueden implementarse para su control.

Se recolectaron muestras de hojas en diferentes años (2017, 2018, 2023) en las provincias de Tungurahua y Pichincha, y se analizaron utilizando secuenciación de alto rendimiento (HTS), RT-PCR y secuenciación Sanger.

Los resultados muestran una alta prevalencia de RBDV en todas las muestras y una variabilidad genética limitada entre los aislados ecuatorianos, sugiriendo una población viral estable. Sin embargo, también se detectaron eventos de recombinación en RBDV, lo que podría implicar una mayor capacidad de evolución. La coinfección con RIV-2 también fue significativa, lo que indica la necesidad de protocolos de diagnóstico más robustos. Los análisis filogenéticos y de recombinación permitieron identificar la prevalencia de RBDV y la primera detección de RIV-2 en Ecuador.

Como conclusión, se recomienda implementar programas nacionales de monitoreo y control de virus en viveros, además de ampliar el estudio para incluir más regiones y analizar el impacto de factores ambientales en la evolución viral. Esto contribuiría a mejorar la sostenibilidad de la producción de mora andina en Ecuador.

## Abstract

The objective of this study was to determine the prevalence and genetic variability of \*Raspberry bushy dwarf virus\* (RBDV) and \*Rose ilarvirus-2\* (RIV-2) in Andean blackberry (\*Rubus glaucus\*) crops in Ecuador. The issue lies in the spread of these viruses, which negatively affect fruit yield and quality, threatening sustainable production. The research questions addressed how these viruses impact crops and what measures can be implemented for their control.

Leaf samples were collected in different years (2017, 2018, 2023) from the provinces of Tungurahua and Pichincha and analyzed using high-throughput sequencing (HTS), RT-PCR, and Sanger sequencing.

The results show a high prevalence of RBDV in all samples and limited genetic variability among the Ecuadorian isolates, suggesting a stable viral population. However, recombination events in RBDV were also detected, which could imply a greater evolutionary capacity. The coinfection with RIV-2 was also significant, indicating the need for more robust diagnostic protocols. Phylogenetic and recombination analyses identified the prevalence of RBDV and the first detection of RIV-2 in Ecuador.

In conclusion, it is recommended to implement national virus monitoring and control programs in nurseries, in addition to expanding the study to include more regions and analyze the impact of environmental factors on viral evolution. This would contribute to improving the sustainability of Andean blackberry production in Ecuador.

## Índice General

<b>Declaración Expresa</b> .....	4
<b>Evaluadores</b> .....	5
<b>Resumen</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Abreviaturas</b> .....	3
<b>Capítulo 1</b> .....	6
1. Introducción .....	7
1.1. Descripción del problema .....	8
1.2. Justificación del problema.....	8
1.3. Objetivos .....	9
1.3.1. Objetivo General .....	9
1.3.2. Objetivos específicos .....	10
1.4. Marco teórico .....	10
1.4.1. Detección de virus por RT-PCR .....	10
1.4.2. Análisis bioinformático .....	11
1.4.3. Secuenciación de alto rendimiento (HTS) .....	12
1.4.4. Rose ilarvirus-2 .....	13
1.4.5. Raspberry bushy dwarf virus .....	14
<b>Capítulo 2</b> .....	16
2. Metodología.....	17
2.1.1. Muestras y secuenciación de alto rendimiento.....	17
2.1.2. Diseño de primers .....	18
2.1.3. Detección por RT-PCR .....	18
2.1.4. Preparación de muestras para secuenciación Sanger.....	19
2.1.5. Análisis de filogenia y recombinación .....	19
<b>Capítulo 3</b> .....	21
3. Resultados y análisis.....	22



3.1. Secuencias obtenidas de RIV-2 y RBDV mediante HTS (2018).....	22
3.2. Prevalencia y variabilidad genómica de RIV-2 .....	23
3.3. Prevalencia de virus a lo largo de los años .....	23
Año de recolección y muestras .....	23
3.3.1. 2017 .....	23
3.3.2. 2018 .....	24
3.3.3. 2023 .....	24
3.4. Secuenciación .....	25
3.5. Alineaciones múltiples de secuencias y análisis de detección de recombinación (RBDV) .....	27
Capítulo 4 .....	30
4.1. Conclusiones .....	31
4.2. Recomendaciones .....	32
Bibliografía .....	33

## Abreviaturas

AA aminoácidos

INIAP Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

HTS High-throughput sequencing

ML Maximum likelihood/Máxima verosimilitud

NCBI National Center for Biotechnology Information

Nt Nucleótidos

RDP4 Recombination detection program 4

RIV-Rose ilarvirus 2

RBDV Raspberry bushy dwarf virus

RT-PCR Reverse transcription-polymerase chain reaction

SNSV Strawberry necrotic shock virus

## Índice de Figuras

Figura 1 Gráfico de eventos de recombinación generado por RDP4.....32

Figura 2 Árbol de máxima similitud de las secuencias de aminoácidos de (A) la proteína de movimiento, (B) la proteína de la cápside y (C) RdRp del *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV).....

**Error! Bookmark not defined.**

## Índice de tablas

Tabla 1. <i>Primers diseñados para detección de los virus</i> .....	21
Tabla 2 Muestreo en campo de virus en mora.....	23
Tabla 3 Resumen de los resultados de identificación de virus por secuenciación de alto rendimiento (HTS).....	24

## Capítulo 1

## 1. Introducción

El género *Rubus*, perteneciente a la familia Rosaceae, comprende varias especies de importancia comercial, incluyendo especies de moras y frambuesas. *Rubus glaucus*, comúnmente conocida como mora andina, o ‘Mora de Castilla’, es la especie predominante en la región andina. En Ecuador, las moras de ‘Castilla’ y una especie desconocida de *Rubus*, conocida coloquialmente como ‘Colombiana’, se producen a nivel familiar en cientos de pequeñas áreas que comprenden aproximadamente 6,000 ha. En 2013, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador lanzó un nuevo cultivar de *R. glaucus*. El nuevo cultivar, llamado INIAP-Andimora, es una mutante sin espinas de ‘Castilla’ con excelente rendimiento y calidad de fruto, lo que la ha hecho ser aceptada por productores y consumidores (Viteri D. et al., 2016).

