



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS
MOLECULARES
(RT-PCR E IC-RT-PCR)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE
INFECCIÓN POR LOS PRINCIPALES
VIRUS QUE ATACAN A LAS UVAS
PISQUERAS DEL PERÚ**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

MARÍA JULIA GONZALES LLONTOP

LIMA – PERÚ

2016

ASESOR DE TESIS

CARLOS MERINO MÉNDEZ, PhD.

DEDICATORIA

A mi mama y A mis papitos,
Julia, Valeriano y Juanita,
Quienes siempre me motivaron
Con su amor y su apoyo incondicional.
Y Sobre todo pensaron
Que la mejor herencia
Es la educación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por haber financiado mis estudios de maestría. A mi asesor Carlos Merino Méndez por las recomendaciones brindadas durante el desarrollo de la tesis. A mi Co-asesor Jorge Tenorio Mora y Marisa Lozano por brindarme sus conocimientos, ideas y recomendaciones respecto a la investigación que fue esencial para el desarrollo de mi tesis. A Hanna Cáceres Yparraguirre y Patricia Quispe miembros del área de Investigación e Innovación del CITEagroindustrial – Ica del ITP por su completa disponibilidad y apoyo en el proceso de colecta de muestras, aquellos días soleados que nunca olvidare. A los diferentes responsables de los viñedos prospectados de las regiones de Ica, Arequipa y Tacna por su apoyo, hospitalidad y por permitirme realizar los muestreos en sus campos de cultivo. A los miembros del jurado evaluador de la presente tesis, por sus valorables comentarios, su comprensión y diligencia para la revisión del manuscrito. A todos mis compañeros de la Unidad Genómica, en especial a Edgar Neyra Valdez por su apoyo y palabras de aliento para continuar la realización de la presente tesis. Y finalmente, un especial agradecimiento a mi familia Llontop Bravo por darme aliento y confianza incondicional que fue una gran motivación para concluir esta etapa.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| I.- INTRODUCCION | 1 |
| II. -PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN | 5 |
| 2.1. -Planteamiento del Problema | 5 |
| 2.2.-Marco Teórico | 7 |
| 2.2.1.-Taxonomía y Origen de Vitis Vinifera | 7 |
| 2.2.2.- Ciclo Biológico de Vitis Vinifera | 13 |
| 2.2.2.1.-Ciclo vital completo:..... | 13 |
| 2.2.2.2.-Ciclo bianual:..... | 13 |
| 2.2.2.3.-Ciclo anual:..... | 13 |
| A.-Lloro: | 14 |
| B.-Desborre y Brotación: | 14 |
| C.-Crecimiento del pámpano: | 14 |
| D.-Floración y cuajado:..... | 15 |
| E.-Envero: | 15 |
| F.-Maduración:..... | 15 |
| G.-Agostamiento:..... | 16 |
| H.-Caída de la Hoja: | 16 |
| I.-Reposo Invernal: | 16 |
| 2.2.3.-Enfermedades Virales en Vides..... | 17 |
| 2.2.3.1.-Familia Closteroviridae | 19 |
| 2.2.3.2.-Familia Betafexiviridae | 22 |
| 2.2.3.3.-familia Secoviridae | 23 |
| 2.2.3.4.-Familia Tymoviridae | 25 |
| 2.2.4.- Diagnóstico de virus en vid | 26 |
| 2.2.4.1.- Ensayos serológicos..... | 26 |
| 2.2.4.2.- Ensayos Moleculares | 27 |
| 2.2.5.- Incidencia y Prevalencia | 28 |
| III. -JUSTIFICACIÓN | 29 |
| IV. -OBJETIVOS..... | 35 |
| 4.1.-Objetivo General..... | 35 |
| 4.2.-Objetivos Específicos: | 35 |

| | |
|---|----|
| V –HIPÓTESIS..... | 35 |
| VI. -MATERIALES Y MÉTODOS..... | 36 |
| 6.1. -Material biológico..... | 36 |
| 6.2.-Detección Serológica..... | 44 |
| 6.3. -Detección Molecular..... | 46 |
| 6.3.1. -RT-PCR | 46 |
| 6.3.1.1.-Extracción de RNA tejido foliar | 46 |
| 6.3.1.2.- Concentración y pureza del ARN | 46 |
| 6.3.1.3.-Síntesis de ADNc..... | 47 |
| 6.3.1.4. -PCR Simple | 47 |
| 6.3.1.5.-PCR Múltiple | 50 |
| 6.3.2. -Inmunocaptura RT-PCR | 51 |
| 6.3.2.1. -Inmunocaptura -RT-PCR Simple (IC-RT-PCR)..... | 51 |
| 6.3.2.1.1. -Sensibilización:..... | 51 |
| 6.3.2.1.2.-Inmunocaptura de la Muestra: | 51 |
| 6.3.2.1.3.-Síntesis de ADNc..... | 52 |
| 6.3.2.1.4.-PCR Simple | 52 |
| 6.3.2.2.-Inmunocaptura -RT-PCR Múltiple (M-IC-RT-PCR) | 52 |
| 6.4.-Sensibilidad y especificidad | 53 |
| VII. –RESULTADOS | 58 |
| 7. 1. -Detección de infección viral por DAS- ELISA | 58 |
| 7. 2. -Estandarización de la RT-PCR Simple y Múltiple | 66 |
| 7.3.-Estandarización de la IC-RT-PCR Simple y Múltiple..... | 72 |
| 7.4.-Sensibilidad y especificidad | 73 |
| VIII. –DISCUSIÓN | 78 |
| IX.-CONCLUSIONES..... | 90 |
| X.- RECOMENDACIONES..... | 91 |
| XI.-BIBLIOGRAFÍA..... | 92 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.- Árbol taxonómico del género *Vitis*.

Figura 02.- Ciclo Anual de la vid.

Figura 03.- Área Cosechada Anual de Vid en el Perú (FAO, 2016)

Figura 04.- Principales zonas productoras de Uva 2014

Figura 05.- Áreas de vid en función a su uso final en las Zonas de Denominación de Origen.

Figura 06.- Distribución Porcentual de las tierras de cultivo de vid de variedades pisqueras en las Zonas de Denominación de Origen.

Figura 07.- Tipo de Muestreo en Cada Viñedo.

Figura 08.- Mapa de la Región Arequipa Geo- Referenciado de los principales Viñedos de Uvas Pisqueras.

Figura 09.- Mapa de la Región Ica Geo- Referenciado de los principales Viñedos de Uvas Pisqueras.

Figura 10.- Mapa de la Región Tacna Geo- Referenciado de los principales Viñedos de Uvas Pisquera.

Figura 11.- Condiciones de Amplificación de PCR para el gen de Proteína de cubierta viral

Figura 12.- Incidencia Viral en la Región Ica

Figura 13.- Incidencia Viral en la Región Arequipa

Figura 14.- Incidencia Viral en la Región Tacna.

Figura 15.- Extracción de ARN total de muestras control Positivo

Figura 16.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del GFkV (179bp).

Figura 17. - Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del GLRaV-2 (543bp) con gradiente de temperatura.

Figura 18.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del GLRaV-2 (543bp).

Figura 19.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la Múltiple RT-PCR.

Figura 20.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de IC- RT-PCR SIMPLE

Figura 21.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de Múltiple IC- RT-PCR.

Figura 22.- Sensibilidad de DAS-ELISA para la detección del virus GLRaV-2.

Figura 23.- Sensibilidad de DAS-ELISA para la detección del virus GFkV.

Figura 24.- Sensibilidad de detección de GFkV y GLRaV-2 usando IC- RT-PCR e RT-PCR.

LISTA DE TABLAS

Tabla 01.- Familia *Closteroviridae*.

Tabla 02.- Virus Asociado con la enfermedad Complejo Rugoso de la Madera

Tabla 03.- Superficie Cultivada de Vid en el Mundo Año 2014.

Tabla 04.- Producción total de vid en el mundo año 2014.

Tabla 05.- Número de muestras colectadas por variedad de uva pisquera.

Tabla 06.- Muestras de hojas de vid recolectadas en 2013 durante las prospecciones realizadas en viñedos de la Región Arequipa- Perú.

Tabla 07.- Muestras de hojas de vid recolectadas en 2013 durante las prospecciones realizadas en viñedos de la Región Ica- Perú.

Tabla 08.- Muestras de hojas de vid recolectadas en 2013 durante las prospecciones realizadas en viñedos de la Región Tacna- Perú.

Tabla 09.- Cebadores para detección de virus de vid.

Tabla 10.- Cebadores Control Interno.

Tabla 11.- Componentes del Master Mix PCR para la detección del virus GLRaV 2.

Tabla 12.- Componentes del Master Mix PCR para la detección del virus GFkV.

Tabla 13.- Concentraciones de los cebadores para la estandarización de la PCR múltiple.

Tabla 14. – Resultados de comparación de Técnicas de Diagnóstico viral.

Tabla 15. – Situación Fitosanitaria viral de las Muestras seleccionadas para evaluar la especificidad de los cebadores del virus GLRaV-2.

Tabla 16. – Situación Fitosanitaria viral de las Muestras seleccionadas para evaluar la especificidad de los cebadores del virus GFkV.

Tabla 17.- Porcentaje de Infección viral Promedio.

Tabla 18.- Porcentaje de Infección Viral Simples o Múltiples.

Tabla 19.- Tipos de Infección Múltiple.

Tabla 20.- Porcentaje de Infección viral en 11 viñedos de la Región Ica.

Tabla 21.- Porcentaje de Infección viral en 7 viñedos de la Región Arequipa.

Tabla 22.- Porcentaje de Infección viral en 10 viñedos de la Región Tacna.

Tabla 23.- Prevalencia Viral.

Tabla 24.- Incidencia Viral en las 3 regiones.

Tabla 25.- Porcentaje promedios de Infección Viral en diferentes variedades de uvas pisqueras de viñedos de las regiones de Ica, Arequipa y Tacna.

Tabla 26.- Diferentes Concentraciones de los Pares de Cebadores.

Tabla 27.- Resultados obtenidos por DAS- ELISA, M-RT-PCR y M-IC-RT-PCR para la detección del virus GFkV.

Tabla 28.- Detección de GFkV en muestras de hoja de campo por M-RT-PCR, M-IC-RT-PCR y DAS-ELISA.

Tabla 29.- Resultados obtenidos por DAS ELISA, M-RT-PCR y M-IC-RT-PCR para la detección del virus GLRaV-2.

Tabla 30.- Detección de GLRaV-2 en muestras de hoja de campo por M-RT-PCR, M- IC-RT-PCR y DAS-ELISA.

RESUMEN

Uno de los productos bandera del Perú que ha alcanzado notoriedad y proyección internacional es el pisco, derivado de las “uvas pisqueras” sembradas en los valles de Ica, Lima, Moquegua, Arequipa y Tacna. Su productividad se ve reducida a causa de enfermedades de origen viral, cuyo control se basa exclusivamente en la prevención. A pesar de la gran importancia económica, no se ha realizado hasta la fecha una evaluación fitosanitaria viral rigurosa de este cultivo. Por tal motivo, el objetivo principal de esta tesis se centró en implementar herramientas moleculares altamente sensibles que sirvan para la identificación de los virus de mayor incidencia y prevalencia en nuestras uvas pisqueras. Así, el trabajo se dividió en dos fases: en un principio se determinó la prevalencia, incidencia y distribución de 7 virus de importancia mundial en las regiones de Ica, Arequipa y Tacna. Para ello se analizaron un total de 1207 plantas, pertenecientes a 28 viñedos, con el fin de determinar la presencia de *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine Leafroll associated Virus type 1, 2, 3* (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y *Arabis mosaic virus* (ArMV). Se tomaron muestras de hojas al azar en cada viñedo para ser evaluadas serológicamente empleando la técnica DAS-ELISA para los 7 virus evaluados. El mayor valor de incidencia total fue de 7.04% para la infección con GFkV, mientras que el resto de los virus no superó la barrera del 3.5%. Con respecto a los valores máximos de prevalencia, éstos fueron de 71,4 % para GLRaV-2 y 67.9 % para GFkV. Los resultados obtenidos muestran la importancia de los virus GLRaV-2 y GFkV dentro de los parámetros de incidencia y prevalencia. Con esta información se seleccionaron los virus más importantes para dar inicio con la

segunda fase: estandarizar técnicas de diagnóstico molecular de detección múltiple por Inmunocaptura (IC) RT-PCR y RT-PCR para la detección paralela de GFkV y GLRaV-2. Para ello se utilizaron cebadores específicos reportados para la amplificación del gen de la proteína de cubierta para GFkV y GLRaV-2 respectivamente. Para confirmar el rendimiento superior de IC-RT-PCR y RT-PCR en la detección de ambos virus, se realizó una comparación con DAS-ELISA con respecto a su sensibilidad y especificidad. Para evaluar la sensibilidad se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-4} de un extracto de planta con infección múltiple. Se determinó que la técnica IC-RT-PCR es 10 000 veces más sensible que DAS-ELISA y 100 veces más sensible que RT-PCR. A diferencia de RT-PCR que solo fue 100 veces más sensible que DAS-ELISA. La especificidad del PCR se confirmó mediante el secuenciamiento de productos gen de la proteína de cubierta del virus GFkV y GLRaV-2. Las secuencias consenso obtenidas confrontadas en el GenBank obtuvieron porcentajes de identidad mayores al 94% y 99% con los diferentes aislados de los genes reportados del virus GFkV y GLRaV-2 respectivamente. Ambas técnicas moleculares: IC-RT-PCR y RT-PCR, son más sensibles que DAS-ELISA.

Palabras Claves: *Vitis Vinifera*, Virus, Incidencia, Prevalencia, Sensibilidad, Especificidad.

ABSTRACT

One of the flagship products of Peru that have achieved international notoriety is “pisco” from the "pisco grapes" planted in the field of Ica, Lima, Moquegua, Arequipa and Tacna. Their productivity is reduced because of viral diseases, whose control is based only on prevention. Despite its great economic importance, grape crops in Peru have not been subject to rigorous phytosanitary evaluation. Because of this, the main objective of this thesis is focused on implementing highly sensitive molecular tools that can serve to identify viruses with great incidence, and prevalence in our “pisco grapes”. Thus, the work was divided into two phases: determinate the prevalence, incidence and distribution of 7 virus of global importance in the regions of Ica, Arequipa and Tacna. For this purpose, a total of 1207 plants belonging to 28 vineyards were analyzed in order to determine the presence of *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine Leafroll associated Virus type 1, 2, 3* (GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) and *Arabis mosaic virus* (ArMV). Leaf samples were taken randomly in each vineyard to be evaluated serologically using the technique DAS-ELISA. The greatest value of total incidence (% of diseased plants) was 7.04% for infection for GFkV, while the rest of the virus did not exceed of 3.5%. With respect to the maximum prevalence values (% vineyards affected) were 71.4% and 67.9% for GLRaV-2 and GFkV respectively. The results showed the importance of GLRaV-2 and GFkV virus within the parameters of incidence and prevalence. With this information, the most important viruses were selected to begin the second phase: standardize molecular diagnostic techniques Immunocapture multiple detection (IC) RT-PCR

and RT-PCR for parallel detection of GFkV and GLRaV-2. For this purpose, we used specific primers reported from a coat protein for GFkV and GLRaV-2 respectively. To confirm the superior performance of IC-RT-PCR and RT-PCR in the detection of both viruses, a comparison with DAS-ELISA was performed with respect to its sensitivity and specificity. To assess the sensitivity serial dilutions were done with a multiple infection. It was determined that the IC-RT-PCR technique is 10,000 times more sensitive than DAS-ELISA and 100 times more sensitive than RT-PCR. Unlike RT-PCR it was only 100 times more sensitive than DAS-ELISA. The specificity of PCR was confirmed by sequencing products from protein gene GFkV and GLRaV-2 virus respectively. The consensus sequences obtained were confronted with the GenBank, and we found high percentages of identity as high as 94% and 99% with the different isolates of the genes reported of the GFkV and GLRaV-2 viruses. Both molecular techniques, IC-RT-PCR and RT-PCR, are more sensitive than DAS-ELISA.

Key Words: *Vitis Vinifera*, Virus, Incidence, Prevalence, Sensitivity, Specificity.

I.- INTRODUCCION

La vid (*Vitis vinífera L.*) es una de las especies más cultivada en el mundo y al mismo tiempo hospedero de numerosos patógeno. Alberga un elevado número de agentes infecciosos entre virus, viroides y fitoplasmas (Martelli, 2014). Las enfermedades virales de plantas causan graves pérdidas económicas en muchos de los principales cultivos, reduciendo su rendimiento y calidad (Byoung-Cheorl *et al.*, 2005). Por todo ello, el conocimiento de estos patógenos y la optimización de las técnicas de diagnóstico han experimentado un considerable incremento en los últimos tiempos (Digiario *et al.*, 2007; Gambino y Gribaudo, 2010).

En relación a los virus de vid se han descrito y agrupado en más de 21 géneros diferentes (Martelli, 2014), siendo sólo algunos de importancia en las distintas regiones del mundo donde es cultivado. Entre los principales virus tenemos: *Grapevine Leafroll associated Virus* (GLRaVs), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB); los cuales se encuentran con frecuencia en los viñedos de todo el mundo (Hewitt *et al.*, 1972; Kim *et al.*, 2004; Sabanadzovic *et al.*, 2000).

En Chile, durante el periodo 2002- 2007, se realizaron prospecciones para 11 virus de vid en los principales viñedos de 11 regiones. Utilizando las técnicas de DAS-ELISA y RT-PCR, se encontró las mayores incidencias para los siguientes virus: GLRaV 2 con 16,05%, GFkV con 14%, GLRaV 3 con 6,41%, GFLV con 6,36% y GLRaV 1 con 4,67 % (Fiore *et al.*, 2008).

En el caso de Perú, se ha reportado la presencia de diferentes virus, como GFkV, GFLV, GLRaVs y ToRSV que atacan variedades de vid pisqueras y no pisqueras

(Fribourg, 2007). Además, durante el periodo 2008 - 2009 se realizó una prospección en la región Ica para determinar la presencia de los siguientes virus: GFkV, GFLV, GLRaV-1 y GLRaV-3 en plantaciones de uvas pisqueras, para ello se utilizó la técnica de DAS-ELISA. Se encontró una alta incidencia del virus GFkV, y se descubrió que las variedades de uvas pisqueras más infectadas son la Quebranta e Italia. (Tenorio *et al.*, 2009). Estos son los únicos antecedentes disponibles acerca de la presencia de virus en vid en el Perú.

Por otro lado, varios autores señalan que la incidencia viral es acentuada debido a la existencia de eficientes métodos de transmisión, entre ellos tenemos la presencia de vectores como son nematodos e insectos. Sin embargo, se conoce que la principal causa de la diseminación a grandes distancias de los virus en vid se debe a la propagación vegetativa y comercialización de variedades y porta injertos infectados (Juárez *et al.*, 1988; Tenorio *et al.*, 2009; Fiore *et al.*, 2105). Según las publicaciones de Walter y Martelli (1996), Pérez *et al.* (2000) y Gambino *et al.* (2014), estos patógenos son capaces de alterar las funciones fisiológicas normales en plantas de vid, derivándose efectos como: reducción de la cantidad y calidad de producción, reducción del ciclo productivo, reducción de la capacidad rizogénica y de prendimiento de los injertos, progresivo decaimiento e incluso muerte de la planta, así como una reducción de la resistencia a factores abióticos y bióticos. Por todo ello, estos virus son responsables de grandes pérdidas económicas en la vid, aun en ausencia de síntomas, como sucede en algunas infecciones latentes (Fiore *et al.*, 2015). Así mismo, Vega *et al.* (2011) indicaron que la infección viral con los virus de enrollamiento afectaría el desarrollo del fruto, en donde habría una maduración incompleta. Por ello, se

viene realizando diversos esfuerzos para combatir las infecciones causadas por virus en diferentes cultivos a nivel mundial, siendo la vid uno de los blancos más estudiados, como cultivo de capital importancia (Panattoni *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta las pérdidas económicas que causan las enfermedades virales en los cultivos de vid para los agricultores, es de suma importancia desarrollar sistemas de diagnóstico efectivos y confiables. A pesar de que la técnica de ELISA y sus variantes se utilizan habitualmente para la detección de virus de plantas, se ha demostrado que carece de sensibilidad para la detección de virus de muy baja concentración. En un intento de superar este problema, la RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) se ha utilizado ampliamente para la detección de virus de plantas (Dovas y Katis, 2003). Ya que el uso de técnicas moleculares tiene una gran utilidad debido a la capacidad de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite amplificar pequeñas cantidades de secuencias genómica específicas, son la técnica de elección para la detección de estos patógenos (Nolasco *et al.*, 2002). Diferentes variantes de RT-PCR incluyendo la inmunocaptura (IC) RT-PCR (con extractos de plantas) (Wetzel *et al.*, 1992; Nolasco *et al.*, 1993) permiten la detección de cantidades diminutas ARN blanco y son usadas actualmente.

El propósito principal de este trabajo de investigación fue desarrollar una estrategia molecular de diagnóstico rápido basada en la PCR, la RT-PCR y la IC-RT-PCR, que pueda ser utilizada para la identificación de los virus más importantes en el Perú. Para dar cumplimiento con el propósito se realizó una prospección viral de incidencia, prevalencia y distribución para 7 virus en cultivos de uvas pisqueras en las regiones de Ica, Arequipa y Tacna, utilizando la técnica

de DAS-ELISA, a fin de determinar cuáles son las infecciones más importantes con la finalidad de plantear una metodología que permitiera identificar a nivel molecular a estos virus.

II. -PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. -Planteamiento del Problema

Considerando la importancia económica que está adquiriendo nuestro producto bandera, el Pisco, y el constante incremento de hectáreas plantadas de variedades pisqueras; es fundamental implementar sistemas de producción de este cultivo de alta calidad agronómica y sanitaria. En ausencia de estos sistemas, se producen serios problemas principalmente fitosanitarios, debido a la forma en que se propagan las vides. Según información de MINCETUR (2004) el cultivo de uvas en las diferentes regiones pisqueras del Perú, utilizan una tecnología tradicional, que se basa en un sistema de propagación de plántones de vid pisquera empírico. El agricultor recurre a material de propagación de viñedos existentes sin criterio técnico o sanitario. En el caso de utilizar una tecnología tecnificada, utilizando material proveniente de los viveros, estos solo pueden acreditar que el material es obtenido de plantas madre vigorosas y aparentemente libres de enfermedades, sobre la base de una inspección visual. En la actualidad, no existen entidades públicas o privadas que tengan sistemas de certificación de plantas o sistemas intermedios que aseguren la ausencia de virus. SENASA que es la entidad nacional con autoridad oficial en sistema agrario, no cuenta con un servicio molecular para el diagnóstico de virus en vid. Por ende las enfermedades causadas por los virus se estarían perpetuando, transfiriéndose de una planta a otra. Ante la imposibilidad de eliminar los virus de una planta infectada, ésta se verá afectada en su productividad por toda su vida útil, afectando negativamente su calidad y provocando mayores susceptibilidades a factores bióticos o abióticos. Como no

existe una barrera que evite su diseminación, su daño es permanente y aumenta progresivamente con el tiempo.

Hasta el momento el único estudio que ha abordado este problema es el realizado por Tenorio *et al.*, (2009), en el cual se evaluó el estado sanitario de las uvas pisqueras en la región de Ica. Dicho estudio encontró la presencia GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, y GFkV, usando el ensayo tradicional de DAS-ELISA. También encontró que 15 de los 19 viñedos encuestados tenían tasas de infección de virus que van desde 3,84% a 76,92%. La incidencia de los virus en un orden decreciente fue: GFkV (13,02%), GLRaV-3 (3,71%), GLRaV-1 (1,46%) y GFLV (0,73%). Por otro lado, en el material de propagación (viveros) la incidencia viral total fue de 5,29%, se encontró GFkV (4,1%), GFLV (0,58%), GLRaV-3 (0,15%) y GLRaV-1 (0,15%). Con esta información se confirma la presencia de virus, pero dicha información es limitada. Ya que no se cuenta con un sistema de diagnóstico molecular preciso que permita una identificación exacta del virus a evaluar; y sobre todo falta determinar cuáles son los virus presentes y cuáles son las zonas más afectadas. Con la información generada podríamos tener un escenario más completo y posteriormente evaluar factores epidemiológicos que permitan definir con mayor precisión los eventuales impactos productivos de estos virus. Para que así, las entidades pertinentes puedan establecer políticas y normas con el fin de contribuir al control de estos patógenos.

2.2.-Marco Teórico

2.2.1.-Taxonomía y Origen de *Vitis Vinifera*

Vitis Vinifera es una de las plantas de cultivo de frutas más antiguas del planeta, comúnmente conocida como la vid, pertenece al género *Vitis*, familia *Vitaceae*. Esta familia está conformada por 17 géneros, los cuales se desarrollaron al final del período Cretácico hace 100 millones de años (Ingrouille *et al.*, 2002). Sólo el género *Vitis* produce frutos comestibles. Este género se divide en dos subgéneros: *Euvitis* y *Muscadinia* (Planchon, 1887), cuya característica común es que son diploides pero se diferencian por su distinta composición cromosómica (Galet, 1967). El Subgénero *Muscadinia*: tiene un genoma de $2n = 40$, es endémica del sudeste de América del Norte y está conformada por 3 especies: *V. munsoniana*, *V. popenoeii*, *V. rotundifolia*. En este subgénero, *V. rotundifolia* tiene valor comercial ya que es resistente a la mayor parte de las enfermedades criptogámicas, por lo que presenta interés para la mejora varietal (Patel y Olmo, 1955). Y el Subgénero *Euvitis*: tiene un genoma de $2n = 38$, se clasifica según su distribución geográfica en 3 grupos: americano, asiático y euroasiático. El grupo americano está compuesto por 20 especies, son muy resistentes a filoxera por lo que han sido utilizadas especialmente en el desarrollo de portainjertos. Entre las especies más importantes tenemos: *V. labrusca*, *V. riparia* y *V. rupestris* (Alleweldt, 1988; Camargo, 2000). El grupo asiático cuenta con más de quince especies de reducida importancia en la viticultura actual, debido a que son susceptibles a filoxera y con muy pocas aptitudes para la producción. A excepción de *V. amurensis* que es resistente a mildiu y al frío, por lo que es incluido en programas de mejoramiento (He y Wang, 1986; Wan *et al.*, 2007). Finalmente

tenemos el grupo euroasiático representado por la *V. vinifera*, como única especie que presenta cualidades para la producción de vino, es sensible a la filoxera y a las enfermedades criptogámicas (Reynier, 2002); por ello se injerta en otras especies resistentes, principalmente americanas.

En la especie *V. vinifera* coexisten la forma cultivada, *V. vinifera sativa* y la forma silvestre, *V. vinifera sylvestris*. Existe cierta controversia a la hora de considerar la forma *sativa* y *sylvestris* como dos especies (sp.) si nos basamos en sus características morfológicas o como dos subespecies (sub.) dentro de una misma especie si consideramos tales diferencias como resultado del proceso de domesticación. (De Andrés *et al.*, 2012).

La vid es una de las más antiguas plantas cultivadas y está estrechamente vinculada al desarrollo cultural de la humanidad. Su domesticación parece ligada al descubrimiento del vino, aunque no está claro qué proceso se produjo primero (Mena, 2013). En este proceso de domesticación, la vid silvestre experimentó cambios dirigidos a asegurar un mayor contenido de azúcar en las uvas para asegurar: mejor fermentación, mayor rendimiento y producción; pero sin duda, el cambio más importante fue el paso de plantas dioicas (formas silvestres) a monoicas hermafroditas (formas cultivadas), debido a que éstas garantizan la polinización y la producción (Moreno, 2011). Aún no está claro si estos cambios ocurrieron en un periodo prolongado de tiempo, mediante cruzamientos sexuales, naturales o artificiales (selección humana), o si por el contrario sucedieron de una forma relativamente rápida, mediante mutaciones, selecciones y propagación vegetativa (reproducción asexual). Lo más probable es que se produjera una combinación de ambos procesos (This *et al.*, 2006).

Se cree que *Vitis vinifera*, se originó en el Oriente Medio durante la era neolítica (6, 000-5, 000 AC) a lo largo de la costa oriental del Mar Negro en la región conocida como Transcaucasia entre el Mar Caspio y el Mar Negro (Mullins *et al.*, 1992). A partir de aquí, el cultivo de la vid fue extendiéndose a otras partes del mundo. En el antiguo Egipto, se hizo mención de la vid relacionada a la elaboración del vino. La vid domesticada llega a Europa y al norte de África, en primer lugar con las rutas comerciales fenicias y griegas. Pero es el Imperio Romano, el cual fue la palanca decisivamente impulsora del cultivo de la vid en Europa, que se extiende y alcanza regiones templadas de Europa, llegando hasta zonas más frías como el norte de Alemania. Esta expansión siguió las principales rutas comerciales del imperio. En la Edad Media (siglo V-XV), la iglesia Católica difundió el cultivo de la vid a nuevas regiones, a través del intercambio de germoplasma durante las cruzadas y con la expansión de su religión. Por otro lado la expansión del Islam al norte de África, España y Oriente Medio también tuvo un papel importante en la difusión de la vid, principalmente en las variedades de uva de mesa (Royer, 1988). En el Renacimiento (siglo XVI), *V. vinifera* llegó a las nuevas regiones colonizadas (países del Nuevo Mundo). Los misioneros la introdujeron en América, por primera vez como semillas, ya que estas eran fáciles de transportar y después mediante esquejes desde sus lugares de origen (Francia, Alemania, España, Italia y Europa oriental). Los esquejes también fueron introducidos en el siglo XIX en Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, y algo más tarde en el norte de África. (Royer, 1988). Después de varios milenios de expansión geográfica, al final del siglo XIX, agentes causantes de enfermedades (hongos, filoxera) procedentes de América llegaron a Europa causando la

destrucción de muchos viñedos, como consecuencia se reduce la diversidad de esta especie, tanto de vides cultivadas como silvestres. Así, la diversidad de *V. vinifera* presente en la actualidad podría ser un pálido reflejo de la que existía antes de la llegada de la filoxera. La viticultura europea se salvó de su extinción por la utilización de algunas especies no viníferas del género *Vitis* nativas de América, que fueron utilizadas como portainjertos y para la producción de híbridos interespecíficos resistentes a enfermedades (Mena, 2013).

En la actualidad, el cultivo de la vid viene sufriendo otra drástica reducción de su diversidad, debido a la globalización del mercado del vino que favorece la expansión de determinadas variedades mundialmente conocidas (Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Merlot, entre otras) y la desaparición de antiguas variedades locales. (This *et al.*, 2006). De este modo, la diversidad de las variedades de vid que encontramos hoy en día, ha estado estrechamente influenciada por el ser humano y su evolución histórica.

El número de variedades de *V. vinifera* registradas en el mundo es de aproximadamente 10 000, distribuida en todos los continentes, para el consumo humano y elaboración de vino (Salazar y Melgarejo, 2005). Para identificar y caracterizar las variedades se utilizan diferentes métodos ampelográficos, análisis de isoenzimas en sarmientos, análisis de microsatélites, así como evaluaciones agronómicas y enológicas complementarias.

Según Chomé *et al* (2003) y Cabello *et al* (2012) las variedades de vid actuales pueden proceder de uno de estos tres orígenes:

- (1) Hibridaciones Naturales: Estas variedades son producto de la multiplicación por germinación espontánea de semillas procedentes de

cruzamientos al azar, seleccionadas por los viticultores a lo largo de cientos de años. A este grupo pertenecen las variedades más antiguas y forman parte la mayoría de las variedades cultivadas.

- (2) Hibridaciones artificiales: Las variedades son producto cruzamientos entre individuos de la misma especie, o de distintas especies, llevadas a cabo por mejoradores. Con hibridaciones intraespecíficas (entre variedades de *V. vinifera*) se han obtenido algunas variedades de vinificación como por ejemplo: Müller-Thurgau (cruce de Riesling x Silvaner) adaptada a climas fríos, o Garnacha Tintorera (cruce entre Petit Bouschet x Garnacha Tinta) realizado para obtener vinos de mucho color. Y también mediante hibridaciones interespecíficas se han obtenido la mayoría de los portainjertos que se emplearon para reconstruir el viñedo filoxerado. Los cruces realizados fueron fundamentalmente entre las especies *V. riparia*, *V. rupestris* y *V. berlandieri*, aunque también participaron otras especies como la *V. labrusca*, *V. aestivalis*, *V. lincecumii*, *V. cordifolia* y *V. monticola*. También se tiene los Híbridos Productores Directos (HPD), que proceden de cruzamientos interespecíficos entre *Vitis vinifera* y otras especies del género *Vitis*, plantas resistentes a filoxera y a enfermedades fúngicas, en especial a mildiu y oídio, que se adaptasen a suelos y climas variados, en especial la resistencia al frío, que su producción fuera alta, y por último, que produjeran vinos tintos de mucho color (Cabello, 2004).
- (3) Mutaciones: se producen a distintos niveles en el genoma de la planta, originando variabilidad intravarietal y por tanto diferentes clones dentro

de una misma variedad. Cuando estas mutaciones originan una característica fenotípica destacada desde el punto de vista agronómico, de modo que se diferencie claramente del original, se pueden considerar nuevas variedades.

La vid es un arbusto trepador con ramas sarmentosas que se fijan a tutores naturales o artificiales mediante órganos opuestos a las hojas, denominados zarcillos. Según Hidalgo (1999) es una planta que pertenece a la agrupación cormofitas (plantas con raíz, tallo y hoja) del tipo espermatofitas (plantas con flores y semillas) y subtipo angiosperma, de la clase de las dicotiledóneas (con dos hojas embrionarias en la base de la plántula), subclase rosidae y orden ramnales (figura 01), característicamente compuesto por plantas leñosas de vida larga. Tienen un largo periodo juvenil de 3 a 5 años, durante el cual no producen frutos. Las yemas que se forman durante un ciclo anual y se abren hasta el siguiente, son las encargadas de la producción (Infoagro, 2011).

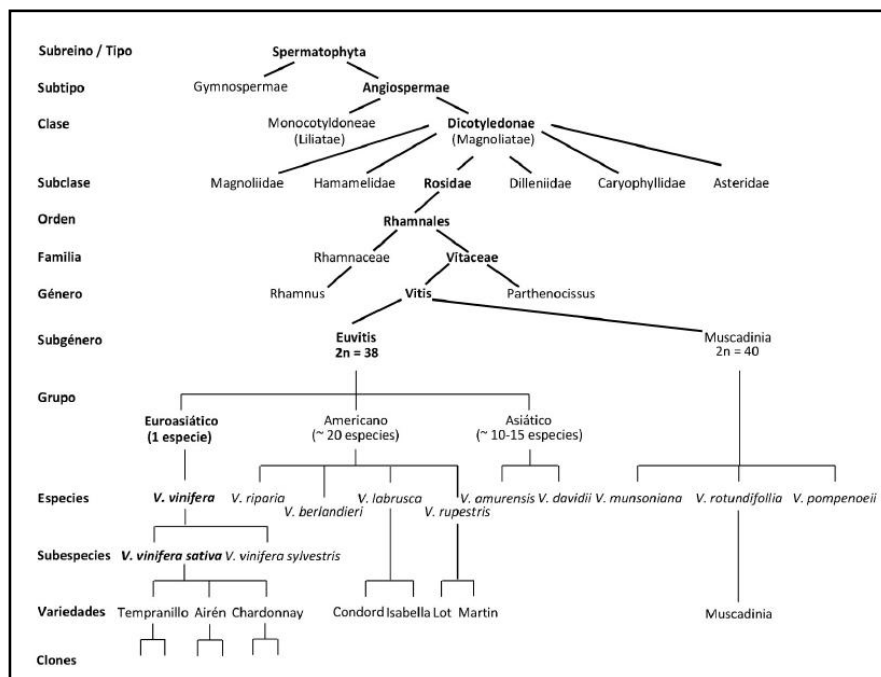


Figura 01 . - Árbol taxonómico del género *Vitis* de Mena, 2013

2.2.2.- Ciclo Biológico de *Vitis Vinifera*

En las plantas de vid cultivadas y obtenidas por multiplicación vegetativa se considera que se desarrolla 3 ciclos en función del periodo de vida: un ciclo vital completo, un ciclo bianual y un ciclo anual (producción) (Pinto *et al.*, 2003).

2.2.2.1.-Ciclo vital completo:

Según Hidalgo (1993) se distinguen 4 periodos fundamentales: (a) Periodo de crecimiento y formación de la planta: se alcanza la forma de conducción adulta, con producciones muy pequeñas su duración aproximada es de 3 años. (b)Periodo de desarrollo y formación de la planta adulta: sus producciones son crecientes en calidad y cantidad. La duración aproximada de este periodo es de 7 a 10 años. (c)Periodo Productivo: Se estabiliza de manera general la producción, duración puede llegar hasta los 40 años pero esto depende de la variedad, lugar, etc. (d) Periodo de envejecimiento y decrepitud.

2.2.2.2.-Ciclo bianual:

En el primer año la vid asegura su perennidad constituyendo y diferenciando su yemas, estas durante el segundo año evolucionan desarrollando los órganos vegetativos y fructíferos (Pinto *et al.*, 2003).

2.2.2.3.-Ciclo anual:

En este ciclo se desarrolla a su vez, un ciclo vegetativo y reproductor ambos ocurren simultáneamente. En el ciclo vegetativo está dado por el crecimiento y desarrollo de los órganos vegetativos. Además ocurre el almacenamiento de sustancias de reserva (agostamiento) y el inicio al reposo o dormición de yemas

(Reynier, 1995). El ciclo reproductivo hace referencia a la formación y desarrollo de los órganos reproductores de la vid (inflorescencia, flores, bayas y semillas) y su maduración (Salazar y Melgarejo, 2005). Brevemente se describirá cada una de las fases, cabe indicar que el inicio de cada ciclo va depender de la variedad de la vid, la temperatura del ambiente y el lugar donde se realiza el crecimiento de la planta (Figura 2).

A.-Lloro: Se inicia finalizando el invierno e iniciando la primavera, se produce un aumento de la temperatura del suelo (aprox. 10°C), la vid finaliza su reposo invernal, experimenta el llamado lloro o derrame de savia a nivel de las heridas de la poda. El motor de arranque de este fenómeno es la activación de la respiración a nivel de las raíces, que provoca el inicio de los fenómenos de absorción de agua y elementos minerales así como la movilización de las reservas (Reynier, 1995).

B.-Desborre y Brotación: Una vez concluidos los lloros y como consecuencia del aumento de la temperatura, se produce a nivel de las yemas latentes (formadas durante el ciclo vegetativo anterior) un estado fenológico denominado desborre. El desborre es consecuencia directa del inicio del mecanismo de crecimiento que se produce por multiplicación de los conos vegetativos (embrión de pámpano) de la yema latente. El primer crecimiento visible desde la brotación corresponde a la extensión de los entrenudos del brote preformado en el año anterior en la yema, que en el caso de la vid pueden ser de 6 a 12 nudos (Palacios *et al.*, 1997).

C.-Crecimiento del pámpano: Una vez iniciada la Brotación se empieza a desarrollar seguidamente todos los órganos que en miniatura se encontraban en los conos vegetativos, además de crear algunos nuevos como: raíces, yemas, nietos, etc. Durante el crecimiento se van a dar determinadas actividades

fisiológicas como absorción de agua y sales, fotosíntesis, respiración, conducción de metabolitos, transpiración, etc. (Palacios *et al.*, 1997)

D.-Floración y cuajado: Durante el crecimiento las hormonas reguladoras de crecimiento, citoquininas sintetizadas en el sistema radicular emigran hasta los ramos en crecimiento favoreciendo la iniciación de las inflorescencias y la diferenciación de los órganos florales. En esta fase ocurre la floración, que corresponde a la expansión de la flor por la apertura de la corola, que se deseca y cae. Una vez caído el capuchón, los estambres se separan del gineceo liberando el polen (polinización). El grano de polen se podrá posar sobre el estigma de la misma flor o en una distinta dependiendo de la variedad. En la superficie del estigma se encuentra un líquido viscoso rico en azúcares, el grano de polen se hincha absorbiendo dicho líquido emitiendo seguidamente un tubo polínico que atraviesa el estigma y el estilo hasta llegar a la cavidad ovárica donde penetra en el ovulo efectuando la fecundación o cuajado (Hidalgo, 1993). Este fruto al principio es una pequeña baya con forma y tamaño de guisante (uvas).

E.-Envero: Es un periodo fisiológico donde la planta finaliza su crecimiento vegetativo y el destino de las sustancias nutritivas sintetizadas y almacenadas se destinan hacia la baya y no a la formación de nuevos tejidos (Reynier, 1995) En el grano de uva se inicia la degradación de pigmentos clorofílicos y el cambio de color, donde los racimos cambian la coloración verde a amarillo y rojo según la variedad. Además se observa un aumento en peso y volumen de la baya.

F.-Maduración: El periodo más importante que determina la calidad de la cosecha. La uva aumenta continuamente de tamaño, debido a la presencia de hormonas promotoras de desarrollo como auxinas, giberelinas, citoquininas

(Palacios *et al.*, 1997). La uva va perdiendo la acidez que tenía hasta ese momento y va acumulando cada vez más azúcares. La cantidad de azúcar determina la cantidad de alcohol que posteriormente tendrá el vino o pisco de esas uvas. Al final de este periodo se produce la Vendimia.

G.-Agostamiento: Este estado se manifiesta por una acumulación de reservas en los tejidos (sobre todo almidón). Paralelamente el pámpano modifica su color y consistencia por la pérdida paulatina de clorofila y enriquecimiento de lignina, de esta manera se convierte en sarmiento y se prepara para resistir el invierno. (Hidalgo, 1993).