A nivel mundial, la producción de moras, entre otras pequeñas frutas, puede verse limitada por la presencia de varios virus patógenos que pueden reducir el rendimiento y la calidad del fruto. Los síntomas causados por virus pueden variar dependiendo del hospedero, pero también de si los virus se encuentran en infecciones simples o mixtas. De hecho, ahora se sabe que varias enfermedades virales en el género *Rubus* son causadas por complejos virales que involucran dos o más virus que actúan, generalmente, de manera sinérgica (Martínez et al., 2013).

En Ecuador, el Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) es el único virus reportado anteriormente en plantas de mora ‘Castilla’ con y sin presencia de síntomas en viveros y campos de producción. El RBDV tiene una distribución mundial y se considera uno de los virus más económicamente importantes en *Rubus*. Adicionalmente, virus transmitidos por el

polen del género *Ilarvirus* (familia Bromoviridae) han sido identificados desde hace mucho tiempo en *Rubus*. (Quito-Avila et al, 2013).

En Ecuador, la informalidad en la propagación de moras junto con la falta de un programa nacional de pruebas de virus en viveros puede amenazar la producción sostenible de la mora andina. Este estudio pretende informar sobre la ocurrencia de RBDV y reportamos por primera vez la ocurrencia y la variabilidad genética del rose ilarvirus-2 (RIV-2), un ilarvirus identificado recientemente, en moras en Ecuador (Chen,T et al, 2022).

### **1.1.Descripción del problema**

Este estudio se centra en identificar los desafíos asociados con la producción de la mora andina (*Rubus glaucus*) en Ecuador, específicamente aquellos relacionados con la propagación de virus patógenos que afectan la calidad y el rendimiento del cultivo. La mora andina es un cultivo de gran importancia económica y social en las regiones andinas de Ecuador, donde es cultivada predominantemente en pequeñas parcelas familiares. Sin embargo, la presencia de virus como el Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) y la reciente identificación del Rose Ilarvirus-2 (RIV-2) han presentado serias amenazas para la sostenibilidad de la producción. Estos virus pueden causar síntomas variados en las plantas, afectando desde el rendimiento hasta la calidad del fruto, lo cual repercute negativamente en los ingresos de los agricultores y en la economía local.

### **1.2. Justificación del problema**

Llevar a cabo esta investigación es crucial principalmente a que la mora andina es un componente vital de la economía agrícola en las regiones andinas de Ecuador, proporcionando ingresos esenciales para una gran cantidad de familias que dependen de su

cultivo. La disminución en la producción y calidad de la fruta debido a infecciones virales puede tener un impacto negativo a gran escala en la economía local y además en la seguridad alimentaria. El avance en el conocimiento y la caracterización de virus como RBDV y RIV-2 permitirá desarrollar estrategias efectivas para su detección, manejo y control, mejorando así la salud de los cultivos y asegurando su sostenibilidad a largo plazo.

Por otro lado, la implementación de un programa a nivel nacional de pruebas de virus en viveros es fundamental para prevenir la propagación de plantas infectadas y proteger los cultivos ya existentes. Esto no solo beneficiará a los productores locales, sino que también puede tener implicaciones positivas para la industria de la mora en otras regiones y países que enfrentan problemas similares.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

- Determinar la prevalencia del Raspberry bushy dwarf virus y el Rose ilarvirus -2 en plantaciones de mora de la Sierra ecuatoriana para la implementación de protocolos de diagnóstico y propagación mediante técnicas de muestreo y test de RT-PCR.



### 1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar el procedimiento adecuado para diagnosticar RBDV y el RIV-2 en mora.
- Comparar la diversidad genética y distribución actual de los virus en plantaciones de mora en diferentes provincias del país.

## 1.4. Marco teórico

### 1.4.1. Detección de virus por RT-PCR

La metodología de RT-PCR de dos pasos se utiliza ampliamente para detectar virus con genomas de ARN. La técnica es un proceso de dos etapas: primero, el ARN viral se transcribe de forma inversa en ADN complementario (cDNA) utilizando una enzima llamada transcriptasa inversa; luego, el cDNA se amplifica millones de veces usando una polimerasa mediante PCR; Este método proporciona además flexibilidad en la selección de primers para la síntesis de DNA y permite el almacenamiento del cDNA sintetizado para análisis futuros (Acharya, 2023).

Se ha demostrado que la detección viral mediante RT-PCR de dos pasos es eficaz en diversos entornos clínicos y de investigación. Por ejemplo, se ha utilizado para detectar virus como el virus del dengue, el hantavirus y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) debido a su capacidad para reconocer genomas virales con alta sensibilidad y especificidad (Acharya, 2023).

En la investigación de virus que afectan de plantas del genero *Rubus*, la RT-PCR de dos pasos ha demostrado ser fundamental para identificar infecciones virales en cultivos de importancia comercial. Estudios recientes han utilizado esta tecnología para detectar y caracterizar nuevos virus en rosas y moras, demostrando su importancia en el manejo y control de enfermedades virales que afectan la producción agrícola (Hassan, 2023).

#### **1.4.2. Análisis bioinformático**

El análisis bioinformático se ha convertido en una herramienta indispensable en la investigación virológica moderna. Este enfoque permite la comparación de secuencias virales obtenidas para identificar variabilidad genética y eventos de recombinación, lo que es crucial para entender la evolución y adaptación de los virus (Hall, 2013). La construcción de árboles filogenéticos es una técnica clave que se utiliza para visualizar las relaciones evolutivas entre diferentes cepas virales. Estas herramientas filogenéticas facilitan la comprensión de la historia evolutiva y la diversificación de los virus, proporcionando información valiosa para el diseño de estrategias de control y prevención (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016).

Además, la utilización de programas como Primer3 y OligoCalc permite el diseño preciso de primers específicos para la detección de virus. Estos programas analizan las secuencias “objetivo” y sugieren primers que maximicen la especificidad y eficiencia de las reacciones de PCR (Untergasser et al., 2012). La confirmación de resultados de secuenciación mediante métodos como Sanger es un paso crítico para validar las secuencias obtenidas por técnicas de secuenciación de alto rendimiento. Esta validación asegura la precisión de las secuencias y permite una mayor confianza en los análisis subsecuentes (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977).

La identificación de patrones y mutaciones específicas en las secuencias virales es usada generalmente para detectar cambios genéticos que puedan afectar la virulencia, transmisión o resistencia a tratamientos antivirales. Estas mutaciones pueden ser rastreadas a lo largo del tiempo y geográficamente, proporcionando una visión detallada de la epidemiología viral (Gardy & Loman, 2018). La creación y análisis de grandes conjuntos de datos de secuencias permiten estudiar la distribución y prevalencia de los virus en diferentes poblaciones y entornos. Este enfoque big data facilita la detección de tendencias y la identificación de brotes emergentes, mejorando las capacidades de respuesta ante epidemias (Bleidorn, 2017).

#### **1.4.3. Secuenciación de alto rendimiento (HTS)**

La secuenciación de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés), también conocida como secuenciación de nueva generación (NGS), permite la secuenciación masiva y paralela de millones de fragmentos de ADN (Metzker, 2010). Esta tecnología se ha convertido en una herramienta esencial para la investigación virológica debido a su capacidad para identificar y caracterizar genomas virales completos, detectar variabilidad genética y descubrir nuevos virus (Adams et al., 2009). Una de las aplicaciones más destacadas de HTS es la comparación de secuencias virales para identificar variabilidad genética y eventos de recombinación. Este análisis es crucial para entender la evolución viral y la dinámica de las poblaciones virales (Greninger, 2018). La identificación de patrones de variabilidad genética ayuda a comprender cómo los virus se adaptan a sus hospedadores y pueden influir en la virulencia y la transmisión (Moya, Holmes, & González-Candelas, 2004).

La confirmación de resultados de secuenciación mediante métodos como Sanger sigue siendo una práctica común para validar los hallazgos de HTS. La secuenciación Sanger, aunque

menos escalable, proporciona una alta precisión y es útil para corroborar variantes específicas detectadas por HTS (Sanger, 1977).

HTS también permite la identificación de patrones y mutaciones específicas en las secuencias virales, lo que es crucial para estudios de resistencia antiviral y adaptación viral (Domingo & Perales, 2019). La creación y análisis de grandes conjuntos de datos de secuencias mediante HTS facilita el estudio de la distribución y prevalencia de los virus en diferentes regiones geográficas y poblaciones hospedadoras (Boonham et al., 2014).

#### **1.4.4. Rose ilarvirus-2**

El Rose ilarvirus 2 (RIV-2) es un virus perteneciente al género Iilarvirus de la familia Bromoviridae, el cual ha sido identificado recientemente en diversas especies de plantas ornamentales, especialmente en rosas (NCBI, 2024). Este virus, como otros ilarvirus, es conocido por su capacidad para infectar una amplia gama de plantas hospedadoras, lo que lo convierte en un patógeno de interés tanto para la agricultura como para la horticultura ornamental (Preprints.org, 2023). Este virus posee un genoma compuesto por tres segmentos de ARN monocatenario, denominados RNA1, RNA2 y RNA3. Cada segmento de ARN codifica diferentes proteínas esenciales para la replicación y movimiento del virus.

El segmento 1 contiene un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica una proteína replicasa (P1) de 1046 aminoácidos con un peso molecular de 117.9 kDa. El segmento 2 presenta dos ORFs: el primero codifica una proteína P2 de 826 aminoácidos (94.7 kDa), y el segundo ORF codifica una proteína 2b de 229 aminoácidos (26 kDa). Estas proteínas están implicadas en la replicación del ARN y el silenciamiento génico (Natsuaki et al., 1991). El segmento 3 también contiene dos ORFs que codifican una proteína de movimiento (MP) de

300 aminoácidos (33.2 kDa) y una proteína de la cápside (CP) de 246 aminoácidos (27.5 kDa), esenciales para el movimiento del virus entre las células huésped y la formación de partículas virales (Ziegler et al., 1992).

Los análisis filogenéticos han demostrado que RIV-2 está estrechamente relacionado con otros ilarvirus, como el *Tomato necrotic streak virus* (TomNSV) y el *Tulare apple mosaic virus* (TAMV). Las secuencias genómicas de RIV-2 muestran una identidad nucleotídica del 37.1% al 81.9% con otros ilarvirus, y las proteínas codificadas presentan una identidad aminoacídica del 16.1% al 89.2% con las proteínas de otros ilarvirus (MDPI, 2022).

#### **1.4.5. Raspberry bushy dwarf virus**

El virus del enanismo arbustivo de la frambuesa (RBDV) es un patógeno bien estudiado que infecta naturalmente a frambuesas, zarzamoras y vides (Martin et al., 2013). En frambuesas rojas, el RBDV ha estado implicado durante mucho tiempo en la enfermedad de la fruta desmenuzable, que se agrava en infecciones mixtas con otros virus transmitidos por áfidos (Martin et al., 2013; Quito-Avila et al., 2014). Este virus es el único miembro del género *Idaeovirus* y se transmite por polen. La infección natural con RBDV ha estado confinada principalmente a especies de *Rubus*, aunque el rango de hospedadores experimentales es más amplio (Jones et al., 1982). La presencia de RBDV en especies de *Rubus* ha sido reportada en Europa, América del Norte, América del Sur, Sudáfrica, Japón y Nueva Zelanda.

El RBDV ha sido encontrado en diferentes plantas silvestres y cultivadas de *Rubus*, incluyendo frambuesas rojas y negras, zarzamoras, híbridos de zarzamora-frambuesa, y varias otras especies de *Rubus* (Chamberlain et al., 2003; Kokko et al., 1996; Martin et al., 2013; Quito-Avila et al., 2013; Wall y Shamoun, 1990).