H.-Caída de la Hoja: Entre uno y dos meses después de la vendimia. Las condiciones atmosféricas conducen a una menor actividad en la planta, se ralentiza la absorción de nutrientes por parte de las raíces. Las hojas dejan de tener la actividad intensa que tenían en primavera y verano (se tornan de un color marrón o rojizo) y llega un momento en que caen. A partir de aquí comienza el reposo invernal (Reynier, 1995).

I.-Reposo Invernal: Corresponde a la inactividad de la planta debido a las bajas temperaturas, la duración de este periodo varía dependiendo la situación geográfica, clima y variedad de la vid.

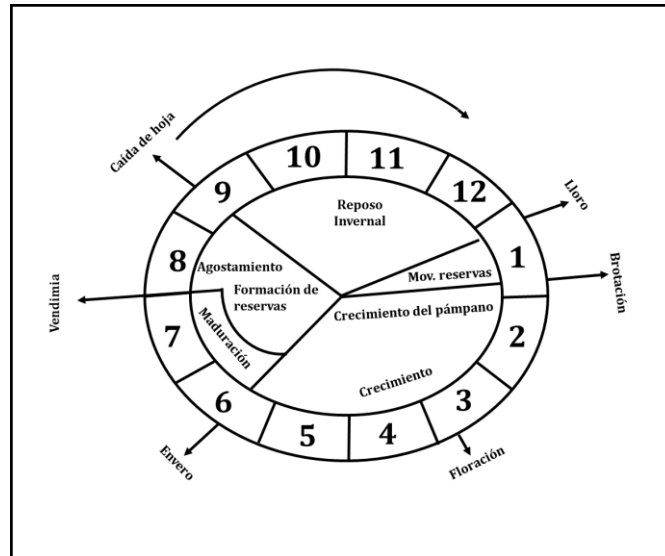


Figura 02. - Ciclo Anual de la vid Modificado de Hidalgo, 2011

2.2.3.-Enfermedades Virales en Vides

A la fecha ha sido posible identificar a más de 60 virus que infectan a la vid (Martelli, 2014), aunque solo algunos virus son importantes por el daño económico que generan, tanto por su intrínseca agresividad como por su amplia diseminación en los viñedos (Fiore *et al.*, 2015). Muchos de estos virus, por lo general en combinaciones, son responsables de enfermedades graves con efectos perjudiciales sobre las vides. El enrollamiento de la hoja, la madera rugosa, y la degeneración infecciosa, son los tres principales trastornos de la vid, inducidos por especies de virus que pertenecen a las familias *closteroviridae*, *betafexiviridae*, *secoviridae*, *tymoviridae*.

En plantas en producción con síntomas visibles, infectadas por los GLRaVs y virus involucrados con el complejo de la “Madera rugosa”, se ha observado pérdida de rendimiento de la fruta (Guidoni *et al.*, 2000; Mannini y Credi, 2000;

Simón *et al.*, 2003; Kovacs *et al.*, 2000; Kovacs *et al.*, 2001; Tomazic *et al.*, 2000; Tomazic *et al.*, 2005; Komar *et al.*, 2007). Con GLRaV se produce una reducción de la calidad de la fruta como resultado de cambios en la acidez, contenido de azúcar, contenido de antocianinas, cambios en el aroma, reducción de terpenoides, etc (Guidoni *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Komar *et al.*, 2007; Kovacs *et al.*, 2000). Algunas cepas de GLRaV-2 se asocian con incompatibilidades de injerto (Uyemoto y Rowhani, 2003). Los virus hoja abanicada de la vid (GFLV) y virus del mosaico de Arabis (ArMV) son asociados con una pérdida significativa de rendimiento, calidad de la fruta y el vigor de la vid (Martelli ,1993; Walter y Martelli, 1996; Golino *et al.*, 2003).

Curiosamente algunos estudios sugieren que puede haber beneficios de la infección por algunos virus de la vid. Por ejemplo en la variedad "Crimson Seedless" inoculadas con una mezcla de GLRaV-3, -5 y -9 y GVA se aumenta el peso de las bayas y se obtiene el color de la baya deseable (que era menos intenso) en comparación con vides no infectadas (Brar *et al.*, 2008). Por otro lado es difícil poder definir el nivel de daño causado GFkV, debido a su estado latente, aunque es un virus muy frecuente en todas las áreas de producción de la vid. Sin embargo, se ha podido demostrar que causa una disminución del porcentaje de éxito de los injertos, limita la producción de raíces y reduce el vigor de las plantas. (Fiore *et al.*, 2015). Todos los virus de la vid se pueden transmitir a través de material de siembra. Algunos virus son también transmitidos vectores: insectos, cochinillas, los nematodos y los pulgones.

2.2.3.1.-Familia *Closteroviridae*

La familia *Closteroviridae* está asociada con la enfermedad de enrollamiento de la hoja de la vid (GLRD). Estos virus son probablemente los más extendidos ya que se encuentran en la mayoría de las zonas vitivinícolas del mundo (Martelli y Boudon-Padieu, 2006). Los síntomas de la enfermedad se desarrollan a finales de verano y otoño e incluyen enrojecimiento o amarillamiento de las hojas en cultivos de uva roja o blanca respectivamente. Estos virus afectan la calidad del fruto, se ha observado a menudo que la fruta sufre un retraso en lo que respecta a su maduración. La infección reduce el vigor y el rendimiento de las vides en un 15-20% en promedio (Martelli y Boudon-Padieu, 2006). Sin embargo, es difícil evaluar el impacto económico real de la enfermedad del enrollado de la vid (GLRD). La sintomatología de los GLRaV varía según el cultivar y la presencia de otros virus implicados (Krake, 1993). Por ejemplo, la especie *Vitis americana*, que se utiliza principalmente como patrón, no muestra síntomas de la enfermedad, a excepción de una disminución en el vigor (Martelli y Boudon-Padieu, 2006). Todos los miembros de la familia *closteroviridae*, se han reportado como relacionados a GLRD compuesta por los géneros *ampelovirus*, *closterovirus* y en nuevo género propuesto *velarivirus* (Tabla 01). Los virus asociados con el enrollamiento de la hoja de la vid, han sido designados con GLRaVs seguido de un número para su identificación a nivel de especie. Actualmente, hay cinco GLRaVs reconocidos, la mayoría de los cuales pertenecen al género *ampelovirus* como son los virus GLRaV-1, -3 y -4. En el género *closterovirus* solo tenemos al virus GLRaV-2. GLRaV-7 es un miembro de del género recientemente propuesto *velarivirus* (Al Rwahnih *et al.*, 2012).

Los virus del género *ampelovirus* son viriones en forma de barra, con una longitud que va desde los 1,250-2,200 nm y poseen un ARN de cadena simple con sentido positivo de un tamaño de 13,7-19,3 kb (Maliogka *et al.*, 2008a; Martelli *et al.*, 2002). Estos Virus están subdivididos filogenéticamente en: subgrupo I que incluye GLRaV-1 y -3 y subgrupo II que conformado por GLRaV-4 y cepas relacionadas (antiguo GLRaV-5, -6, -9, -Pr, -De y -Car (Martelli *et al.*, 2012.)

GLRaV-1, -3, y la mayoría de las cepas de GLRaV-2 son fuertes inductores de síntomas de enrollamiento de la hoja de la vid. Sin embargo, GLRaV-3 es el más frecuente agente etiológico de GLRD (Maree *et al.*, 2013). GLRaV -4 en general provoca sintomatología leve, mientras que las infecciones con GLRaV-7 no induce síntomas y si lo hubiera estas también son muy leves (Al Rawahneh *et al.*, 2012; Martelli *et al.*, 2012). Algunas cepas de GLRaV-2 (por ejemplo: GLRaV 2-RG) están implicadas en graves casos de incompatibilidad de injerto en ciertos patrones (Greif *et al.*, 1995). A pesar de que todos los GLRaVs se encuentran en diferentes regiones del mundo, GLRaV-3 es el más ampliamente distribuido (Charles *et al.*, 2006; Maree *et al.*, 2013).

Los GLRaVs, como todos los virus que infectan la vid, se transmiten a través de la propagación vegetativa y por injerto. Además de este modo de la dispersión, ensayos de transmisión en un laboratorio y estudios de campo mostraron que varias cochinillas (piojos harinosos) e insectos son vectores eficaces de estos agentes. En detalle cochinillas de los géneros: *Heliococcus*, *Phenacoccus*, *Planococcus* y *Pseudococcus* ; e insectos de los géneros: *Pulvinaria*, *Neopulvinaria*, *Parthenolecanium*, *Coccus*, *Saissetia*, *Parasaissetia*, y

Ceroplastes transmiten uno o más de los virus del género *ampelovirus* asociado al enrollamiento de hoja (Martelli y Boudon-Padieu, 2006) .

Tabla 01.- Familia *Closteroviridae* Modificado de Maliogka, 2015.^a Esta especie incluye variantes formalmente conocidos como GLRaV-5, -6, -9, -Pr, -De Y -Car (Espera aprobación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV); Martelli *et al.*, 2012).^b Género propuesto en la familia *Closteroviridae* (Al Rwahnih *et al.*, 2012).

| Género | Especies de Virus | Distribución Geografica | Vector | |
|---------------------------------|-------------------|---|--|------------------------|
| <i>Ampelovirus</i> | Subgrupo I | GLRaV-1 | Mundial | Cochinillas e Insectos |
| | | GLRaV-3 | Mundial | Cochinillas e insectos |
| | Subgrupo 2 | GLRaV-4 ^a | Europa, Oriente Medio, América del Norte y América del Sur | Cochinillas |
| <i>Closterovirus</i> | GLRaV-2 | Mundial | No conocido | |
| <i>Velarivirus</i> ^b | GLRaV-7 | Europa, Oriente Medio, América del Norte, América del Sur y China | No conocido | |

2.2.3.2.-Familia Betafexiviridae

En esta familia se encuentran los géneros *vitivirus*, *foveavirus*. Los viriones tienen forma de bastoncillos de 723-785 nm de tamaño y contienen un ARN de cadena simple con sentido positivo de 7.4 a 8.7 kb (Nolasco *et al.*, 2000; Martelli *et al.*, 2007). En el género *vitivirus* encontramos especies como Virus A (GVA), Virus B (GVB), Virus D (GVD) y Virus E (GVE). Con respecto al género de *foveavirus* solo encontramos al virus RSPaV. Los virus GVA, GVB, GVD y RSPaV están asociados a la enfermedad del complejo de madera rugosa, que causa disminución del vigor de las plantas, decaimiento generalizado y atraso en la brotación. A nivel del punto de injerto, en la madera bajo la corteza, tanto en la variedad como en el portainjerto, pueden aparecer los síntomas más específicos de esta enfermedad que consisten en acanaladuras de profundidad variable, a las cuales corresponden protuberancias en la zona del cambio (Fiore *et al.*, 2015). Los virus relacionados con el complejo de la madera rugosa, se transmiten a través de la propagación vegetativa y por injerto. Sin embargo, la transmisión vectorial juega también un papel importante en la epidemiología de algunas de estas especies de virus. De manera similar a los GLRaVs, los vectores de GVA, GVB, y GVE son cochinillas e insectos de escamas suaves. Más específicamente, las cochinillas de los géneros *Heliococcus*, *Planococcus*, *Pseudococcus*, y *Phenacoccus* e insectos del género *Parthenolecanium* y *Neopulvinaria* pueden transmitir GVA (Le Maguet *et al.*, 2012; Martelli y Boudon-Padieu, 2006), mientras que GVB se transmite por vectores como *Planococcus*, *Pseudococcus*, *Phenacoccus* (Le Maguet *et al.*, 2012; Martelli y Boudon-Padieu, 2006). Aislamientos de GVE se han transmitido por el piojo harinoso (Nakaune *et al.*,

2008). Los estudios realizados por varios investigadores demostraron que la transmisión GVA a menudo ocurre simultáneamente con GLRaV-1 y GLRaV-3 (Engelbrecht y Kasdorf, 1990; Fortusini *et al.*, 1997; Hommay *et al.*, 2008). Finalmente, GRSPaV no tiene vector conocido pero se ha detectado en el polen y en las semillas de las vides infectadas, así como en plántulas jóvenes (Lima *et al.*, 2006). (Tabla 02)

Tabla 02. - Virus Asociados con la enfermedad Complejo Rugoso de la Madera Modificado de Maliogka, 2015

| Género | Especies de Virus | Distribución Geografica | Vector |
|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>Vitivirus</i> | GVA | Mundial | Cochinillas e Insectos |
| | GVB | Mundial | Cochinillas |
| | GVD | Mundial | No conocido |
| <i>Foveavirus</i> | GRSPaV | Mundial | No conocido |

2.2.3.3.-familia Secoviridae

Encontramos a los siguientes virus:

El virus GFLV, pertenece al género *nepovirus*. Sus partículas virales son isodiamétricas, con 30 nanómetros de diámetro. Se caracteriza por tener 3 tipos de síntomas: “síndrome de malformación infecciosa”, “síndrome del mosaico amarillo” y “síndrome de claramiento de venas”. El primero induce deformaciones en las hojas: las venas centrales de las hojas tienden a juntarse dando la típica apariencia de abanico, los sarmientos se presentan ramificados, cortos y se desarrollan en forma de zigzag. En el “síndrome del mosaico

amarillo”, las hojas adquieren una decoloración amarillo brillante. El “síndrome de claramiento de venas” se caracteriza por presentar pequeñas manchas amarillas a lo largo de la vena principal de hojas maduras que finalmente se dispersan en todo el área intervenal (Guido, 2014). En la actualidad, este virus está distribuido a través de todo el mundo donde se cultivan la vid (Martelli, 1993). Es uno de los principales causantes de la reducción del vigor de la planta y afecta la producción en calidad y volumen. El virus se transmite fácilmente por inoculación mecánica a huéspedes herbáceos pero no a través de semillas de vid. Es transmitido por el estilete del nematodo del género *Xiphinema*, tales como *X. index* y *X. italiae*. La disminución de producción en caso de esta infección, puede variar desde 5 a 10 % hasta llegar al 90% o más (Walter y Martelli, 1996)

El virus ToRSV, también forma parte del género *nepovirus*, Es un virus altamente versátil puesto que tiene un amplio rango de huéspedes entre plantas herbáceas y leñosas, se transmite por medio de la semilla en un gran número de malezas y se disemina de planta a planta a través de nematodos vectores (Martelli, 1993). Sus síntomas varían según las condiciones ambientales. En climas fríos sus síntomas son más acentuados y se observa una disminución del vigor, del crecimiento, deformación de hojas y sarmientos y baja productividad. En climas templados afecta el rendimiento pero no el vigor, y las hojas pueden mostrar bandas amarillas a lo largo de las venas. Este virus es responsable de la virosis llamada “enfermedad del amarillamiento de las nervaduras”, también conocida como la “enfermedad del decaimiento moteado del tomate”. El nematodo de la especie *Xiphinema americanum* es su principal vector.

El virus ArMV, pertenece al género *nepovirus*, este virus tiene un amplio rango de huéspedes incluyendo un número importante de cultivos y malezas (Guido, 2014). Ha sido encontrado a nivel mundial, se ha reportado que en condiciones extremas, puede causar pérdidas superiores al 50% en rendimiento a causa de disminuciones en el crecimiento de las plantas y alteraciones en el follaje (Martelli, 2014). Los síntomas más comunes incluyen moteado y punteado de la lámina de las hojas, junto a deformaciones y aclaramiento de venas secundarias. A veces se han encontrado que las infecciones son latentes y la planta no muestra mayores síntomas. Sin embargo, estos pueden variar significativamente entre variedades, portainjertos y por condiciones ambientales (Guido, 2014).

2.2.3.4.-Familia Tymoviridae

El Virus GFkV pertenece al género *maculavirus*, es un virus latente en *Vitis vinífera*, manifestándose sus síntomas solo en *Vitis rupestris*, con esclarecimientos de las nervaduras secundarias, deformaciones de las hojas y reducción del crecimiento vegetativo. Sus alteraciones cromáticas son más evidentes en primavera. A pesar de ser un virus presente en todas las áreas donde se cultiva la vid, es difícil poder estimar los daños producidos por esta virosis, debido a su estado de latencia. Sin embargo hay indicios que estaría involucrado en la disminución del porcentaje de prendimiento de los injertos en *V. rupestris* y otros de sus híbridos, limitando la capacidad de producir raíces y reduciendo el vigor vegetativo de las plantas (Credi y Babini, 1996). Se ha evidenciado la transmisión natural en campo, pero sin poder identificar el vector responsable (Engelbrecht y Kasdorf, 1985).

2.2.4.- Diagnóstico de virus en vid

La aplicación de métodos adecuados y fiables para la detección de virus en vid es un paso importante para su control eficiente. Tales métodos se utilizan tanto para controlar el estado sanitario de las vides en el campo (Constable *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2014) y como para los regímenes de certificación en algunas partes del mundo (Rowhani *et al.*, 2005). En estos programas, la detección se aplica sobre el material inicial de la planta seleccionada para verificar que se cumple con los requisitos sanitarios. También durante los procedimientos de eliminación de virus, la detección se utiliza para evaluar el estado de salud del material tratado. Actualmente la detección de los virus mencionados se basa principalmente en el uso de técnicas serológicas (inmunoensayo) y basadas en la búsqueda de regiones específicas del genoma de estos patógenos (RT-PCR, IC-RTPCR, Hibridación molecular, PCR en tiempo real). La sensibilidad de cada una de ellas es diferente, siendo el PCR en tiempo real la que posee mayor sensibilidad (Osman *et al.*, 2007). Lamentablemente, el alto costo de esta técnica es una limitante importante para su uso.

2.2.4.1.- Ensayos serológicos

Los métodos serológicos, que se basan en el reconocimiento específico de virus por anticuerpos homólogos, se utilizan habitualmente para una detección rápida del material vegetal infectado. De estos, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es el que más se aplica, se ha desarrollado y aplicado con éxito para la mayoría de los virus de vid conocidos. Hoy en día, los kits ELISA comerciales de diferentes empresas están disponibles, se pueden utilizar diferentes

partes de la planta tales como hojas, brotes, tallos, raíces como fuente de antígenos. Pero, se debe tener en cuenta que los virus no se distribuyen uniformemente en una planta infectada, ya que hay una fluctuación estacional de su carga viral (Constable *et al.*, 2012.; Tsai *et al.*, 2012). Este factor podría afectar la fiabilidad del ensayo, por ende es crucial determinar qué tipo de muestra se debe coleccionar de la planta y en qué momento del año.

2.2.4.2.- Ensayos Moleculares

Los métodos moleculares se basan en la detección de los ácidos nucleicos de los virus. Son ampliamente utilizados en el diagnóstico, debido a una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas serológicas. La reacción en cadena de la Polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es probablemente el método más utilizado de ensayo molecular para la detección de virus de la vid. El método es rápido y muy sensible, por lo que elude los problemas de baja concentración de virus. La vid, como la mayoría de las especies leñosas, contiene altas cantidades de polisacáridos y compuestos poli fenólicos que inhiben las enzimas utilizadas para el ensayo (Nassuth *et al.*, 2000). A fin de minimizar el impacto de estas sustancias, diferentes enfoques se han desarrollado en relación a la extracción de ARN total: entre ellos inmunocaptura RT-PCR (Koolivand *et al.*, 2014). El procedimiento de IC-RT-PCR fue desarrollado inicialmente para la detección de virus de ARN con el fin de simplificar el paso de la extracción del material genético de la muestra y reducir el riesgo de contaminación (Jansen *et al.*, 1990). Adicionalmente, esta técnica evita el uso de reactivos tóxicos (cloroformo, mercaptoetanol), elimina sustancias inhibitorias presentes en la vid como son los polifenoles y polisacáridos y no es tan costosa.

2.2.5.- Incidencia y Prevalencia

Es necesario realizar una vigilancia fitosanitaria con respecto a los cultivos de interés nacional, estas observaciones sistemáticas, de un producto o área, a fin de detectar la presencia o ausencia de patógenos o el comportamiento de éstas, dentro de un espacio geográfico y en un tiempo determinado. Es importante conocer la intensidad de la incidencia de una enfermedad o de la infestación de la plaga en la zona circunscrita. La incidencia se define como el porcentaje de plantas infectadas por la enfermedad o plaga, determinado por la superficie unitaria de muestreo en el campo. Con respecto a la prevalencia está relacionado al porcentaje de viñedos infectados respecto al total de viñedos totales.

III. –JUSTIFICACIÓN

La vid puede ser cultivada en diferentes regiones desde las de clima tropical hasta las de climas templados, en los seis continentes del mundo (Burger et al., 2009). Se compone de más de 10 000 variedades, sin embargo solo una fracción de ellas tienen importancia económica. Por ello es considerada uno de los principales cultivos frutales en el mundo según la cantidad de hectáreas cultivadas y el valor económico que representa. Además las uvas se utilizan no sólo para el vino, sino también como fruta fresca, frutos secos, y para la producción de jugo. (Wine & Spirits Education Trust, 2012). En el 2014 se cultivó en todo el mundo aproximadamente 7, 5 millones de hectáreas. Sobre esta base, el 54% de las uvas se cultivan en Europa, 24 % en Asia, 14 % en América, 5 % en África, y el 3% en Oceanía, alcanzando una producción mundial de uva de 73, 6 millones de toneladas. Con una estimación del 5% de pérdidas, solo se pudo disponer de 69, 9 millones de toneladas para los diferentes usos de la vid. La distribución según su utilidad fue: 39,9 millones de toneladas para la producción de vino, 24,8 millones de toneladas como uva de mesa y 5,2 millones de toneladas como frutos secos (pasas). Con respecto a la superficie cultivada de vid, los países con mayores áreas son: España, China y Francia (Tabla 03). Siendo China el primer productor de vid con 11,1 millones de toneladas (Tabla 04) mientras que Francia fue considerado el productor de vino más grande con 46,7 millones de hectolitros en el 2014 (OIV, 2015).

Tabla 03. - Superficie cultivada de vid en el mundo año 2014 (OIV, 2015)

| País | Superficie Cultivada (Miles de ha) |
|--------------------------|---|
| España | 1038 |
| China | 799 |
| Francia | 792 |
| Italia | 690 |
| Turquia | 502 |
| USA | 425 |
| Argentina | 228 |
| Portugal | 224 |
| Chile | 211 |
| Rumania | 192 |
| Australia | 154 |
| Sur Africa | 132 |
| Grecia | 110 |
| Alemania | 102 |
| Brasil | 89 |
| Otros paises | 1885 |
| Total Mundial | 7573 |

Tabla 04. - Producción total de vid en el mundo año 2014 (OIV, 2015)

| | |
|--------------------------|-------------|
| China | 11.1 |
| USA | 7.04 |
| Francia | 6.94 |
| Italia | 6.89 |
| España | 6.23 |
| Turquia | 4.17 |
| Chile | 2.79 |
| Argentina | 2.68 |
| India | 2.6 |
| Iran | 2.17 |
| Otros paises | 20.99 |
| Total Mundial | 73.6 |

Con respecto al Perú, en los últimos años, el cultivo de la vid se ha convertido en una de las actividades más productivas y generadoras de fuentes de divisas para el país, Además, contribuye al incremento de mayores fuentes de trabajo en el sector agrario (MINAGRI; 2012). La principal ventaja es que este fruto se produce durante todo el año, permitiendo abastecer la demanda de este cultivo a nivel mundial en el periodo de baja producción por parte de los principales países importadores y consumidores de uva, en particular durante el periodo diciembre-marzo, época en la que los principales mercados mundiales carecen de este producto (Agrobanco, 2008).

La producción de uva en el mercado nacional registra un importante crecimiento, según los últimos datos reportados, en el 2014 la superficie total de área cosechada a nivel nacional alcanzo la 23 588 hectáreas (Figura 03), teniendo un rendimiento promedio de 21, 5 T/ha y con una producción de 507 097 toneladas de uva. Siendo los principales productores las regiones de Ica (189 921 T), Piura (147 263T), Lima (70 026 T) y La Libertad (41 321) (MINAGRI, 2014). (Figura 04),

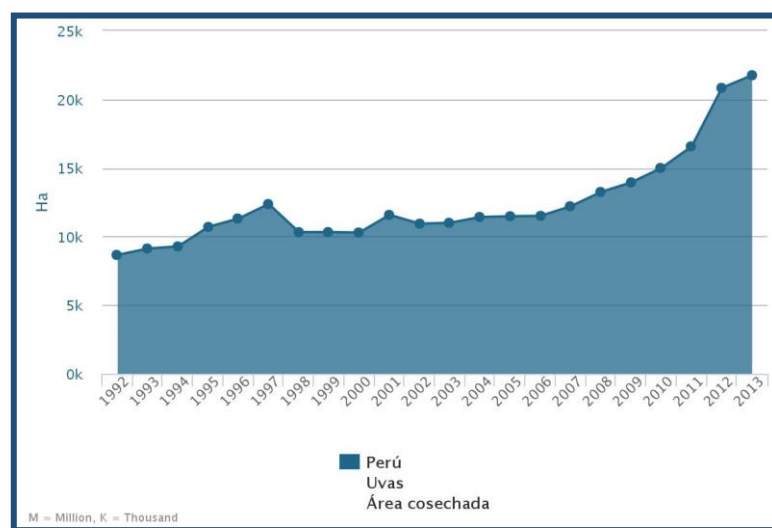


Figura 03. - Área Cosechada Anual de Vid en el Perú (FAO, 2016)



| ICA | | PIURA | |
|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| Producción (t) | 189921 | Producción (t) | 147263 |
| Porcentaje % | 37.45 | Porcentaje % | 29.04 |
| Superficie cosechada(ha) | 9017 | Superficie cosechada(ha) | 4993 |
| Rendimiento (t/ha) | 21.1 | Rendimiento (t/ha) | 29.5 |

| LIMA | | LA LIBERTAD | |
|--------------------------|-------|--------------------------|-------|
| Producción (t) | 70026 | Producción (t) | 41321 |
| Porcentaje % | 13.81 | Porcentaje % | 8.15 |
| Superficie cosechada(ha) | 3902 | Superficie cosechada(ha) | 1989 |
| Rendimiento (t/ha) | 17.9 | Rendimiento (t/ha) | 20.8 |

| RESTO DEL PAÍS | |
|--------------------------|-------|
| Producción (t) | 58566 |
| Porcentaje % | 11.55 |
| Superficie cosechada(ha) | 3687 |
| Rendimiento (t/ha) | - |

Figura 04. - Principales zonas productoras de Uva 2014 Modificado de MINAGRI, 2014

Por otro lado, a partir del siglo XVII se empezó a producir un destilado al que se denominó Pisco. Según la denominación de origen peruana, solo pueden ser denominados pisco aquellos productos obtenidos exclusivamente por la destilación de mostos frescos de uvas de variedades pisqueras: Albilla, Italia, Moscatel, Torontel, Mollar, Negra Criolla, Quebranta y Uvina, proveniente de la zona de los departamentos de Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna (CITEVID, 2004). La distribución de las áreas del cultivo de vid en función al destino final en estas zonas se ha priorizado hacia la producción del Pisco, con un 49% de la producción, siendo Ica el principal productor de uvas pisqueras con un 43%, MINAGRI-2008 (Figura 05 y 06).

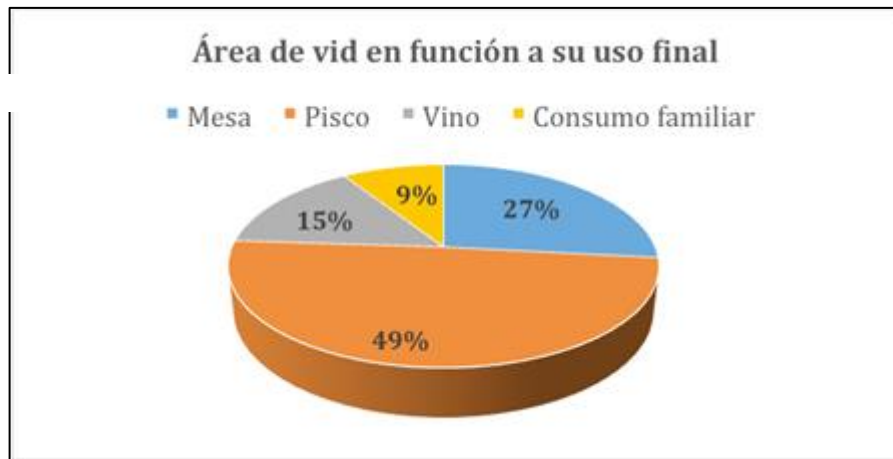


Figura 05.- Áreas de vid en función a su uso final en las Zonas de Denominación de Origen Modificado de MINAGRI, 2008

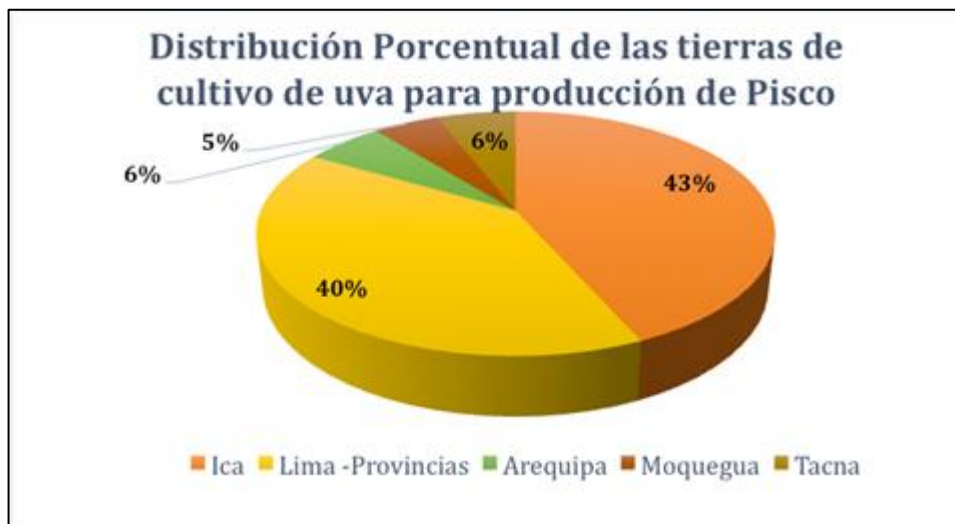


Figura 06. -. Distribución Porcentual de las tierras de cultivo de vid de variedades pisqueras en las Zonas de Denominación de Origen Modificado de MINAGRI, 2008

En cuanto a la sanidad de las mismas, se tiene información que el principal problema de la vid en el Perú, es la filoxera. Esta enfermedad reduce los rendimientos de los cultivos y perjudica la calidad del fruto. Se ha observado que algunas variedades pisqueras, como la quebranta e italia, son más tolerantes a la filoxera; pero a largo plazo se ven afectadas disminuyendo su productividad. Otros problemas sanitarios se han detectado están relacionado a la presencia de nemátodos, mosca blanca y virosis, la cual afecta los cultivos de manera importante (CITEVID, 2004).

Se ha señalado la importancia económica de la vid a nivel mundial y en especial para la agricultura peruana. Donde los virus de vid constituyen una seria amenaza y suponen, por tanto, un importante problema económico para la agricultura. Notables son los constantes esfuerzos que se realizan en diferentes países para hacer efectiva la única medida de control fitosanitaria posible: obtener y multiplicar plantas libres de virus.

Un punto crucial es contar con un sistema de diagnóstico sensible, sencillo y preciso que nos permita determinar que virus están presentes, su frecuencia y variabilidad. Para ello debemos desarrollar y validar herramientas moleculares como RT-PCR e IC-RT-PCR.

IV. -OBJETIVOS

4.1.-Objetivo General:

Desarrollar y estandarizar las técnicas moleculares de RT-PCR y/o IC-RT-PCR para los principales virus que atacan variedades de uva pisquera.

4.2.-Objetivos Específicos:

- Determinar la situación fitosanitaria actual de las principales zonas productoras de variedades pisqueras de uva en las regiones de Ica, Tacna y Arequipa con respecto a la infección de 7 principales virus (GFkV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, ToRSV y ArMV) con la técnica de DAS-ELISA
- Evaluar la incidencia y prevalencia viral en dichas regiones para dichos virus con la técnica de DAS-ELISA
- Estandarizar y realizar un análisis de diagnóstico con RT-PCR para los 2 virus más incidentes de Ica, Tacna y Arequipa.
- Estandarizar y realizar un análisis de diagnóstico con IC-RT-PCR para los 2 virus más incidentes de Ica, Tacna y Arequipa.
- Determinar la sensibilidad de las técnicas Moleculares en comparación a DAS- ELISA.

V –HIPÓTESIS

Las técnicas de inmunocaptura-RT-PCR y RT-PCR son más sensibles que DAS-ELISA para la detección de virus en vid.

VI. -MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. -Material biológico

En enero, febrero y octubre del 2013 se realizaron visitas en los principales viñedos de las regiones de Ica, Tacna y Arequipa respectivamente, donde se llevó a cabo la colecta del material vegetal y la toma de datos. Se adjunta formato utilizado para la toma de datos en cada viñedo visitado. (Ver Anexo 1). Se utilizó como material de estudio hojas de vid de variedades pisqueras utilizadas en la elaboración de Pisco.

Los campos prospectados se georreferenciaron con un Sistema de Posicionamiento Global (GPS) portátil Garmin eTrex ®. Donde se obtuvo datos de latitud, longitud, y altitud en todos los campos muestreados. Estos datos fueron analizados y mapeados con el programa ArcGIS10. 2. 1®

En el campo o lote evaluado se realizó un muestreo aleatorio estructurado, siguiendo el siguientes esquema: se eligió la quinta y décima planta de cada surco impar (1, 3, 5, etc.) hasta terminar el campo o parcela, como se muestra en la figura 07.

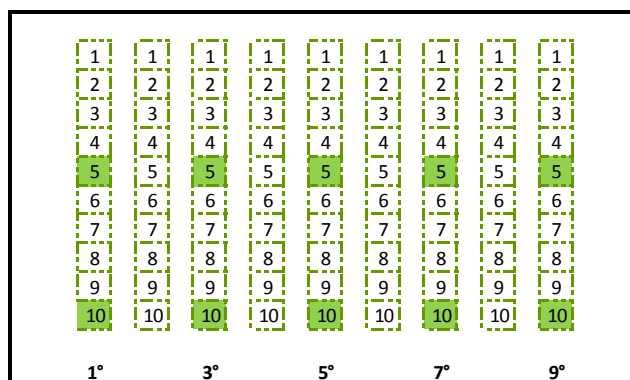


Figura 07.- Tipo de Muestreo en Cada Viñedo, surco seleccionado en cada parcela (1°,3°,5°,7°, 9°), posicionamiento de la planta colectada

Una vez seleccionada la planta de vid a muestrear, se colectó hojas jóvenes de las zonas apical, media y basal de cada planta, estas fueron colocadas en bolsas de polietileno debidamente rotuladas, sin ser tocadas con las manos. Las bolsas con las muestras colectadas fueron colocadas, lo más pronto posible, en una caja de tecnopor o cooler con hielo con geles congelantes para evitar su deshidratación. Las muestras fueron enviadas a los laboratorios de la Unidad de Genómica de la UPCH, donde se almaceno a -80°C para su posterior análisis. Un total de 1 207 muestras fueron colectadas (con sus respectivas repeticiones) pertenecientes a las variedades quebranta moscatel, italia, torontel y negra criolla. A continuación se detalle en n° de muestras por variedad en la tabla 05. Se visitaron un total de 28 viñedos de las tres regiones mencionadas pertenecientes a 14 distritos, para la región Arequipa se incluyó Predegal, Vitor y Uraca con un total de 7 viñedos visitados (Tabla 06 , Figura 08) ; para la región Ica se incluyó Santiago, Pueblo Nuevo, Salas, Cercado de Ica, Los Aquijes, Ocucaje y Chincha con un total de 11 viñedos (Tabla 07 , Figura 09) y finalmente para la región Tacna: Magollo, Pocollay, Calana, y Pachia con 10 viñedos muestreados (Tabla 08 , Figura 10) . El número de muestras por campo fue variable, dependiendo de su tamaño.

| Variedad | Total de Plantas |
|-----------------|-------------------------|
| Quebranta | 472 |
| Moscatel | 154 |
| Italia | 255 |
| Negra Criolla | 232 |
| Torontel | 94 |
| Total | 1207 |

Tabla 05.- Número de muestras colectadas por Variedad de uva pisquera



Figura 08. - Mapa de la Región Arequipa Geo- Referenciado de los principales Viñedos de Uvas Pisqueras Muestreados. El mapeo de los datos obtenidos se realizó con el programa ArcGIS®



Figura 09. - Mapa de la Región Ica Geo- Referenciado de los principales Viñedos de Uvas Pisquera Muestreados. El mapeo de los datos obtenidos se realizó con el programa ArcGIS®

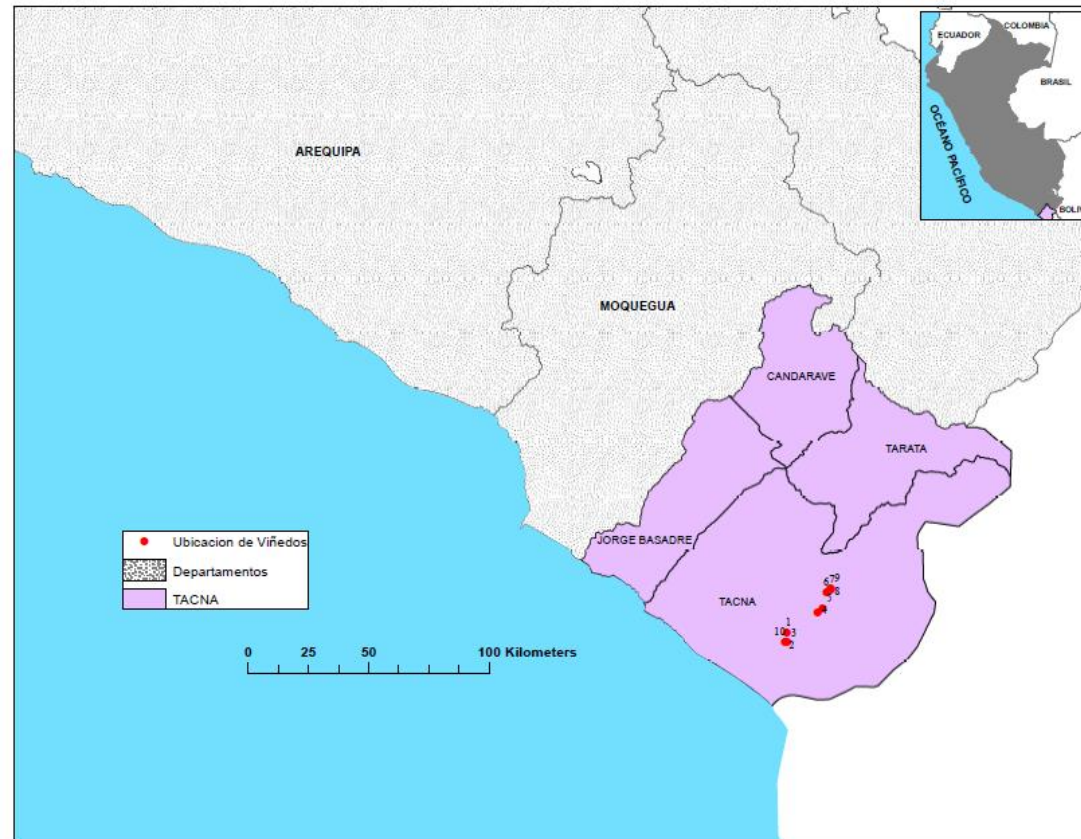


Figura 10. - Mapa de la Región Tacna Geo- Referenciado de los principales Viñedos de Uvas Pisqueras Muestreados.
El mapeo de los datos obtenidos se realizó con el programa ArcGIS®

Tabla 06. -Muestras de hojas de vid recolectadas en 2013 durante las prospecciones realizadas en viñedos de la Región Arequipa-Perú. N° de muestra, Variedad, Distrito, Coordenadas Geográficas y fecha de muestreo

| N° Viñedo | N° Muestra | Variedad | Distrito | Sector | Sistema de Posicionamiento Global (GPS) | | | Fecha de Muestreo |
|-----------|------------|---------------|----------|------------------|--|--------------|---------------------------------|-------------------|
| | | | | | Latitud | Longitud | Altitud (m.s.n.m.) ^x | |
| 1 | 32 | Quebranta | Pedregal | Irrigación Majes | 16°20'00.3" | 072°12'55.9" | 1384 | Setiembre,2013 |
| | 16 | Moscatel | | | | | | |
| 2 | 12 | Moscatel | Pedregal | Irrigación Majes | 16°19'54.7" | 072°12'55.9" | 1388 | Setiembre,2013 |
| | 40 | Italia | | | | | | |
| 3 | 6 | Negra Criolla | Vitor | Sector La Cano | 16°20'10.6" | 071°55'56.1" | 1130 | Octubre,2013 |
| | 24 | Moscatel | | | | | | |
| | 34 | Quebranta | | | | | | |
| 4 | 18 | Moscatel | Uraca | La Barrera | 16°13'11.4" | 072°29'07.7" | 428 | Octubre,2013 |
| | 60 | Quebranta | | | | | | |
| 5 | 70 | Torontel | Uraca | Toro Muerto | 16°14'04.6" | 072°29'11.5" | 491 | Octubre,2013 |
| 6 | 42 | Negra Criolla | Uraca | Toro Muerto | 16°14'1.1" | 072°29'25.0" | 508 | Octubre,2013 |
| 7 | 44 | Moscatel | Uraca | Corire | 16°13'30.4" | 072°28'10.9" | 442 | Octubre,2013 |