El genoma del RBDV es de ARN monocatenario bipartito encapsulado en partículas cuasi-isométricas. El ARN1 contiene un gran marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína de 188 kDa con motivos de helicasas y polimerasas de ARN viral (Ziegler et al., 1992). El ARN2 tiene dos ORFs, uno en el extremo 5' que codifica una proteína de movimiento (MP) de 39 kDa y otro en el extremo 3' que codifica una proteína de la cápsida (CP) de 30 kDa (Natsuaki et al., 1991). Partes del genoma han sido secuenciadas para diferentes aislados de RBDV provenientes de diversos países, aunque todavía hay un número limitado de secuencias disponibles en las bases de datos.

## **Capítulo 2**

## **2. Metodología**

### **2.1.1. Muestreos y secuenciación de alto rendimiento.**

Durante los años 2017, 2018 y 2023 fueron recolectadas muestras de hojas de mora provenientes de distintos cultivos comerciales localizados en la provincia de Tungurahua. Las muestras recolectadas pertenecieron a plantas que mostraban síntomas clásicos de infección viral, como lo son el blanqueamiento y corrugamiento foliar, además de presentar frutos atrofiados y un crecimiento sistémico retardado. Las variedades “Castilla”, “colombiana” e INIAP-Andimora.

Se procedió a realizar de cada hoja una extracción de ARN total, siguiendo el protocolo de isopropanol-KAc, a partir de 100 mg de tejido. Además de extrajo ARN bicatenario (dsRNA) a partir de 15 gr de tejido por muestra, siguiendo el protocolo de Morris y Dodds (1979). El producto de la extracción de ácidos nucleicos fue tratado posteriormente con una enzima DNasa, previo al envío para secuenciar mediante HTS siguiendo el sistema de 75 bp de Illumina. En total fueron enviadas a secuenciar 3 muestras de 2017, 5 de 2018, y 8 de 2023.

Posteriormente, en 2024 se realizó un muestreo extensivo en las provincias de Tungurahua y Pichincha, en diferentes granjas dedicadas al cultivo y comercialización de la variedad INIAP-Andimora, por ser actualmente la maás propagada debido a su gran aceptación en el mercado. Se obtuvieron un total de 30 muestras de hojas y frutos de 2 granjas ubicadas en el cantón Huachi, y 8 muestras del invernadero para propagación que tiene INIAP en Tungurahua. En pichincha se Muestrearon principalmente plantas de mora silvestre (8), y de la variedad “colombiana” (30)



### 2.1.2. Diseño de primers

Con propósitos de detección, se diseñaron sets de primers usando el software de Primer3, y se validaron usando la herramienta OligoCalc de IDT (Integrated DNA Technologies). Como base para el diseño se usaron para RBDV la secuencia del segmento RNA 1 proveniente de aislados ecuatorianos del virus, y para RIV-2 se usó como base el segmento RNA 1 del único aislado encontrado a nivel mundial proveniente de Taiwán. Las secuencias base se obtuvieron de la base de datos de GeneBank en NCBI. Se siguieron criterios de temperatura de anillamiento en un rango de 55-57 °C, Presencia de GG o CC en los extremos 3' para los primers Forward, y 5' para los primers Reverse, Tamaño del producto a amplificar entre 300 y 600 bp, tamaño de la secuencia de entre 18 a 22 nucleótidos, 50% de GC, y restringiendo el número de nucleótidos seguidos repetidos a 2.

Los primers obtenidos fueron para RBDV : Forward – 5'-ATGATGCCCTTTGCACTGTG-3'; y Reverse: 3'- GTCTCTCTCAAGGAGACAAGG-5'. Para RIV-2 las secuencias fueron : Forward 5'- CACGTTGAATGTGGACTATTGG-3' y Reverse 3'-CGAACAAUUAUCCGCCGU -5' (Tabla 1).

### 2.1.3. Detección por RT-PCR

Posterior a la extracción de ARN total, se procedió a usar el de retro transcripción in vitro de Promega M-MLV 200 U/ul, siguiendo un ciclo de 25° por 10 minutos, 37 ° por 1 hora y 10° para estabilizar y conservar la reacción al final. El cDNA obtenido en este proceso se uso posteriormente como muestra para usar el protocolo de PCR usando la enzima Taq-Platinum de Invitrogen, con un ciclado de 95° x 10 minutos para desnaturalizar la hebra de cDNA, 40 ciclos de 95 ° por 1 minuto, 55° por 1 minuto para permitir a los primers realizar el anillamiento a la hebra de ADN, y 72° por 1 minuto para extensión. Al final se le dio a cada

PCR un ciclo adicional de extensión de 72° por 10 minutos. El producto de PCR se validó usando electroforesis en gel de agarosa al 2%, por 40 minutos a 95 voltios.

#### **2.1.4. Preparación de muestras para secuenciación Sanger**

El producto de gel de las muestras que resultaron positivas para ambos virus se purificó usando el kit de purificación de ácidos nucleicos PureLink de Invitrogen, la elución final se hizo en 40 ul de agua de grado molecular. Las muestras purificadas fueron enviadas a ser secuenciadas mediante Sanger por duplicados a Macrogen Korea, con 2 ul de primer a 40 mM en cada una. Los resultados se usaron para identificar la variabilidad genética de los aislados encontrados en el estudio.

#### **2.1.5. Análisis de filogenia y recombinación**

La posterior librería y generación de contigs virales producto de HTS se realizó usando los programas Spades v.2023, y Virfind. Los contigs ensamblados fueron sometidos a BLASTn. Todos los contigs que tuvieron una similitud > 95% a genes de planta fueron removidos del análisis. Los contigs restantes fueron sometidos a BLASTx usando la base de datos de proteínas no redundantes (nr). Los contigs con tamaño mayor a 600 nt que tuvieron una similitud de al menos 25% con proteínas virales fueron considerados como "relacionados a virus".

Para el estudio de la diversidad genética de RBDV y RIV-2, las secuencias obtenidas de la secuenciación Sanger en sentido Forward y Reverse por cada muestra fueron alineadas y su consenso fue extraído para el análisis filogenético.

Los alineamientos de múltiples secuencias provenientes de este estudio y de aislados extraídos de GeneBank fueron realizados usando MUSCLE en Geneious 2024. Los

alineamientos exportados en formato Phylip fueron exportados a RDP v 4.1 para someterlos a análisis de eventos recombinación. Un evento fue considerado para el análisis de lograba ser detectado en al menos 4 de los 7 métodos usados en RDP. Los alineamientos sin las secuencias o regiones recombinantes fueron enviadas a SplitsTree4 para generar redes filogenéticas y a MEGA X para realizar arboles filogenéticos.

### **Capítulo 3**

### 3. Resultados y análisis

#### 3.1. Secuencias obtenidas de RIV-2 y RBDV mediante HTS (2018)

Muestras de 2018 generaron aproximadamente 30 millones de lecturas por muestra. Los resultados de VirFind confirmaron la presencia de RBDV en todas las muestras. Además, se encontraron secuencias casi completas del genoma correspondientes a RIV-2 en tres de las cinco muestras.

Las secuencias casi completas del genoma de los aislados ecuatorianos comparten un 99% de identidad nucleotídica entre sí, para RIV-2 y un 89%, 88% y 94% de identidad para los segmentos de ARN 1, 2 y 3, respectivamente, con aislados de EE. UU.

La presencia de los dos virus fue confirmada mediante amplificación por RT-PCR y secuenciación de Sanger del ORF 1a para RBDV y RIV-2, y del gen de la proteína de la cápside (CP) para RIV-2. Para RIV-2 se diseñaron y validaron dos conjuntos de primers.

**Tabla 1.** Primers diseñados para detección de los virus

Virus	Nombre del primer	Secuencia	Tamaño del producto	Gen objetivo
Raspberr y bushy dwarf virus	RBDV_527_F	ATGATGCCCTTTGCACTGTG	673	ORF 1a
	RBDV_527_R	GTCTCTCTCAAGGAGACAAGG-5		
Rose ilarvirus - 2	RIV_2_S1_F1	CACGTTGAATGTGGACTATTGG	404	ORF 1
	RIV_2_S1_R1	CGAACAAUUAUUCGCCGU		
	RIV_2_S3_F2	CCATGTGGGAYAATTGTGCCAC	1281	Full-length CP

### **3.2. Prevalencia y variabilidad genómica de RIV-2**

RIV-2 se encontró en un total de 4 muestras de mora de Tungurahua recolectadas en 2023. Las alineaciones utilizando Muscle v. 5.1 mostraron una similitud > 99% entre ellas y para los 3 segmentos genómicos. Por otro lado, al comparar mediante alineamientos los aislados de Ecuador y Taiwán, se obtuvieron porcentajes de similitud del 84 % para el segmento genómico 1, 81,1 % para el segmento genómico 2 y 80,9 % para el segmento genómico 3.

Las muestras de ARN que dieron positivo en 12 muestras de 2024 provenientes de las 3 localidades de Ambato fueron analizadas mediante secuenciación Sanger utilizando primers CP para RIV-2, con el fin de descubrir más aislados del virus en Ecuador. Se realizaron alineamientos múltiples (MSA) con las secuencias resultantes, obteniendo porcentajes de similitud > 99% (Tabla 2).

### **3.3. Prevalencia de virus a lo largo de los años**

#### **Año de recolección y muestras**

##### **3.3.1. 2017**

En 2017, las muestras recolectadas mostraron predominantemente la presencia de RBDV. La muestra 1 tuvo un total de 16,920,932 lecturas de HTS, con 687,577 lecturas ensambladas en el genoma de RBDV y una cobertura promedio significativa. Otras muestras de este año también mostraron la presencia de RBDV, pero con grados variables de lecturas ensambladas, reflejando diferencias en la carga viral entre las muestras. Por ejemplo, la muestra 2 tuvo 13,414,676 lecturas totales, de las cuales 151,204 se alinearon con RBDV, indicando una infección considerable.

Además, la muestra 3 (16) presentó 13,262,022 lecturas totales, con solo 12,492 lecturas alineadas a RBDV. Estas variaciones sugieren tasas de infección heterogéneas y posiblemente diferentes estados de salud o condiciones ambientales que afectan a las plantas.

### **3.3.2. 2018**

En 2018, la tendencia de prevalencia de RBDV continuó. La muestra 1 tuvo un número considerable de lecturas, con 1,130,709 lecturas alineadas a RBDV y una cobertura promedio de 8,333.65, lo que indica una fuerte presencia de este virus. De manera similar, la muestra 3 mostró una alta carga viral con 1,110,341 lecturas para RBDV y una cobertura promedio de 7,228.78. Además, algunas muestras, como la muestra 5, exhibieron coinfección con otros virus, reflejada en lecturas adicionales para ellos.2023

### **3.3.3. 2023**

Las muestras recolectadas en 2023 mostraron un panorama viral más diverso. La muestra 1 presentó no solo RBDV con 55,721 lecturas, sino también RIV-2 con 54,361 lecturas, cada una con una cobertura promedio sustancial, lo que indica un perfil de infección viral más complejo. La muestra 2 mostró una diversidad similar con la presencia de RBDV y RIV-2, lo que indica múltiples infecciones concurrentes. El alto número de lecturas y la cobertura promedio sustancial en estas muestras sugieren una actividad viral robusta. Notablemente, la muestra 8 tuvo el mayor número total de lecturas (34,369,072), con recuentos significativos de lecturas para RBDV y RIV-2, lo que refleja un escenario de infección severa.