Notas: ^xm.s.n.m., metros sobre el nivel del mar

Tabla 07. -Muestras de hojas de vid recolectadas en 2013 durante las prospecciones realizadas en viñedos de la Región Ica- Perú.
N° de muestra, Variedad, Distrito, Coordenadas Geográficas y fecha de muestreo

| N° Viñedo | N° Muestra | Variedad | Distrito | Sector | Sistema de Posicionamiento Global (GPS) | | | Fecha de Muestreo |
|-----------|------------|-----------|----------------|------------------------|--|---------------|---------------------------------|-------------------|
| | | | | | Latitud | Longitud | Altitud (m.s.n.m.) ^x | |
| 1 | 30 | Quebranta | Santiago | Pampa de los Castillos | 14°13'34" | 075°38'24.1" | 396 | Enero, 2013 |
| 2 | 17 | Quebranta | Pueblo Nuevo | Caserio de Conuca | 14°07'21.4" | 075°42'10.2" | 396 | Febrero, 2013 |
| | 20 | Italia | | | 14°07'26.7" | 075° 42'09.2" | | |
| 3 | 43 | Quebranta | Pueblo Nuevo | Caserio Puno | 14°08'51.8" | 075°42'17.5" | 397 | Febrero, 2013 |
| 4 | 20 | Quebranta | Pueblo Nuevo | Caserio Yajasi | 14°8'10.5" | 75°41'31" | 410 | Febrero, 2013 |
| 5 | 30 | Quebranta | Salas | Guadalupe | 13°59'18.8" | 075°45'30.7" | 430 | Febrero, 2013 |
| 6 | 30 | Quebranta | Salas | Guadalupe | 13°59'13.1" | 075°45'29" | 430 | Febrero, 2013 |
| 7 | 30 | Quebranta | Salas | Guadalupe | 13°59'10.8" | 075°45'22.1" | 430 | Febrero, 2013 |
| 8 | 28 | Quebranta | Cercado de Ica | Cachiche | 14°05'50.5" | 075°43'51.8" | 404 | Enero, 2013 |
| 9 | 9 | Torontel | Los Aquijes | Garganto | 14°06'3.85" | 075°42.6'30" | 403.4 | Enero, 2013 |
| | 9 | Moscatel | | | | | | |
| | 9 | Quebranta | | | 14° 06'3.92" | 075°42.5'36" | | |
| 10 | 15 | Torontel | Ocucaje | Caserio Pinilla | 14° 22.2'33" | 075°39.7'16" | 314.1 | Enero, 2013 |
| | 13 | Moscatel | | | | | | |
| | 19 | Quebranta | | | 14°22.1'36" | 075°39.6'35" | | |
| 11 | 90 | Quebranta | Chincha | Chincha Baja | 13°27'34.8" | 76° 9'06.9" | 41 | Enero, 2013 |

Notas: ^xm.s.n.m., metros sobre el nivel del mar

Tabla 08. -Muestras de hojas de vid recolectadas en 2013 durante las prospecciones realizadas en viñedos de la Región Tacna- Perú.
N° de muestra, Variedad, Distrito, Coordenadas Geográficas y fecha de muestreo

| N° Viñedo | N° Muestra | Variedad | Distrito | Sector | Sistema de Posicionamiento Global (GPS) | | | Fecha de Muestreo |
|-----------|------------|---------------|----------|--------------|--|--------------|---------------------------------|-------------------|
| | | | | | Latitud | Longitud | Altitud (m.s.n.m.) ^x | |
| 1 | 17 | Italia | Magollo | Lateral 4 | 18°04'21.7" | 070°19'39.1" | 334 | Febrero,2103 |
| | 18 | Moscatel | | | | | | |
| 2 | 60 | Italia | Magollo | Lateral 5 | 18°06'31.7" | 070°19'57.2" | 333 | Febrero,2103 |
| 3 | 51 | Italia | Magollo | Lateral 21 | 18°06 '31.7" | 070°19'25.9" | 301 | Febrero,2103 |
| 4 | 32 | Italia | Pocollay | Pago Sobraya | 17°59'44.7" | 070°12'27.7" | 688 | Febrero,2103 |
| | 23 | Negra Criolla | | | | | | |
| 5 | 21 | Italia | Calana | Cerro Blanco | 17°58'34.7" | 070°11'20.0" | 767 | Febrero,2103 |
| | 57 | Negra Criolla | | | | | | |
| 6 | 43 | Negra Criolla | Calana | Calana Alto | 17°55'05.7" | 070°10'28.0" | 981 | Febrero,2103 |
| 7 | 5 | Negra Criolla | Pachia | Pachia | 17°54'21.1" | 070°09'32.9" | 1042 | Febrero,2103 |
| 8 | 40 | Negra Criolla | Pachia | Pachia | 17°54'18.1" | 070°09'35.2" | 1046 | Febrero,2103 |
| 9 | 16 | Negra Criolla | Pachia | Pachia | 17°54'09.6" | 070°09'33.1" | 1056 | Febrero,2103 |
| 10 | 14 | Italia | Magollo | Lateral 22 | 18°6'27.4" | 070°19'44.8" | 276 | Febrero,2103 |

Notas: ^xm.s.n.m., metros sobre el nivel del mar

6.2.-Detección Serológica

Todas las muestras se analizaron serológicamente según el procedimiento de DAS-ELISA, según lo descrito por Clark y Adams (1977). Utilizando antisueros comerciales específicos para detección de antígenos de los siguientes virus: GFKV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, ToRSV y ArMV; con sus respectivos controles pertenecientes a la empresa BIOREBA.

Se fijó en las placas de poliestireno con 100 μ L por pocillo del anticuerpo específico para cada virus en una dilución 1:1000 en buffer de Sensibilización (Anexo 2), incubadas a 4°C por toda la noche, luego las placas fueron lavadas 3 veces por 3 min con el buffer de lavado PBS- T (Anexo 2) para remover el buffer de sensibilización y el anticuerpo no adherido a cada pocillo. Las hojas de las plantas fueron maceradas en proporción 1:20 (p/v) en buffer de Maceración (Anexo 2). Se emplearon controles positivos y negativos para cada virus, producidos por el fabricante. Alícuotas de 100 μ L de extracto de cada muestra y de los controles fueron añadidas en cada pocillo. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C, y lavadas 3 veces por 3 min con buffer de lavado, Si un antígeno viral estaba presente, este reaccionaba uniéndose específicamente con el anticuerpo adherido en el interior de las celdas. Posteriormente, las placas fueron incubadas por 3 h a 37°C con 100 μ L por pocillo de Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina de cada virus diluido en 1:1000 con el buffer de conjugación (Anexo2). Las placas se lavaron nuevamente de la manera descrita anteriormente. Si el antígeno viral estaba presente, el conjugado enzimático y el anticuerpo se combinarían con el antígeno viral. Este conjugado enzimático no se une al extracto de tejido sano. Finalmente se adiciona el buffer de revelado que contiene

el sustrato p-nitrofenil fosfato (Anexo2), este es un sustrato para fosfatasa alcalina donde se cataliza la hidrólisis del pNPP a p-nitrofenol, produciéndose un producto amarillo, esta coloración se observó en aquellos pocillos donde se tiene muestras positivas a la infección.. Las lecturas de absorbancia (OD: Densidad Óptica) se hicieron a los 90 min aproximadamente. Los valores de absorbancia (A405nm) se obtuvieron en una Lectora de ELISA

Para el análisis de las absorbancias obtenidas se utilizó la información técnica del fabricante, donde se determinó la línea de corte o el valor umbral de cada placa, Dicho valor discrimina los resultados positivos de las lecturas de fondo o “background”. Se utilizó para el análisis estadístico el programa MS-Excel, se ordenaron de manera ascendente las absorbancias obtenidas de una placa. Para hallar el punto de corte se usa la siguiente fórmula:

$$\text{Punto de Corte} = (\text{Promedio} + 3 \cdot \text{DS}) \cdot 1.1$$

Promedio: Promedio de todos los valores de OD hasta esa posición en la tabla ordenada de menor a mayor.

DS: Desviación Estándar de todos los valores de OD hasta esa posición en la tabla ordenada de menor a mayor.

Se halló el punto de corte de cada placa y aquellos valores superiores a éste son considerados muestras positivas.

6.3. -Detección Molecular

La detección molecular se realizó para aquellos virus que mostraron mayor incidencia y prevalencia en el estudio de prospección viral en las tres regiones por la técnica DAS-ELISA. Los virus que entraron a la fase de detección molecular fueron: Virus estriado clorótico de la vid (GFkV) y el virus hoja enrollada asociada la vid 2 (GLRaV-2).

6.3.1. -RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

6.3.1.1.-Extracción de RNA tejido foliar

El ARN total se extrajo de tejido liofilizado del control positivo para GFkV, control positivo para GLRaV-2 y controles negativos de BIOREBA® dichas muestra fueron utilizadas para la estandarización del protocolo RT-PCR de los virus antes mencionados. Además se seleccionaron 115 muestras de campo, que resultaron positivas y negativas obtenidos a partir de las pruebas serológicas para el virus GFkV y GLRaV-2, fueron corroborados mediante RT-PCR. Se utilizó un protocolo de extracción CTAB modificado (Anexo 3).

6.3.1.2.- Concentración y pureza del ARN

Se midió la pureza y la concentración del ARN extraído utilizando un espectrofotómetro modelo BioPhotometer® D30 de la marca Eppendorf. Se tomaron 2 µL de muestra, calculando la pureza con el ratio de absorbancia 260/280 nm (Anexo4). Un ratio de ~2 es aceptado como ARN puro, mientras que un ratio menor indica baja pureza. Además la integridad de las bandas de ARN se verifico con la corrida en gel de electroforesis 1 % [w / v; agarosa - TAE].

6.3.1.3.-Síntesis de ADNc

Se procedió a realizar síntesis de ADNc de controles positivos y controles negativos para cada uno de los 2 virus en estudio, así como de las muestras de campo a evaluar utilizando las especificaciones técnicas del Kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). Se utilizó una cantidad entre 100-500 µg de ARN total para llevar a cabo las reacciones de síntesis de ADNc a partir de ARN totales, se utilizó 200 Unidades de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen®), 40 unidades de inhibidor de RNAasas (RNaseOUT, Invitrogen®), DTT (0, 1 M), buffer RT 5X, agua tratada con DEPC (pirocarbonato de dietilo) , dNTPs (10 mM) y utilizando 50ng/uL de Ramdon Primers (Promega) como cebador. Posteriormente las muestras se incubaron en el termociclador a 25°C, 37°C y 70°C por 10, 50 y 15 min respectivamente (Anexo 5).

6.3.1.4. -PCR Simple

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue realizada usando cebadores ya reportados que son específicos para la región del gen de la proteína de cubierta de los virus en estudio (Tabla 09).

Tabla 09. - Cebadores para detección de virus de vid. Secuencia nucleotídica, tamaño del producto (bp), gen target

| Patógeno | Cebador | Secuencia (5---3) | Tamaño del Producto (bp) | Gen | Referencia |
|----------|---------|----------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------------|
| GLRaV-2 | Forward | GGTGATAACCGACGCCTCTA | 543 | Proteína de Cubierta | Bertazzon and Angelini 2004 |
| | Reverse | CCTAGCTGACGCAGATTGCT | | | |
| GFkV | Forward | TGACCAGCCTGCTGTCTCTA | 179 | Proteína de Cubierta | Sabanadzovic et al 2000 |
| | Reverse | TGGACAGGGAGGTGTAGGAG | | | |

Además se verifico la calidad de ARN utilizando cebadores para ARNr 18S de vid. (Tabla 10), los cuales amplifican un fragmento de 844bp (Gambino *et al.*, 2006).

Tabla 10. - Cebadores control Interno. Secuencia nucleotídica, tamaño del producto (bp)

| Blanco | Cebador | Secuencia (5---3) | Tamaño del Producto (bp) | Gen |
|----------|---------|----------------------|--------------------------|-----------------|
| 18S ARNr | Forward | CGCATCATTCAAATTTCTGC | 844 | Control Interno |
| | Reverse | TTCAGCCTTGGACCATACT | | |

El PCR fue realizado siguiendo las especificaciones de Gambino *et al* (2006) con un volumen de reacción total de 25µL el cual contenía 2µL de ADNc (previamente transcrito), 1X buffer PCR, 0. 3mM dNTPs, 1. 5U de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific), 3mM de MgCl₂ y los cebadores específicos para cada virus. Los detalles de la composición del master mix de PCR utilizado para la detección de cada uno de los virus se detallan debajo (Tabla 11,12).

Tabla 11.- Componentes del master mix PCR para la detección del virus GLRaV-2. Se utilizó una concentración final cada cebador forward y reverse de 0. 8 mM

| Componentes | |
|-----------------------------|--------|
| Buffer PCR 5X | 7.5uL |
| 25 mM MgCl ₂ | 3uL |
| 10 mM dNTP Mix | 0.75uL |
| 20 µM cebador “forward” | 1uL |
| 20 µM cebador “reverse” | 1uL |
| Taq DNA polymerase (5 U/µL) | 0.3uL |
| ADNc | 2uL |
| Agua DEPC | 9.45uL |
| Volumen final | 25uL |

Tabla 12.- Componentes del master mix PCR de detección del virus GFkV. Se utilizó una concentración final cada cebador forward y reverse de 0.4mM

| Componentes | |
|-----------------------------|--------|
| Buffer PCR 5X | 8.55uL |
| 25 mM MgCl ₂ | 3uL |
| 10 mM dNTP Mix | 0.75uL |
| 20 μM cebador "forward" | 0.5uL |
| 20 μM cebador "reverse" | 0.5uL |
| Taq DNA polymerase (5 U/μL) | 0.3uL |
| ADNc | 2uL |
| Agua DEPC | 9.45uL |
| Volumen final | 25uL |

Para determinar las condiciones óptimas de amplificación, se realizó gradiente de temperatura de hibridación (Figura 11) de cada par de cebador (rango 49.5 a 60.5°C) y curvas de concentración de MgCl₂ (1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM). El PCR fue llevado a cabo en un termociclador EppendorfTM MastercyclerTM pro PCR System.

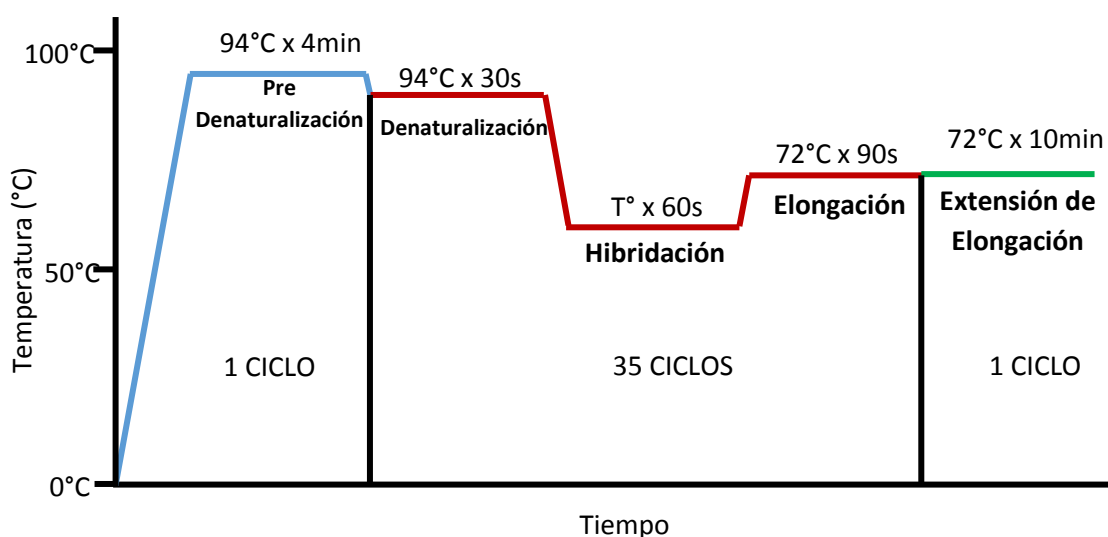


Figura 11. -Condiciones de Amplificación de PCR para el gen de Proteína de cubierta viral.

6.3.1.5.-PCR Múltiple

Es una variante de la PCR tradicional, tiene diferentes aplicaciones ya que amplifica distintos fragmentos de ADN diana simultáneamente, se logra mediante el uso de múltiples pares de cebadores en una mezcla de reacción.

Para ello una vez determinada las temperaturas de hibridación, concentración de $MgCl_2$ y las condiciones óptimas de amplificación de manera individual para cada patógeno, se adiciona al Master Mix la combinación de los dos pares de cebadores usados para la detección del virus GFkV y GLRaV-2 a una temperatura de hibridación de $57^{\circ}C$. Para ello se prueba las siguientes combinaciones de concentraciones de los cebadores (Tabla 13). Para probar la eficiencia de la prueba se hace la detección utilizando muestras control positivo a la infección individual de GFkV, GLRaV- 2 y un control positivo a la infección múltiple de ambos virus.

Tabla 13. - Concentraciones de los cebadores para la estandarización de la PCR múltiple.

| Mezcla de Cebadores | Cebador | Concentración Final |
|---------------------|-----------------|---------------------|
| 1 | GLRaV-2 Forward | 0.8uM |
| | GLRaV-2 Reverse | |
| | GFkV Forward | 0.4uM |
| | GFkV Reverse | |
| 2 | GLRaV-2 Forward | 0.6uM |
| | GLRaV-2 Reverse | |
| | GFkV Forward | 0.6uM |
| | GFkV Reverse | |
| 3 | GLRaV-2 Forward | 0.5uM |
| | GLRaV-2 Reverse | |
| | GFkV Forward | 0.7uM |
| | GFkV Reverse | |
| 4 | GLRaV-2 Forward | 0.4uM |
| | GLRaV-2 Reverse | |
| | GFkV Forward | 0.8uM |
| | GFkV Reverse | |
| 5 | GLRaV-2 Forward | 0.3uM |
| | GLRaV-2 Reverse | |
| | GFkV Forward | 0.8uM |
| | GFkV Reverse | |

Los resultados de la amplificación específica por PCR, fueron analizados en geles de agarosa 2% con GelRed 10000X, usando como buffer de corrido TAE 1X, en condiciones de 90 voltios por 45 min. Se observaron las bandas de ADN correspondientes por exposición del gel a radiación UV. La señal de los amplicones fue fotografiada con un documentador de geles.

6.3.2. -Inmunocaptura RT-PCR

6.3.2.1. -Inmunocaptura -RT-PCR Simple (IC-RT-PCR)

6.3.2.1.1. -Sensibilización:

Las tiras de 8 pocillos para PCR de 0.2 mL de polipropileno (Axygen™) fueron sensibilizadas con el anticuerpo específico comercial para los virus GFkV y GLRaV-2 producidos por la empresa BIOREBA. Este anticuerpo fue diluido 1:1000 con el buffer de Sensibilización (Anexo 2), se agregó 100µL y fueron incubadas a 4°C por toda la noche, luego las tiras de 8 pocillos fueron lavados 6 veces por 3 min con el buffer de lavado PBS- T (Anexo 2) para remover el buffer de sensibilización y el anticuerpo no adherido a cada pocillo.

6.3.2.1.2.-Inmunocaptura de la Muestra:

Para el desarrollo de Inmunocaptura RT-PCR Simple se utilizaron muestras control positivo a la infección individual con GFkV y GLRaV-2 (hojas liofilizadas) y controles negativos (BIOREBA). Alícuotas de 100µL del extracto de cada control fueron añadidas en cada pocillo. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C, y lavadas 6 veces por 3 min con el buffer de lavado PBS- T

(Anexo 2), teniendo el debido cuidado para evitar cualquier contaminación cruzada.

6.3.2.1.3.-Síntesis de ADNc

La transcripción inversa se realizó en los mismos pocillos con los virus capturados, fueron incubados con 1µL de dNTPs (0.5mM), 1µL de Random Primers (50ng/µL) y 10µL de agua tratada con DEPC a 65°C por 5 min. Luego los pocillos fueron colocados sobre hielo y se agregó una mezcla con 4µL de buffer RT -5X, 1µL de DTT (Ditiotreitol) – 0.1M, 1µL de inhibidor de RNAsas (RNaseOUT, Invitrogen®; 40U/µL), 1µL de enzima transcriptasa reversa M-MLV proveniente del virus Leucemia Murino Moloney (200U) y 1µL de agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato). Posteriormente las muestras se incubaron en el termociclador a 25°C, 37°C y 70°C por 10, 50 y 15 min respectivamente.

6.3.2.1.4.-PCR Simple

El PCR fue realizado con un volumen de reacción total de 25µL el cual contenía 2µL de la alícuota transcrita en el paso anterior, 1X buffer PCR, 0.3mM dNTPs, 1.5U de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific), MgCl₂ y los cebadores específicos para cada virus. Se siguió las condiciones del PCR establecidas en la detección viral por PCR Simple.