**Tabla 2.** Muestreo en campo de virus en mora

Región	Localidad	No. De muestras	Número de muestras positivas		
			RBDV	SNSV	RIV-2
Tungurahua	Huachi - 1	15	15	11	13
	Huachi - 2	10	10	10	9
	INIAP	6	6	6	5
<b>Total</b>		31	31	27	27
<b>Tasa de detección</b>			100%	87%	87%
Pichincha	IASA	38	25	0	0
<b>Tasa de detección</b>		38	66%	0%	0%

### 3.4. Secuenciación

Los datos de HTS proporcionaron información detallada sobre el contenido viral de las muestras de mora. Cada año, las muestras se analizaron en términos de lecturas totales de HTS, el virus más cercano identificado por BLASTx, el número de lecturas ensambladas en el genoma del virus y la cobertura promedio (Tabla 3).

En 2017, a pesar de la presencia dominante de RBDV, las muestras mostraron una cobertura y recuentos de lecturas variables, lo que indica diferentes intensidades de infección.

Para 2018, la persistencia de RBDV con altos recuentos de lecturas y cobertura fue evidente. La variación en los recuentos de lecturas y la cobertura también indica diferencias en la carga viral entre las muestras, que podrían deberse a factores ambientales o variaciones en la salud de las plantas.

Los datos de 2023 revelan un escenario más complejo, con la presencia de múltiples virus en varias muestras. El alto número de lecturas y la cobertura promedio sustancial para RBDV y RIV-2 indican infecciones graves e incluso múltiples. Esta complejidad podría atribuirse a la



evolución de cepas virales, cambios ambientales o prácticas agrícolas que influyen en la prevalencia y distribución viral.

**Tabla 3.** Resumen de los resultados de identificación de virus por secuenciación de alto rendimiento (HTS). Acrónimos de virus: *raspberry bushy dwarf virus* (RBDV), *rose ilarvirus-2* (RIV-2).

Fecha de colecta	Número de muestra	Lecturas totales de HTS	BLASTx		Número total de lecturas ensambladas en el genoma del virus	Cobertura promedio (X per nt)	Número de acceso		
			Abreviación del virus	Promedio de identidad de aminoácidos			RNA 1	RNA 2	RNA 3
2017	1 (14)	16,920,932	RBDV	98.95	687,577	95.53	PP712112	PP712113	-
	2 (15)	13,414,676	RBDV	98.84	151,204	21.5	-	-	-
	3 (16)	13,262,022	RBDV	98.83	12,492	28.19	-	-	-
2018	1 (10)	-	RBDV	81,56	1,130,709	8333.65	PP693289	PP693290	-
	2 (11)	-	RBDV	-	-	-	-	-	-
	3 (12)	-	RBDV	99,56	1,110,341	7228.78	PP693291	PP693292	-
	4 (13)	-	RBDV	-	-	-	-	-	-
	5 (14)	-	RBDV	99,05	2,270,119	14781.35	PP693293	PP693294	-
2023	1 (field_1)	20,312,388	RBDV	99,40	55,721	542.46	PP555253	PP555254	-
			RIV-2	83,97	54,361	484.10	PP555255	PP555256	PP555257
	2 (field_2)	20,906,574	RBDV	80,15	194,813	1883.59	PP595781	PP595789	-
			RIV-2	-	1,490,938	13280.33	-	-	-
	3 (field_3)	20,820,842	RBDV	80,15	83,572	810.12	PP595782	PP595790	-
			RIV-2	-	212,806	1885.91	-	-	-
	4 (field_15)	20,041,966	RBDV	80,15	83,625	807.92	PP595783	PP595791	-
			RIV-2	-	263,829	2317.81	-	-	-
	5 (inv_1)	23,139,040	RBDV	99,75	729,735	7039.24	PP595784	PP595792	-
	6 (inv_2)	25,377,500	RBDV	79,95	166,131	1637.94	PP595785	PP595793	-
7 (inv_3)	24,451,778	RBDV	99,75	1,152,391	11130.63	PP595786	PP595794	-	
8 (inv_4)	34,369,072	RBDV	89,11	762,744	7449.16	PP595787 PP595788	PP595795 PP595796	-	

# Para fines prácticos, se muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos (aa) que representa el promedio de la polimerasa, la proteína de movimiento y la proteína de la cápside.

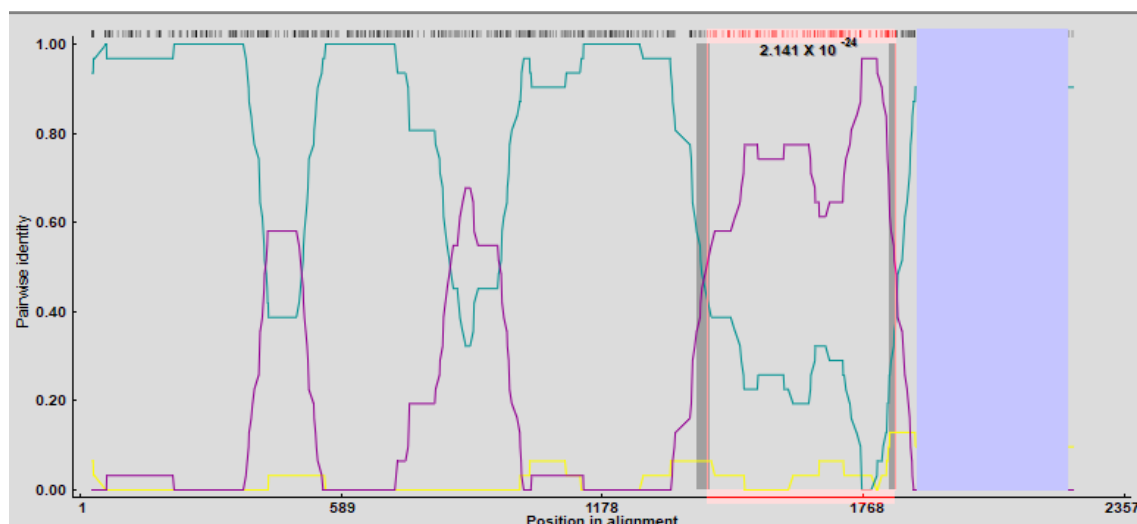
\* Se consideran todos los segmentos genómicos.

& Cuando el porcentaje de identidad entre los aislados fue superior al 99%, solo se envió un aislado a GenBank.

### 3.5. Alineaciones múltiples de secuencias y análisis de detección de recombinación (RBDV)

Se recuperaron secuencias de RBDV de todo el mundo de la base de datos GeneBank. Para el ARN 1, se consideraron aislados de Turquía (2), Reino Unido (2) y Japón (1) para el análisis, y para el ARN 2, aislados de Turquía (2), Kazajistán (8) y Eslovenia (4). En el ARN 2, se detectaron 4 eventos de recombinación en la secuencia EC-PP595795 (Fig. xx), la cual fue eliminada de la alineación para generar un árbol filogenético de máxima verosimilitud de las secuencias de aminoácidos de los CDS de las tres proteínas (MP, CP y RdRp) (Fig. 1).

**Fig. 1.** El gráfico de eventos de recombinación generado por RDP4 mostró 4 eventos, en los que las secuencias EC-PP595793 y EC-PP595792 se identificaron como los padres recombinantes principales y secundarios, respectivamente.



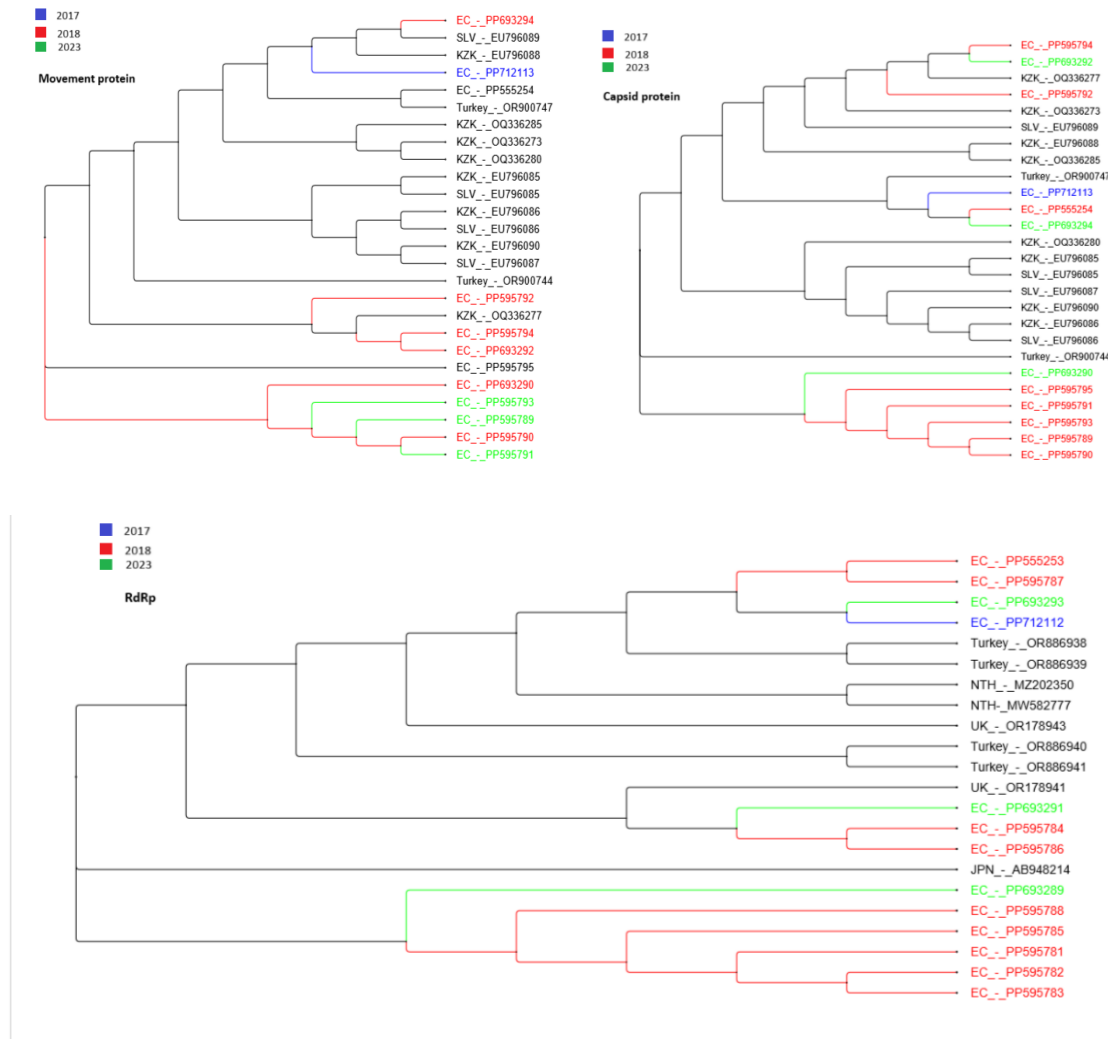
Los árboles filogenéticos ilustran las relaciones genéticas de las secuencias de las proteínas de la cápside, la proteína de movimiento y RdRp de diferentes años (2017, 2018 y 2023) en varias ubicaciones geográficas. Las secuencias etiquetadas como EC (resaltadas en rojo)

están agrupadas, lo que indica una relación genética cercana entre las muestras ecuatorianas. Estas se encuentran claramente separadas de las secuencias de otras regiones como Turquía y Kazajistán (KZK).

Los árboles (Fig. 2) muestran que las muestras ecuatorianas de 2023 (en verde) están más estrechamente relacionadas con las de 2017 (en azul) y 2018 (en rojo), lo que sugiere que ha habido una divergencia genética limitada a lo largo de los años en esta región. Esto podría implicar una población viral estable en Ecuador o la introducción reciente de cepas similares.