6.3.2.2.-Inmunocaptura -RT-PCR Múltiple (M-IC-RT-PCR)

En este procedimiento se utilizaron placas de PCR de polipropileno (Axygen™) fueron sensibilizadas simultáneamente con 2 anticuerpos específico para los virus: GFkV y GLRaV-2, (BIOREBA). Cada anticuerpo fue diluido 1:1000 con el

buffer de sensibilización (Anexo 2), luego estos anticuerpos fueron mezclados, finalmente se agregó 100µL de dicha mezcla a cada pocillo, y fueron incubados a 4°C durante la noche. Al día siguiente, las placas fueron lavados 6 veces por 3 min con el buffer de lavado PBS- T (Anexo 2), para remover el buffer de sensibilización y el anticuerpo no adherido. La fijación de la muestra, la síntesis de ADNc se realizaron con las mismas condiciones descritas anteriormente. Para los procesos de amplificación se utilizaron lo establecido en PCR-Múltiple.

6.4.-Sensibilidad y especificidad

Se realizó una comparación de diagnóstico utilizando las tres técnicas: DAS – ELISA M-RT-PCR e M-IC-RT-PCR para la detección de los virus GFkV y GLRaV-2 utilizando muestras de plantas de vid colectadas durante las prospecciones. Para ello, se seleccionó 73 muestras, de las cuales 22 y 51 dieron positivo y negativo respectivamente a la infección por el virus GFkV utilizando la técnica de DAS-ELISA. También se seleccionó 71 muestras que dieron como resultado 20 positivas y 51 negativas para la infección con el virus GLRaV-2 por DAS-ELISA. Dichas muestras fueron evaluadas con las técnicas de diagnóstico molecular. La información obtenida fue analizada mediante una prueba de estadística descriptiva, indicando el número y porcentaje de muestras positivas y negativas para cada uno de los métodos de diagnósticos utilizados.

Para evaluar la especificidad de la PCR, se analizó los resultados de la comparación de técnicas de diagnóstico viral antes descrita y se determinó el número de muestras que dieron positivo a la infección viral de cada uno de los

virus evaluados por la técnica de M-RT-PCR, pertenecientes a las siguientes categorías de resultados (Tabla 14):

Tabla 14. – Resultados de comparación de Técnicas de Diagnóstico viral

| Detección Viral | | |
|-----------------|----------|-------------|
| DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
| + | + | + |
| + | - | + |
| - | - | - |
| - | + | - |
| - | + | + |
| - | - | + |
| + | - | - |
| + | + | - |

Un total de 57 y 31 muestras dieron positivo por M-RT-PCR para la detección del virus GFkV y GLRaV-2 respectivamente. Con la información del número total de muestras positivas por M-RT-PCR, se calculó en N° muestras necesarias para enviar a secuenciar, para ello se utilizó el programa online Raosoft Simple Size Calculator (Raosoft, 2004). Se determinó un N°: 13 muestras de productos de PCR del gen del virus GFkV, con los siguientes parámetros: intervalo de confianza del 95% y un margen de error del 5%. Así como, un N°: 7 muestras de producto de PCR del gen de proteína de cubierta del virus GLRaV-2 con los siguientes parámetros: intervalo de confianza del 95% y un margen de error del 7%

Estos 7 productos de PCR del gen de la proteína de cubierta del virus GLRaV-2 fueron enviados a secuenciar para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados. Con respecto a estos productos de PCR se tenía información

fitosanitaria de infección con otros virus: GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV; GFkV, ArMV, ToRSV; realizado en la primera fase del estudio, como se detalla en la tabla 15:

Tabla 15. – Situación Fitosanitaria viral de las Muestras seleccionadas para evaluar la especificidad de los cebadores del virus GLRaV-2. (+) Muestra Positiva, (-) Muestra Negativa.

| Muestras | Detección del Virus - DAS ELISA | | | | | |
|----------|---------------------------------|---------|------|------|------|-------|
| | GLRaV-1 | GLRaV-3 | GFLV | GFkV | ArMV | ToRSV |
| 275-A | - | - | - | + | - | + |
| 266-A | - | - | - | - | - | - |
| 271-A | + | - | - | - | - | + |
| 393-A | - | - | - | + | - | + |
| 307-A | + | - | - | - | - | - |
| 303-A | - | - | - | - | - | - |
| 282-A | - | - | - | - | - | - |

Además se seleccionaron 16 productos de PCR del gen de la proteína de cubierta del virus GFkV y fueron enviados a secuenciar para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados. Con respecto a estos productos de PCR se tenía información fitosanitaria de infección con otros virus: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFLV; ArMV, ToRSV; realizado en la primera fase del estudio como se detalla en la tabla 16. Además se incluye la detección del virus RSP (“Virus Rupestris stem pitting”) por RT-PCR, información procedente del estudio Selección Clonal (agronómica y sanitaria) en la variedad Quebranta en el Valle de Ica” financiado por CONCYTEC (Investigador Principal: Jorge Tenorio) utilizado para los fines pertinentes de la presente tesis.

Tabla 16. – Situación Fitosanitaria viral de las Muestras seleccionadas para evaluar la especificidad de los cebadores del virus GFkV. (+) Muestra Positiva, (-) Muestra Negativa. (*) Virus RSP detectado por RT-PCR (Información procedente del estudio Selección Clonal (agronómica y sanitaria) en la variedad Quebranta en el Valle de Ica” financiado por CONCYTEC -Investigador Principal: Jorge Tenorio), (**) Muestras no evaluadas.

| Muestras | Detección del Virus | | | | | | |
|----------|---------------------|---------|---------|------|------|-------|--------|
| | DAS-ELISA | | | | | | RT-PCR |
| | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GFLV | ArMV | ToRSV | RSP* |
| 399 - I | - | + | - | - | - | - | + |
| 8 - V | + | - | - | - | - | - | + |
| 424 - I | - | - | - | - | - | - | + |
| 29 - V | - | - | - | - | - | - | + |
| 7 - V | - | - | - | - | - | - | + |
| 61 - A | - | - | - | - | - | - | ** |
| 99 - A | - | - | - | - | - | - | ** |
| 160 - A | - | - | - | - | - | - | ** |
| 356 - A | - | - | - | - | - | - | ** |
| 282 - A | - | - | - | - | - | - | ** |
| 289 - A | - | - | - | - | - | - | ** |
| 16 - T | - | - | - | - | - | - | ** |
| 106 - T | - | - | - | - | - | - | ** |
| 253 - T | - | - | - | - | - | - | ** |
| 186 - T | - | - | - | - | - | - | ** |
| 198 - T | - | - | - | + | - | - | ** |

Estos productos de PCR fueron purificados utilizando kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de la purificación, los productos se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen – Korea con los pares de cebadores específicos (Tabla 09). Los resultados de este secuenciamiento fueron curados manualmente además se obtuvo una secuencia consenso por producto de PCR utilizando el programa

Mega7. Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con las secuencias publicadas en GenBank NCBI y se evaluó el porcentaje de identidad.

Para evaluar la sensibilidad, se halló el límite de detección de M-RT-PCR, M-IC-RT-PCR y DAS-ELISA para la detección de ambos virus GFkV y GLRaV-2, para ello se realizó diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} de un extracto crudo de planta infectada por los dos virus, posteriormente se evaluó la detección por cada técnica.

VII. –RESULTADOS

7. 1. -Detección de infección viral por DAS- ELISA

Considerando vides en producción, los resultados indicaron que en los 28 viñedos prospectados con un total de 1207 muestras analizadas de plantaciones de uvas pisqueras, se encontró una infección viral promedio de 19.63% en las tres regiones (Tabla 17) utilizando la técnica de DAS-ELISA. (Anexo 6)

Tabla 17.- Porcentaje de Infección viral Promedio

| Región | TEST DAS - ELISA | | |
|----------|------------------|------------------------|--------------|
| | Nº Muestras | Nº Muestras Infectadas | % Infección |
| Ica | 412 | 83 | 20.15 |
| Arequipa | 398 | 80 | 20.10 |
| Tacna | 397 | 74 | 18.64 |
| | Promedio | | 19.63 |

Estas infecciones virales estuvieron divididas en infecciones simples y múltiples. El porcentaje de infecciones múltiples con respecto a las infecciones totales fueron de 14.46%, 12.50% y 8.11% para Ica, Arequipa y Tacna respectivamente (Tabla 18).

Tabla 18.- Porcentaje de Infección Viral Simples o Múltiple

| | TEST DAS ELISA | | | | |
|----------|----------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|
| | Total de Infecciones | Nº Infecciones Simples | % Infección Simple | Nº Infecciones Múltiples | % Infección Múltiple |
| Ica | 83 | 71 | 85.54 | 12 | 14.46 |
| Arequipa | 80 | 70 | 87.50 | 10 | 12.50 |
| Tacna | 74 | 68 | 91.89 | 6 | 8.11 |

En el caso de infecciones múltiples, se encontraron 16 combinaciones de virus, la mayoría de estas era causada por infecciones dobles, además se encontró que virus más frecuente en estas infecciones fue el virus GLRa-1 (Tabla 19).

Tabla 19.- Tipos de Infección Múltiple

| Tipo | Infecciones Múltiples | |
|---------------------------|-----------------------|-------|
| | N° | % |
| GLRaV-3 + GFkV | 3 | 10.71 |
| GLRaV-1 + ToRSV | 2 | 7.14 |
| GLRaV-1 + GFLV | 1 | 3.57 |
| GFkV + GFLV | 3 | 10.71 |
| GLRaV-2 + ArMV | 3 | 10.71 |
| GLRaV-3 + GFLV | 2 | 7.14 |
| GLRaV-2 + ToRSV | 1 | 3.57 |
| GLRaV-1 + GFkV | 2 | 7.14 |
| GLRaV-2 + GFkV | 3 | 10.71 |
| GLRaV-1 + GLRaV-2 | 1 | 3.57 |
| GFkV + ArMV | 2 | 7.14 |
| GFLV + ArMV | 1 | 3.57 |
| GLRaV-1 + ArMV + ToRSV | 1 | 3.57 |
| GLRaV-1 + GLRaV-2 + ToRSV | 1 | 3.57 |
| GLRaV-1 + GFkV + ArMV | 1 | 3.57 |
| GLRaV-1 + GLRaV-3 + ArMV | 1 | 3.57 |
| Total | 28 | 100 |

Al analizar las infecciones por viñedo. Se encontró que sólo 1 de los 28 viñedos estudiados no presentaron presencia de ninguno de los 7 virus analizados. Por otro lado 6 predios mostraron porcentajes de infecciones (% plantas enfermas) inferiores a 10.5% y en los 21 campos restantes las infecciones fluctuaron entre 11% y 36.5% (Tablas 20, 21, 22). En promedio, los 11 viñedos de la región Ica mostraron una infección total de 20.1%, fluctuando entre 5 % en el viñedo 4 hasta 35.1 % en el viñedo 2. En la región Arequipa de los 7 viñedos estudiados la infección total fue de 20.10%, variando entre 4.2% en el viñedo 1 hasta 36.5 % en el viñedo 2. Finalmente en la región Tacna, el nivel de infección total para los 10 viñedos fue de 18.64 % fluctuando entre 7.3% en el viñedo 4 y 32.6% para el viñedo 6.

Tabla 20.- Porcentaje de Infección viral en 11 viñedos de la Región Ica. ^a virus asociado a la hoja enrollada de la vid 1, ^b virus asociado a la hoja enrollada de la vid 2, ^c virus asociado a la hoja enrollada de la vid 3, ^d virus hoja abanicada de la vid, ^e virus estriado clorótico de la vid, ^f virus del mosaico de Arabis y ^g virus de la mancha anillada del tomate.

| Región | N° Viñedos | Total de Plantas analizadas | Muestras positivas, % - TEST DAS ELISA | | | | | | | Infección Total(%) | |
|--------|------------|-----------------------------|--|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------|
| | | | GLRaV-1 ^a | GLRaV-2 ^b | GLRaV-3 ^c | GFLV ^d | GFkV ^e | ArMV ^f | ToRSV ^g | | |
| Ica | 1 | 30 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 2 | 37 | 5.4 | 2.7 | 2.7 | 0.0 | 27.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 35.1 |
| | 3 | 43 | 0.0 | 0.0 | 2.3 | 0.0 | 7.0 | 0.0 | 2.3 | 11.6 | |
| | 4 | 20 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.0 | 0.0 | 0.0 | 5.0 | |
| | 5 | 30 | 13.3 | 0.0 | 3.3 | 3.3 | 6.7 | 0.0 | 0.0 | 23.3 | |
| | 6 | 30 | 10.0 | 3.3 | 0.0 | 3.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 13.3 | |
| | 7 | 30 | 0.0 | 3.3 | 0.0 | 0.0 | 3.3 | 3.3 | 0.0 | 10.0 | |
| | 8 | 28 | 7.1 | 3.6 | 3.6 | 0.0 | 3.6 | 3.6 | 0.0 | 14.3 | |
| | 9 | 27 | 3.7 | 3.7 | 3.7 | 0.0 | 18.5 | 0.0 | 0.0 | 25.9 | |
| | 10 | 47 | 2.1 | 4.3 | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 0.0 | 6.4 | 29.8 | |
| | 11 | 90 | 2.2 | 8.9 | 1.1 | 1.1 | 16.7 | 3.3 | 2.2 | 27.8 | |
| Total | | 412 | 3.6 | 3.6 | 2.2 | 1.5 | 10.0 | 1.2 | 1.5 | 20.1 | |

Tabla 21.- Porcentaje de Infección viral en 7 viñedos de la Región Arequipa. ^a virus asociado a la hoja enrollada de la vid 1, ^b virus asociado a la hoja enrollada de la vid 2, ^c virus asociado a la hoja enrollada de la vid 3, ^d virus hoja abanicada de la vid, ^e virus estriado clorótico de la vid, ^f virus del mosaico de Arabis y ^g virus de la mancha anillada del tomate.

| Región | N° Viñedos | Total de Plantas analizadas | Muestras positivas, % - TEST DAS ELISA | | | | | | | | Infección Total(%) |
|----------|------------|-----------------------------|--|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------|--------------------|
| | | | GLRaV-1 ^a | GLRaV-2 ^b | GLRaV-3 ^c | GFLV ^d | GfKV ^e | ArMV ^f | ToRSV ^g | | |
| Arequipa | 1 | 48 | 2.1 | 0.0 | 0.0 | 2.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.2 | |
| | 2 | 52 | 3.8 | 0.0 | 3.8 | 1.9 | 21.2 | 1.9 | 7.7 | 36.5 | |
| | 3 | 64 | 4.7 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 7.8 | 4.7 | 4.7 | 25.0 | |
| | 4 | 78 | 1.3 | 2.6 | 3.8 | 5.1 | 1.3 | 5.1 | 2.6 | 19.2 | |
| | 5 | 70 | 5.7 | 5.7 | 1.4 | 0.0 | 10.0 | 5.7 | 7.1 | 25.7 | |
| | 6 | 42 | 7.1 | 4.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.8 | 2.4 | 14.3 | |
| | 7 | 44 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.3 | 4.5 | 0.0 | 4.5 | 9.1 | |
| Total | | 398 | 3.5 | 2.5 | 1.8 | 2.0 | 6.5 | 3.5 | 4.3 | 20.1 | |

Tabla 22.- Porcentaje de Infección viral en 10 viñedos de la Región Tacna. ^a virus asociado a la hoja enrollada de la vid 1, ^b virus asociado a la hoja enrollada de la vid 2, ^c virus asociado a la hoja enrollada de la vid 3, ^d virus hoja abanicada de la vid, ^e virus estriado clorótico de la vid, ^f virus del mosaico de Arabis y ^g virus de la mancha anillada del tomate.

| Región | N° Viñedos | Total de Plantas analizadas | Muestras positivas, % - TEST DAS ELISA | | | | | | | Infección Total(%) |
|--------|------------|-----------------------------|--|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | | | GLRaV-1 ^a | GLRaV-2 ^b | GLRaV-3 ^c | GFLV ^d | GFkV ^e | ArMV ^f | ToRSV ^g | |
| Tacna | 1 | 35 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.7 | 5.7 | 8.6 | 5.7 | 25.7 |
| | 2 | 60 | 0.0 | 1.7 | 11.7 | 5.0 | 0.0 | 0.0 | 6.7 | 25.0 |
| | 3 | 51 | 0.0 | 2.0 | 2.0 | 3.9 | 7.8 | 5.9 | 0.0 | 15.7 |
| | 4 | 55 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 5.5 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 7.3 |
| | 5 | 78 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 5.1 | 2.6 | 0.0 | 1.3 | 10.3 |
| | 6 | 43 | 2.3 | 2.3 | 7.0 | 4.7 | 20.9 | 2.3 | 0.0 | 32.6 |
| | 7 | 5 | 0.0 | 20.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 20.0 |
| | 8 | 40 | 7.5 | 10.0 | 2.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 20.0 |
| | 9 | 16 | 0.0 | 6.3 | 0.0 | 6.3 | 0.0 | 0.0 | 6.3 | 18.8 |
| | 10 | 14 | 0.0 | 14.3 | 0.0 | 0.0 | 7.1 | 0.0 | 7.1 | 28.6 |
| Total | | 397 | 1.0 | 3.3 | 3.0 | 4.3 | 4.5 | 2.0 | 2.3 | 18.6 |

Los virus que se encontraron con mayor prevalencia (% viñedos afectados), fueron GFkV y GLRaV-2 con 67.9 % y 71.4 %, respectivamente. En nivel inferior se presentó en ArMV con 42.9%. (Tabla 23)

Tabla 23.- Prevalencia Viral (viñedos afectados / total de viñedos colectados)

| Viñedos Infectados % - TEST DAS ELISA | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | GLRaV-1 ^a | GLRaV-2 ^b | GLRaV-3 ^c | GFLV ^d | GFkV ^e | ArMV ^f | ToRSV ^g |
| N° Viñedos Afectados | 15 | 20 | 15 | 16 | 19 | 12 | 14 |
| % | 53.6 | 71.4 | 53.6 | 57.1 | 67.9 | 42.9 | 50.0 |

Se analizó la situación fitosanitaria por regiones, y se determinó el valor de incidencia de cada virus por región. Para la región Ica, los virus con mayor incidencia fueron para GFkV con 9.95% seguido de GLRaV-1 y GLRaV-2, ambos con una incidencia de 3.64% .En la región Arequipa fueron 6.53% para GFkV y 4.27% para ToRSV. Finalmente en la región Tacna, los valores fueron 4.28% para GFLV mientras que GFkV presentó un 4.53%. (Figuras 12, 13,14)

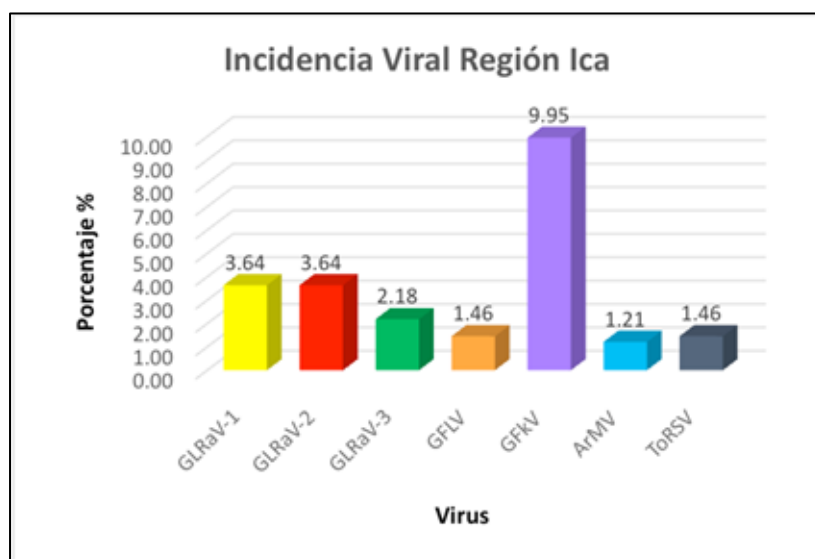


Figura 12.- Incidencia Viral en la Región Ica

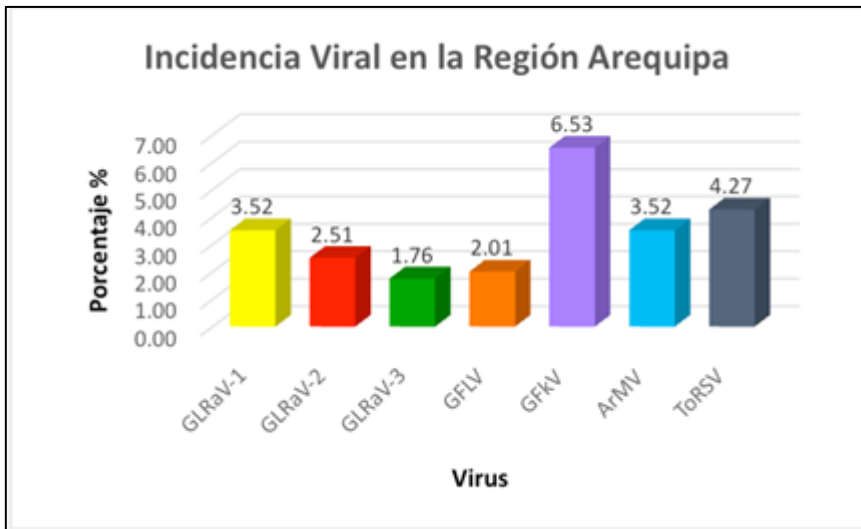


Figura 13.- Incidencia Viral en la Región Arequipa

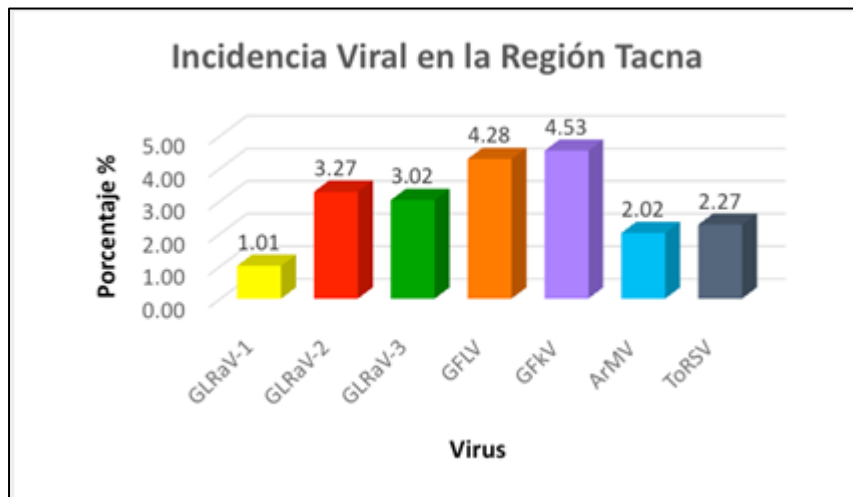


Figura 14.- Incidencia Viral en la Región Tacna

Un análisis individual de cada uno de los virus, en relación al número total de muestras colectadas (en las 3 regiones), indicó que el virus que presentó mayor valor de incidencia fue el virus GFkV con 7.04%, el resto de los virus no superó la barrera del 3.5%. (Tabla 24). Sin embargo, cuando se analizaron los resultados de cada uno de los virus en particular, dentro de cada viñedo, los resultados fueron altamente variables. En algunos campos, los niveles de incidencia, tanto de GFkV como de GLRaV-2, alcanzaron el 27 y 20% de plantas infectadas respectivamente (Tabla 20, 21, 22).