En comparación, las muestras de Turquía y Kazajistán muestran una mayor diversidad genética, lo que indica una población viral más variada en esas regiones. Esto podría deberse a presiones ambientales diferentes o a una mayor tasa de evolución viral.

De manera similar, el árbol filogenético de la proteína de movimiento muestra una separación de las muestras por año. Las muestras ecuatorianas de 2023 (EC\_PP959291, EC\_PP959792, etc.) están agrupadas, diferenciándose de las muestras de 2017 y 2018 de otras regiones (por ejemplo, KZK\_EU796088, SLV\_EU796089). Los patrones de agrupación sugieren que las secuencias de la proteína de movimiento han evolucionado, posiblemente debido al aislamiento geográfico y factores temporales.



**Fig. 2.** Árbol de máxima similitud de las secuencias de aminoácidos de (A) la proteína de movimiento, (B) la proteína de la cápside y (C) RdRp del *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV). Los árboles se generaron utilizando el modelo de Jones-Taylor-Thornton con tasas uniformes.

## Capítulo 4

#### 4.1. Conclusiones

- Este estudio ha permitido caracterizar la prevalencia y variabilidad genética de Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) y Rose ilarvirus-2 (RIV-2) en cultivos de mora en Ecuador, mediante el uso de técnicas avanzadas como la secuenciación de alto rendimiento (HTS) y el análisis filogenético. Los resultados obtenidos destacan la presencia continua de RBDV en todas las muestras analizadas, lo que refuerza su estatus como una de las principales amenazas virales para los cultivos de mora en el país. Además, se ha confirmado la presencia de RIV-2, lo que representa el primer reporte de este virus en Ecuador, lo que amplía el conocimiento sobre la diversidad viral que afecta a las moras en esta región.
- Los análisis filogenéticos mostraron una limitada divergencia genética entre las muestras ecuatorianas de diferentes años, lo que sugiere una población viral relativamente estable en el país o la introducción reciente de cepas similares. Este hallazgo es crucial para el desarrollo de estrategias de manejo, ya que sugiere que los virus presentes podrían ser controlados de manera efectiva si se implementan medidas de detección y contención tempranas.
- La identificación de eventos de recombinación en RBDV destaca la capacidad de este virus para evolucionar, lo que podría aumentar su virulencia o afectar su distribución geográfica. Las variaciones genéticas encontradas entre los aislados de Ecuador y otros países como Turquía y Kazajistán también sugieren que factores ambientales o prácticas agrícolas pueden influir en la dinámica viral, lo que requiere un enfoque más amplio para el manejo de estos patógenos.

- Este estudio subraya la importancia de implementar programas nacionales de diagnóstico y control de virus en viveros de mora, con el fin de prevenir la propagación de plantas infectadas y proteger la sostenibilidad del cultivo en Ecuador.

#### **4.2. Recomendaciones**

- Incluir un mayor número de muestras recolectadas de diferentes regiones y años ayudaría a obtener un panorama más amplio sobre la prevalencia y diversidad viral, provenientes de plantaciones de otras provincias de Ecuador. Esto permitiría detectar variaciones geográficas más detalladas y patrones epidemiológicos.
- Extender el periodo de análisis a años anteriores a 2017 y posteriores a 2023 permitiría un mejor entendimiento de la evolución viral, identificando posibles eventos de recombinación o introducción de nuevas cepas con mayor precisión.
- Incluir variables ambientales como la temperatura, humedad y prácticas agrícolas asociadas a las áreas de muestreo permitiría relacionar el impacto de estas condiciones con las tasas de infección y evolución viral.
- Implementar programas de monitoreo a largo plazo para identificar tempranamente la presencia de virus en viveros y plantaciones podría reducir la diseminación de cepas virales. Además, el desarrollo de protocolos de manejo específicos sería beneficioso para los agricultores.
- Realizar estudios de caracterización funcional de las mutaciones detectadas en los virus podría ayudar a comprender cómo afectan la virulencia, transmisión y resistencia a los tratamientos, contribuyendo a estrategias de manejo más efectivas.

### **Bibliografija**

- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537-545.
- Bleidorn, C. (2017). Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and Biodiversity*, 15(2), 101-103.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., &
- Chen, T. C., Lin, Y. C., Lin, C. C., Lin, Y. X., & Chen, Y. K. (2022). Rose Virome Analysis and Identification of a Novel Ilarvirus in Taiwan. *Viruses*, 14(11), 2537.
- Gardy, J. L., & Loman, N. J. (2018). Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nature Reviews Genetics*, 19(1), 9-20.
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229-1235.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A. M. (2009). *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Cambridge University Press.



Martínez, A., Vásquez C., W., Viteri D., P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). Ficha técnica de la variedad de mora sin espinas (*Rubus glaucus* Benth) INIAP ANDIMORA-2013. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4768>

Matus, J. T., Amaya, I., Silva, H., & Argandoña, V. (2008). First report of Raspberry bushy dwarf virus in Chile. *Plant Disease*, 92(12), 1726-1726.

MDPI. (2022). Rose Virome Analysis and Identification of a Novel Iilarvirus in Taiwan.

Moya, A., Holmes, E. C., & González-Candelas, F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2(4), 279-288.

Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20-31

Natsuaki, T., et al. (1991). RNA2 segment encoding the movement and coat proteins of ilarviruses.

Natsuaki, T., Hirano, S., & Sano, Y. (1991). Molecular cloning and sequencing of the coat protein gene of raspberry bushy dwarf virus. *Journal of General Virology*, 72(6), 1435-1443.

Quito-Avila, D., Ibarra, M., Alvarez-Quinto, R., Espinoza, L., Ratti, M., Peralta García, E., & Martin, R. R. (2013). First Report of Raspberry bushy dwarf virus in Andean Blackberry (*Rubus glaucus*) in Central Ecuador. *Plant Disease*, 97, 1003. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1198-PDN>

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.

Viteri D., P., Vásquez C., W., Viera, W., Sotomayor, A., & Mejía, P. (2016). *Ecología para el desarrollo y crecimiento de la mora*. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura, 2016.

<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4051>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115.