| Virus | TEST DAS-ELISA | | | Total |
|----------------------------|----------------|----------|-------|-------------|
| | Ica | Arequipa | Tacna | |
| % (+) GLRaV-1 ^a | 3.64 | 3.52 | 1.01 | 2.73 |
| % (+) GLRaV-2 ^b | 3.64 | 2.51 | 3.27 | 3.15 |
| % (+) GLRaV-3 ^c | 2.18 | 1.76 | 3.02 | 2.32 |
| % (+) GFLV ^d | 1.46 | 2.01 | 4.28 | 2.57 |
| % (+) GFkV ^e | 9.95 | 6.53 | 4.53 | 7.04 |
| % (+) ArMV ^f | 1.21 | 3.52 | 2.02 | 2.24 |
| % (+) ToRSV ^g | 1.46 | 4.27 | 2.27 | 2.65 |

Tabla 24.- Incidencia Viral en las 3 Regiones

En la tabla 25, se muestra los resultados de incidencia de cada virus, respecto a cada variedad de uvas pisqueras evaluada. La variedad Torontel aparece como la de mayor incidencia viral, con un 29.8% seguido de la variedad Italia con 22.4%. La menos atacada fue la variedad Moscatel (13.6%) cuyas infecciones con los diferentes virus en estudio no superaron el 4.5%. La alta incidencia viral en la variedad Torontel se debe altos niveles de infección con GFkV (12.8%) y con ToRSV (7.4%). La otra variedad que presentó alto grado de incidencia fue Italia,

de manera semejante a la variedad Torontel, mostrando elevada incidencia de GFkV (7.5%).

Tabla 25.- Porcentaje promedios de Infección viral en diferentes variedades de uvas pisqueras de viñedos de las regiones de Ica, Arequipa y Tacna.

| Variedad | Total de Plantas analizadas | Muestras positivas, % - TEST DAS ELISA | | | | | | | Infección Total |
|---------------|-----------------------------|--|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| | | GLRaV-1 ^a | GLRaV-2 ^b | GLRaV-3 ^c | GFLV ^d | GFkV ^e | ArMV ^f | ToRSV ^g | |
| Quebranta | 472 | 3.6 | 2.8 | 2.3 | 2.3 | 8.7 | 1.3 | 1.5 | 19.3 |
| Moscatel | 154 | 0.6 | 1.9 | 1.3 | 1.9 | 1.9 | 4.5 | 3.2 | 13.6 |
| Italia | 255 | 1.2 | 2.0 | 3.5 | 3.9 | 7.5 | 2.4 | 3.9 | 22.4 |
| Negra Criolla | 232 | 3.0 | 4.7 | 1.7 | 3.0 | 4.3 | 1.7 | 1.3 | 17.2 |
| Torontel | 94 | 5.3 | 6.4 | 2.1 | 0.0 | 12.8 | 4.3 | 7.4 | 29.8 |
| Total | 1207 | 2.7 | 3.1 | 2.3 | 2.6 | 7.0 | 2.2 | 2.7 | 19.6 |

7. 2. -Estandarización de la RT-PCR Simple y Múltiple

Una extracción de ARN de alta calidad es esencial para un óptimo desarrollo de la RT-PCR . Los productos de la extracción con CTAB Modificado fueron analizados en un gel de agarosa al 1%, en las condiciones reportadas descritas en la metodología. La extracción de ARN es complicada cuando se utiliza tejido vegetal de vid, debido a que este es rico en compuestos de polifenoles y polisacáridos. Como se observa en la Figura 15, aquellas muestras donde se distinguía las dos bandas 18s y 28 s fueron consideradas una extracción de ARN de buena calidad.

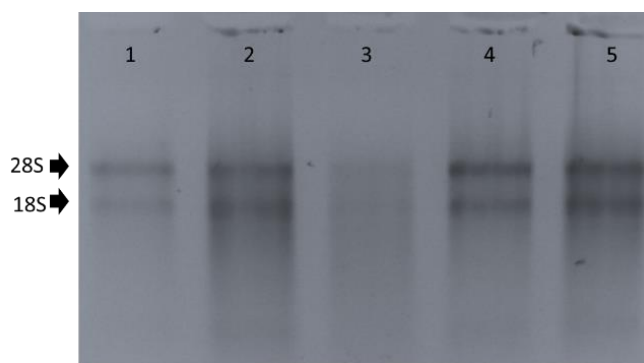


Figura 15. - Extracción de ARN total de muestras control Positivo. Control positivo para el virus GLRaV-2 (carril 1,2); Control Positivo para el virus GFkV (carril 3, 4,5)

Para la detección del virus GFkV por RT-PCR se probaron diferentes temperaturas de hibridación de los cebadores seleccionados desde 49.5°C a 60.5°C, siendo la más óptima la temperatura de 57°C (figura 16A). Teniendo esta temperatura se probaron diferentes concentraciones de MgCl₂ desde 1 hasta 3 mM, obteniéndose en todos los casos una banda bien definida. (Figura 16B). En ambos experimentos se utilizó como muestra un control positivo a la infección al virus GFkV. Finalmente las condiciones para ser usadas en PCR fueron aplicadas usando una temperatura de hibridación para los cebadores de 57°C y una concentración de MgCl₂ de 2mM, en las muestras positivas se obtuvo una amplificación del tamaño esperado de 179 bp, no obteniéndose dicha banda en el control sano. Además se utilizó cebadores para 18S rRNA de vid, como indicador de contar con ARN de calidad (844bp) (Figura 16C).

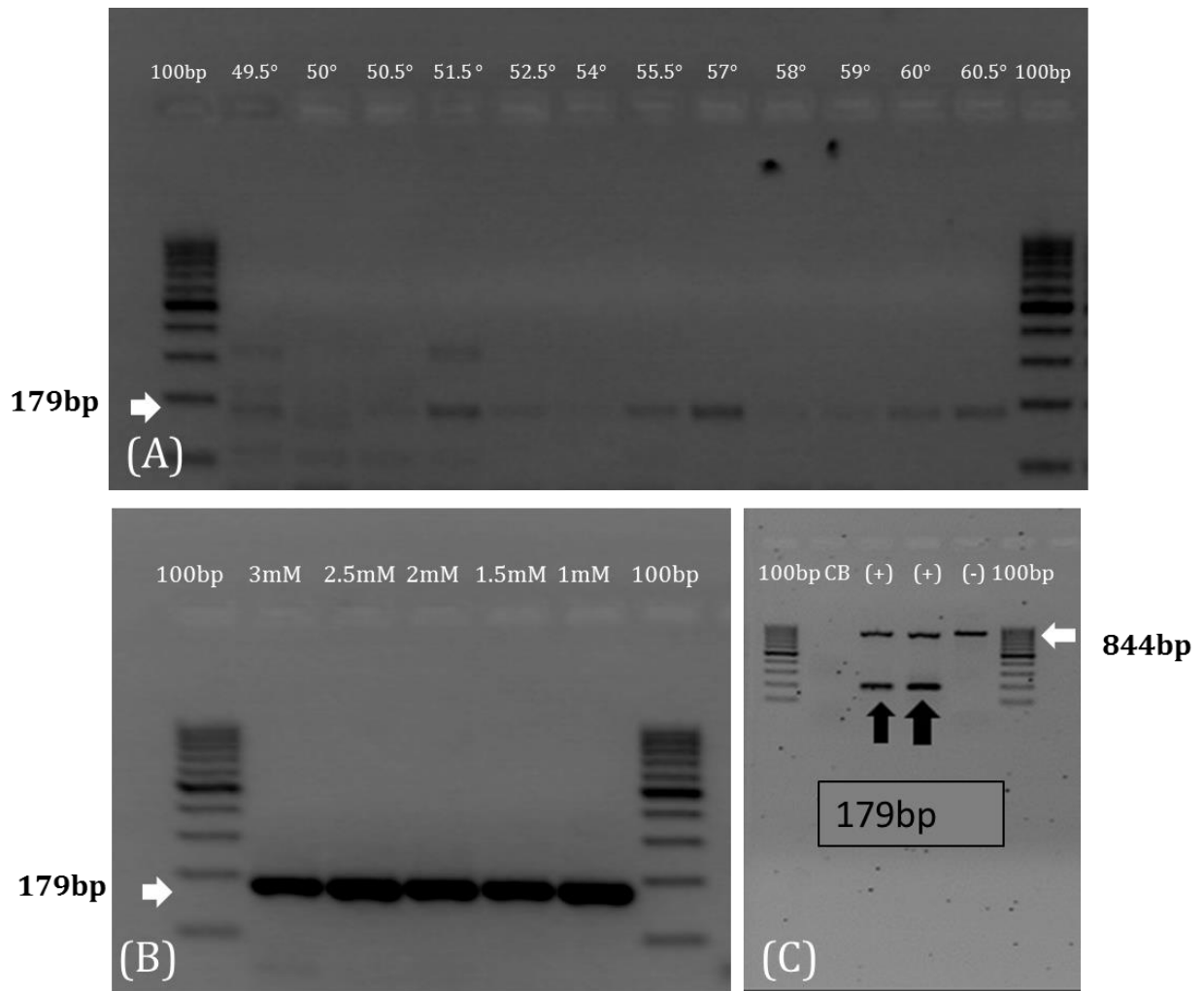


Figura 16.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del GFkV (179bp). **(A)** Gradiente de Temperatura (carril 2 al 13); 100bp DNA Ladder Thermo Scientific. (Carril 1, 14) **(B)** Curva de MgCl₂ (carril 2 al 6); 100bp DNA Ladder (carril 1, 7) **(C)** Amplificación de cDNA con 57° de Temperatura de hibridación y 2mM de concentración de MgCl₂. CB: control blanco (carril 2); (+) Control positivo a la infección a GFkV (carril 3 y 4), (-) Control Negativo (carril 5); 100bp DNA Ladder (carril 1, 6).

Para la detección del segundo virus en estudio, GLRaV-2 por RT-PCR se probaron diferentes temperaturas de hibridación de los cebadores seleccionados para la detección desde 49.5°C a 60.5°C, como se observa en la figura, estos cebadores funcionan de manera óptima en toda la gradiente de temperaturas. (Figura 17). Finalmente se utilizó una temperatura de hibridación de los cebadores de 57°C y la concentración de MgCl₂ de 2 mM. Como resultado se obtuvo las bandas esperadas, en la muestra control positivo se amplificó una banda de 543bp, no obteniéndose dicha banda en el control sano. Además, se utilizó cebadores para el gen 18S rRNA de vid, como indicador de contar con ARN de calidad (844bp) (Figura 18).

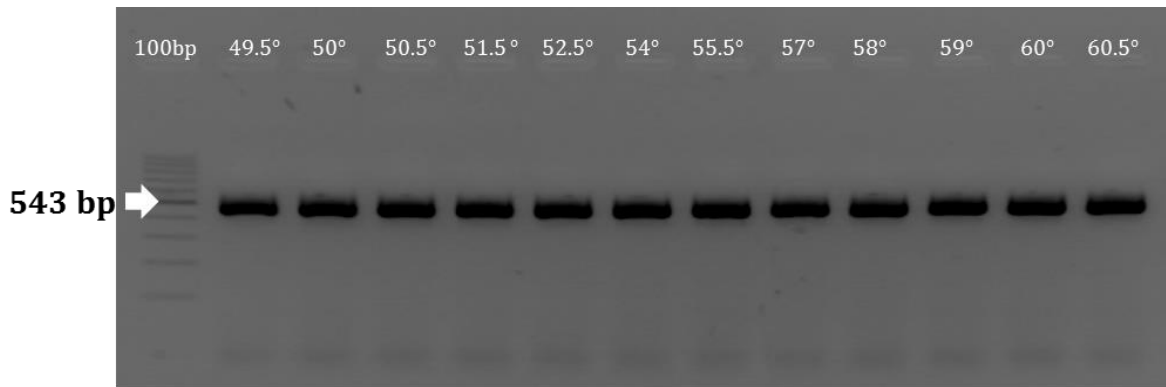


Figura 17. - Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del GLRaV-2 (543bp) con gradiente de temperatura (carril 2 al 13); 100 bp DNA Ladder Thermo Scientific (Carril 1).

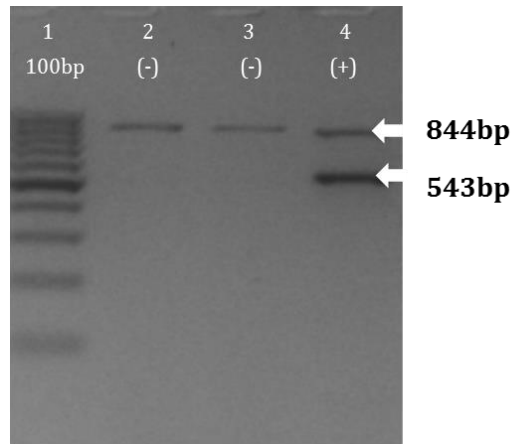


Figura 18. - Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-PCR de los aislados del GLRaV-2 (543bp). Amplificación de cDNA con 57° de Temperatura de hibridación y 2mM de concentración de MgCl₂; (+) Control positivo a la infección a GLRaV-2 (carril 4), (-) Control Negativo (carril 2 y 3); 100 bp DNA Ladder (carril 1).

Una vez evaluados los cebadores para cada patógeno, se realizó una mezcla de dos pares de cebadores, un par por cada patógeno, con la finalidad de estandarizar la PCR múltiple. Se evaluó la combinación de los cebadores a diferentes concentraciones (Tabla 26) utilizando las condiciones establecidas en la PCR simple.

Tabla 26.- Diferentes Concentraciones de los Pares de cebadores.

| Mezcla de Cebadores | Par de Cebador | Concentración Final |
|---------------------|----------------|---------------------|
| M1 | GLRaV-2 | 0.8uM |
| | GFkV | 0.4uM |
| M2 | GLRaV-2 | 0.6uM |
| | GFkV | 0.6uM |
| M3 | GLRaV-2 | 0.5uM |
| | GFkV | 0.7uM |
| M4 | GLRaV-2 | 0.4uM |
| | GFkV | 0.8uM |
| M5 | GLRaV-2 | 0.3uM |
| | GFkV | 0.8uM |

Se utilizó 3 tipos de muestra para la estandarización: control positivo a la infección a GFkV, control positivo a la infección GLRaV-2 y un control positivo a la infección de ambos patógenos. Como se observa en la figura cuando se utiliza ambos cebadores y en diferentes concentraciones ambos virus pueden ser detectados. Los resultados correspondieron con lo esperado: en el control positivo a la infección doble se amplificó ambas bandas (170bp y 543bp), el control positivo de GFkV y GLRaV-2 solo amplificó las bandas de 170 bp y 543 bp respectivamente (Figura 19).

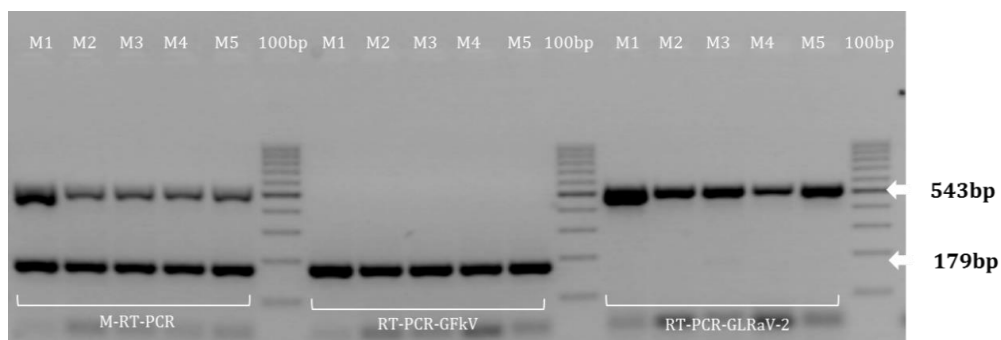


Figura 19. - Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la Múltiple RT-PCR, amplificación de cDNA con 57° de Temperatura de hibridación y 2mM de concentración de $MgCl_2$. (+) Control positivo a la infección múltiple (carril 1 al 5), (+) Control positivo a la infección a GFkV (carril 7 y 11), (+) Control positivo a la infección a GLRaV- 2 (carril 13 al 17), 100 bp DNA Ladder (carril 6, 12, 18). La concentraciones de los cebadores : M1- Mezcla 1 (carril 2, 7, 13), M2-Mezcla 2 (carril 3, 8, 14), M3-Mezcla 3 (carril 4, 9, 15), M4-Mezcla 4 (carril 5, 10, 16), M5-Mezcla 5 (carril 6, 11, 17).

Encontramos que el uso de estos dos pares de cebadores no afectó el límite de detección del RT-PCR Múltiple. Ambos cebadores amplifican sus objetivos sin ninguna competencia obvia o interferencia.

7.3.-Estandarización de la IC-RT-PCR Simple y Múltiple

El ensayo de IC- RT- PCR simple se desarrolló con éxito para la detección de GFkV y GLRaV-2 con los controles positivos a la infección, se observa en las gráficas la presencia de bandas como tamaños esperados de 179bp y de 543 bp respectivamente. Con respecto a la detección IC-RT-PCR múltiple también se ensayó con éxito, se detectó simultáneamente ambos virus. Cuando se llevó a cabo la etapa de Múltiple RT-PCR de la prueba en un tubo se observaron las bandas esperadas de 179 bp y 543bp en aquellas muestras infectadas por ambos virus. (Fig. 20 y 21)

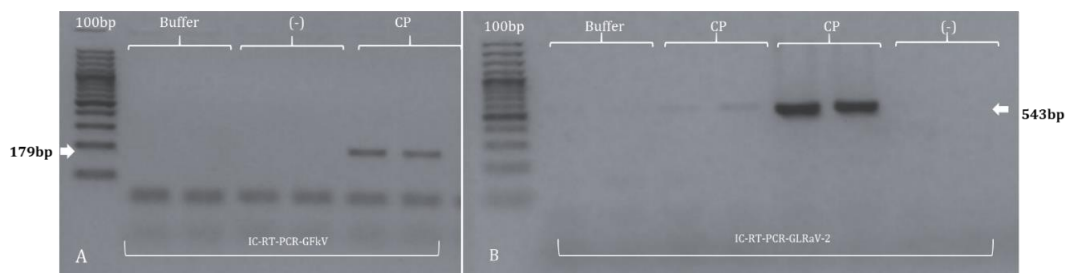


Figura 20. - Electroforesis en gel de agarosa de los productos de IC- RT-PCR. (A) IC- RT-PCR para el virus GFkV: Buffer (carril 2 y 3), Control Negativo (Carril 4 y 5), Control Positivo (carril 6 y 7), 100bp DNA Ladder (carril 1). (B) IC- RT-PCR para el virus GLRaV-2: Buffer (carril 2 y 3), Control Negativo (Carril 8 y 9), Control Positivo (carril 4, 5, 6, 7); 100 bp DNA Ladder (carril 1)

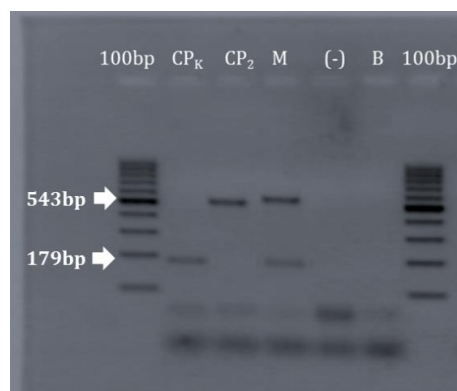


Figura 21.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos de Múltiple IC- RT-PCR. CP_K Control positivo del virus GFkV (carril 2). CP₂ Control positivo del virus GLRaV-2 (carril 3), M - Muestra positiva para la infección de ambos virus (carril 4), (-) Control Negativo (Carril 5), B control blanco (carril 6), 100 bp DNA Ladder (carril 1 y 7).

7.4.-Sensibilidad y especificidad

Para confirmar el rendimiento superior del M-IC- RT -PCR y M- RT-PCR en la detección de GFkV y GLRaV-2 en vid y comprobar su utilidad se evaluó a partir de plantas sanas o infectadas colectadas en campo durante las prospecciones. Se utilizó un total de 73 muestras para la detección del virus GFkV y 71 muestras para la detección del virus GLRaV-2. (Anexo 7, 8).

En las tablas 27 y 28 se muestra un análisis comparativo de los resultados obtenidos a partir de los ensayos de ELISA y PCR para la detección de GFkV. Se obtuvo una aparente correlación entre los resultados de la prueba ELISA e M-IC-RT -PCR, todas las muestras que eran positivas por ELISA fueron también positivas por M- IC- RT- PCR. La RT- PCR detectó el virus en 78,08%, confirmando un aumento de la sensibilidad, en comparación con la prueba de ELISA. A diferencia del método M- IC- RTPCR que detectó el virus en el 61. 64 % de las muestras.

Tabla 27.- Resultados obtenidos por DAS-ELISA, M-RT-PCR y M-IC-RT-PCR para la detección del virus GFkV

| Resultado | Detección del Virus GFkV ^a | | |
|---------------------|---------------------------------------|----------|-------------|
| | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
| %Muestras Positivas | 30.14 | 78.08 | 61.64 |
| %Muestras Negativas | 69.86 | 21.92 | 38.36 |

Tabla 28.- Detección de GFkV en muestras de hoja de campo por M-RT-PCR, M- IC-RT-PCR y DAS-ELISA

| N° Muestras | Detección del Virus GFkV ^a | | |
|-------------|---------------------------------------|----------|-------------|
| | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
| 19 | + | + | + |
| 6 | - | - | - |
| 22 | - | + | - |
| 16 | - | + | + |
| 3 | + | - | + |
| 7 | - | - | + |

Finalmente en las tablas 29 y 30 se compara los resultados obtenidos a partir de los ensayos de ELISA y PCR para la detección de GLRaV-2. También se obtuvo una aparente correlación entre los resultados de la prueba ELISA e M-IC- RT – PCR, todas las muestras que eran positivas por ELISA fueron también positivas por M- IC- RT- PCR. La M-RT- PCR detectó el virus en 43,66%, confirmando un aumento de la sensibilidad, en comparación con la prueba de ELISA. Sin embargo, el M-IC- RTPCR método detectó el virus en el 50, 70 % de las muestras.

Tabla 29.-Resultados obtenidos por DAS-ELISA, M-RT-PCR y M-IC-RT-PCR para la detección del virus GLRaV-2

| Resultado | Detección del Virus GLRaV-2 | | |
|---------------------|-----------------------------|----------|-------------|
| | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
| %Muestras Positivas | 28.17 | 43.66 | 50.70 |
| %Muestras Negativas | 71.83 | 56.34 | 49.30 |

Tabla 30.-Detección de GLRaV-2 en muestras de hoja de campo por M- RT-PCR, M-IC-RT-PCR y DAS-ELISA

| N° Muestras | Detección del Virus GLRaV-2 | | |
|-------------|-----------------------------|----------|-------------|
| | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
| 14 | + | + | + |
| 34 | - | - | - |
| 1 | - | + | - |
| 16 | - | + | + |
| 6 | + | - | + |

Para evaluar la especificidad del PCR se enviaron a secuenciar un total de 16 productos de PCR del gen de la proteína de cubierta del virus GFkV , las secuencias obtenidas fueron confrontadas con la base de datos GenBank empleando el algoritmo Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) con un porcentaje de identidad mayor a 94% con diferentes aislados del gen de la proteína de cubierta del virus GFkV reportados N° accesión: JN133934.1, JN133957.1, HQ688989.1, JN022610.1, HE649964.1, AJ309022.1; KT946647.1 Se confirma que estos 16 aislados pertenecen a este virus (Anexo 09).

Para el caso de los productos de PCR del gen de proteína de cubierta del virus GLRaV-2 se determinó el envío de 7 productos; las secuencias obtenidas fueron confrontadas con la base de datos GenBank empleando el algoritmo Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) con un porcentaje de identidad mayor a 99% con diferentes aislados del gen de la proteína de cubierta del virus GLRaV-2 reportados N° accesión: KF007286.1, KP704564.1 , HM185277.1, HQ162289.1 .Se confirma que estos 7 aislados pertenecen a este virus (Anexo 10).

La sensibilidad del M-IC-RT-PCR se comparó con la de DAS-ELISA y M-RT-PCR. Los resultados muestran que ambos virus (GFkV y GLRaV-2) se pueden detectar en muestras infectadas con una dilución hasta al menos 10^{-4} . Esto constituye unas 10, 000 veces mejor en comparación con el ensayo de DAS-ELISA, que sólo produjo lecturas positivas para la muestra sin diluir para ambos virus (Figura 22 y 23). Cuando se compara M - IC- RT- PCR con el procedimiento M-RT- PCR, con M-RT-PCR solamente se logra la detección de ambos virus a la dilución 10^{-2} (Figura 24-Izquierda), mientras que el IC- RT- PCR produjo bandas esperadas en todas las diluciones (Figura 24-Derecha).

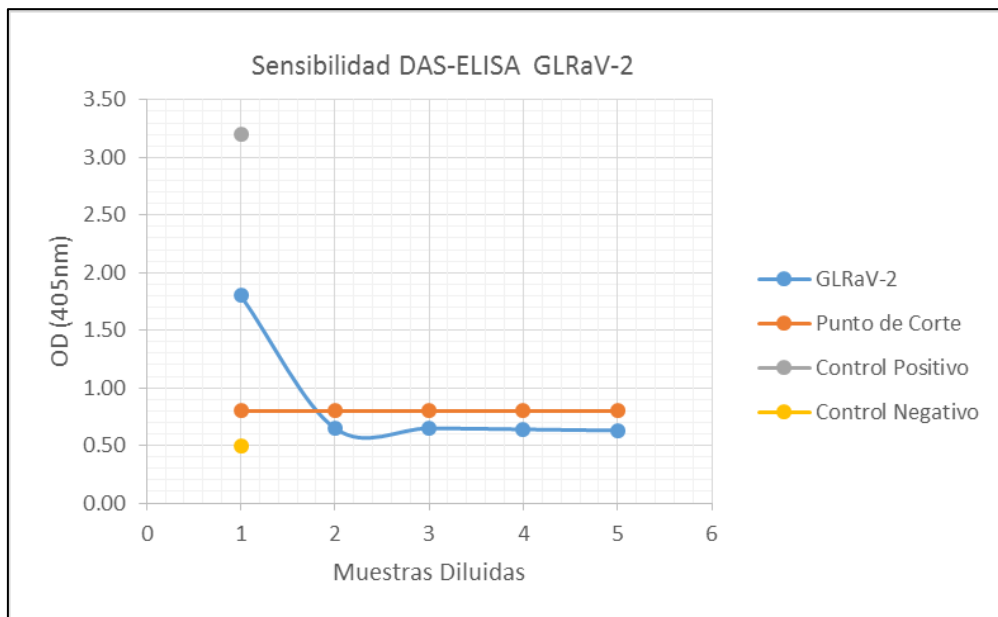


Figura 22.- Sensibilidad de DAS-ELISA para la detección del virus GLRaV-2. 1: Muestra no diluida, 2: Dilución 10^{-1} , 3: Dilución 10^{-2} , 4: Dilución 10^{-3} , 5: Dilución 10^{-4}

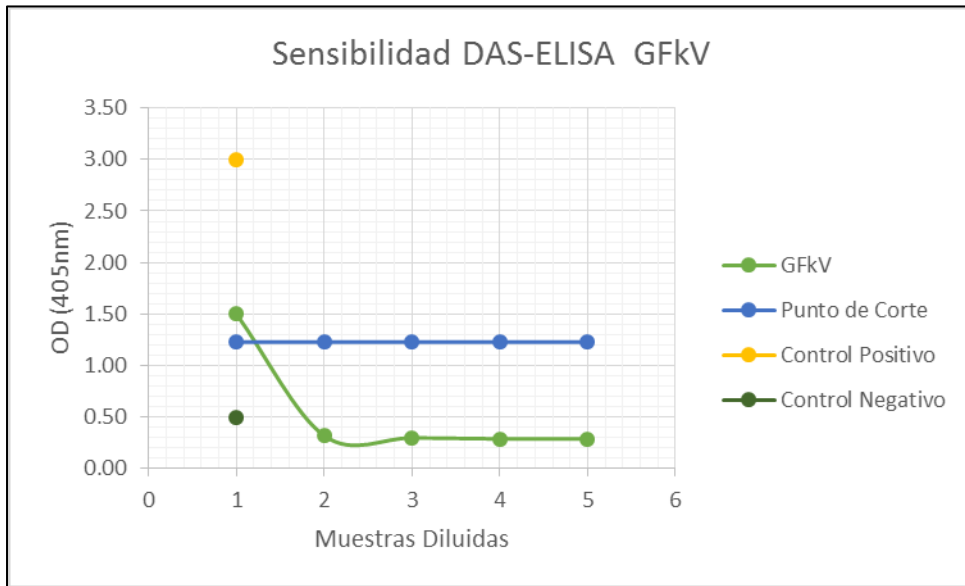


Figura 23.-Sensibilidad de DAS-ELISA para la detección del virus GFkV. 1: Muestra no diluida, 2: Dilución 10^{-1} , 3: Dilución 10^{-2} , 4: Dilución 10^{-3} , 5: Dilución 10^{-4}

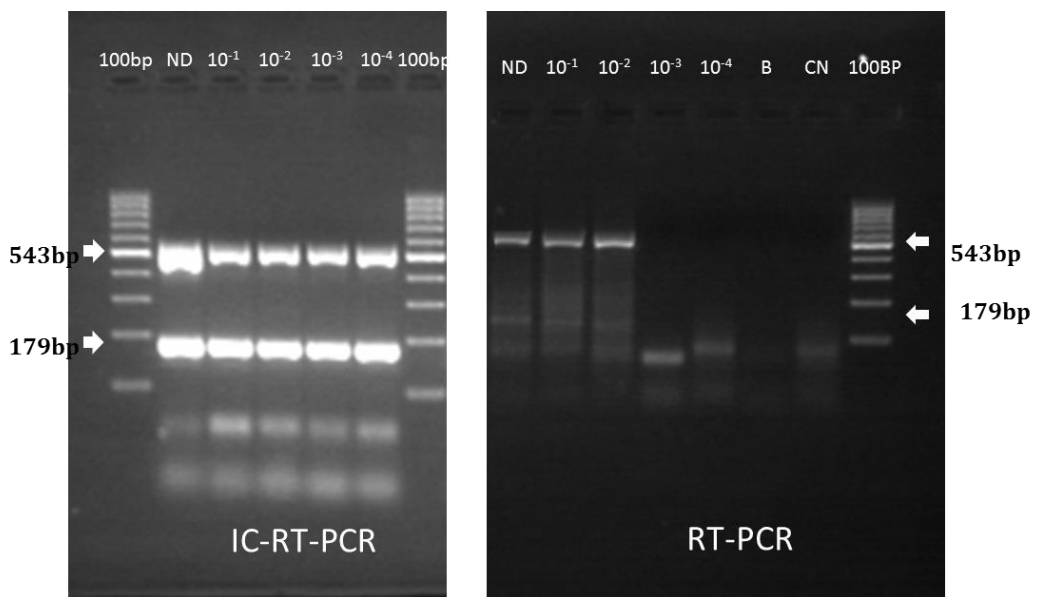


Figura 24. - Sensibilidad de detección de GFkV y GLRaV-2 usando IC- RT-PCR e RT-PCR. ND: no dilución; Diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} : Dilución serial de extractos de planta infectada con los virus GFkV y GLRaV-2; 100bp DNA Ladder.

VIII. –DISCUSIÓN

Se sabe que las infecciones virales afectan el desarrollo de la planta y la calidad de producción de las mismas. (Walter y Martelli ,1996; Pérez *et al.*, 2000; Gambino *et al.*, 2014). Desde hace varias décadas, a nivel mundial se han reportado innumerables virus que afectan la vid, y se ha identificado alrededor de 60 virus diferentes. Este listado crece año tras año debido al constante desarrollo y optimización de las técnicas de detección de estos patógenos (Martelli, 2014). No obstante, se han encontrado que solo algunos de ellos tienen prevalencia en las diferentes regiones donde se cultivan. El primer paso antes de estandarizar los protocolos de diagnóstico viral con técnicas moleculares (RT-PCR e IC-RT-PCR) era tener un panorama general de la situación fitosanitaria actual en los principales viñedos productores de las uvas pisqueras en el Perú, utilizando como prueba tradicional el diagnóstico por DAS ELISA para 7 virus de importancia mundial (GFkV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, ToRSV, ArMV). El presente trabajo de investigación es el primer reporte de un extenso estudio sobre incidencia, prevalencia y distribución de estos virus en las regiones principales zonas de denominación de origen del Pisco. Se incluyeron 1207 muestras tomadas al azar pertenecientes 28 viñedos, los datos obtenidos muestran un porcentaje promedio de infecciones virales de 19.5% (Tabla 17). Además se determinó que la mayoría de estas infecciones son simples con 85.54%, 87.50%, 91.89% para Ica, Arequipa y Tacna respectivamente (Tabla 18), pero no se descarta la presencia de otros virus no evaluados en este estudio. Los resultados expuestos permiten dimensionar la situación virológica de las uvas pisqueras en el Perú, comprobando que los virus de la vid más importantes en el mundo están presentes en nuestras

localidades, con mayor o menor incidencia, dependiendo principalmente del origen del material propagado. El agricultor utiliza una tecnología tradicional: recurre a material de propagación de viñedos existentes sin criterio técnico o sanitario (MINCETUR, 2004). Y en el caso que tenga acceso de utilizar material proveniente de los viveros, estos solo pueden acreditar que el material es obtenido de plantas madre vigorosas y aparentemente libres de enfermedades, sobre la base de una inspección visual. Esto se ve reflejado en los resultados de la incidencia viral en viñedos, con una variación entre ellos y dentro del mismo viñedo, en los diferentes virus de estudio. (Tablas 20, 21, 22). Al analizar los resultados por viñedo, se observó una heterogeneidad con respecto a los porcentajes de incidencia viral que va desde 0% hasta 36.5%. Esta heterogeneidad en los porcentajes de infecciones virales en los diferentes viñedos estaría estrechamente relacionada al modo de transmisión viral. Si es una transmisión vertical (sobre todo la multiplicación vegetativa) o producto de una transmisión horizontal por vectores o por prácticas agrícolas como la poda (Mims, 1981) En el caso de viñedos vecinos donde existe la presencia de determinado virus en un viñedo y la ausencia en el otro, hace sugerir que la infección fue producto de una transmisión vertical, el material derivó de plantas madres infectadas ya que la transmisión por vectores no parecía posible.

Con los datos obtenidos se confirma la presencia de 5 virus (GFkV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 y ToRSV) ya reportados en nuestro país en anteriores trabajos: Castillo (1973) reportó la presencia de GFLV en los valles de Ica, Chincha, Cañete, Mala y Lima; por su parte Fribourg (2007) reportó 4 virus que atacan variedades de vid pisqueras y no pisqueras como son GFkV, GFLV, GRLV

y ToRSV. Y finalmente Tenorio *et al* (2009) realizó una evaluación para los virus GFkV, GFLV, GLRaV-1 y GLRaV-3 en los principales fundos y viveros de uvas pisqueras de la Región Ica. Con respecto a este último estudio se coincide acerca de que el virus de mayor incidencia en plantaciones de vides en producción en la zona de Ica sigue siendo GFkV. Con respecto a los virus GLRaV-2 y ArMV este estudio es el primero en evidenciar la presencia de éstos en viñedos de uvas pisqueras en el Perú.

GFkV fue el virus con mayor tasa de incidencia (Tabla 24) y uno de los más prevalentes. Se obtuvo un tasa de infección total de 7.04% y se encontró en 19 viñedos de los 28 evaluados (Tabla 23). La razón de su prevalencia se debe probablemente a que al parecer plantas aparentemente sanas pueden estar infectadas por este virus, y son utilizados para la propagación. De hecho, GFkV es un virus transmisible por injerto que es generalmente latente y asintomático en cultivos de *Vitis vinifera* y en la mayoría de portainjertos americanos; sólo en *Vitis rupestris* muestra síntomas de enfermedad. En los resultados también se observó algunas combinaciones virales de GFkV: GLRaV-3 + GFkV, GFkV + GFLV, GLRaV-2 + GFkV, GFkV + ArMV, GLRaV-1 + GFkV + ArMV, GLRaV-1 + GFkV) (Tabla 19). Aunque el impacto de GFkV es incierto, la presencia de GFkV con virus asociados podría contribuir a la pérdida en la calidad y rendimiento de los frutos, y del material de propagación. Algunas investigaciones comparativas en vid mostraron una influencia negativa de la presencia GFkV en los procesos de propagación *in vivo* e *in vitro*, en el vigor de la planta, la calidad de la madera y en parámetros agronómicos y enológicos (Credi y Babini, 1996; Vişoiu *et al.*, 2000).

El segundo virus de importancia fue el virus GLRaV-2 con una prevalencia de 71.4% (la más alta en nuestros resultados) y una incidencia de 3.15% (Tablas 23 y 24). Este virus es uno de los más distribuidos en las distintas zonas donde se cultiva la vid, tanto en la uva de mesa como en la uva para vino (Martelli *et al.*, 2005; Maliogka *et al.*, 2008; Alkowni *et al.*, 2011).

Las cepas de GLRaV-2 son fuertes inductores de síntomas de enrollamiento de la hoja de la vid, se le ha asociado con uno de los principales daños en vid: la muerte de plantas por incompatibilidad en el punto de injerto, específicamente la cepa GLRaV-2R. Por ende es un virus de suma importancia.

Los dos virus encontrados y considerados los más importantes GFkV y GLRaV-2 tienen una característica particular es que no hay vectores reportados para la transmisión de este virus (Constable *et al.*, 2012; Maliogka *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha encontrado en todos los países productores de vid del mundo (Martelli *et al.*, 2006). La prevalencia del virus es muy alta, tanto en infecciones simples y múltiples con otros peligrosos virus (Cretazzo *et al.*, 2010; Komínek, 2008).

Con respecto a la incidencia de los demás virus de vid: GLRaV-1, ToRSV, GFLV, GLRaV-3, ArMV fue menor al 3% (Tabla 24). Este resultado puede estar relacionado con el control de sus vectores, ya que se sabe que los nemátodos son transmisores del grupo de *Nepovirus* (GFLV, ToRSV, ArMV). En la actualidad en el Perú, existe un control de nemátodos en los diferentes viñedos a través del control de malezas y el control químico. Adicionalmente en el mercado local, están disponibles portainjertos de vides resistentes a nemátodos, lo que da como

consecuencia un mejor control a la infección de estos virus de manera indirecta. Por otro lado Fribourg (2007) reportó que en el caso de GFLV, su vector de transmisión *Xiphinema index* está ausente en los diferentes viñedos peruanos. Aunque este virus también puede ser transmitido por inoculaciones mecánicas, polen o semillas se considera al material vegetal de propagación infectado y a la presencia de su vector como los medios más importantes y eficaces de transmisión de este virus (Martelli, 1993). Con respecto a los virus GLRaV se tiene muy poca información acerca de sus vectores. Por ende, aún faltan estudios acerca de la distribución actual de los vectores en los diferentes viñedos para así complementar y entender la distribución viral en las diferentes regiones evaluadas.

Cuando se evalúa el impacto de la incidencia viral con respecto a las variedades pisqueras se observa que la variedad Torontel e Italia tienen los más altos porcentajes de infección viral, información sobre los impactos negativos de virus en nuestras variedades pisqueras es desconocida (Tabla 25). Los impactos negativos de diferentes virus en diferentes cultivos extranjeros ya están siendo reportados (Walter y Martelli, 1996; Golino *et al.*, 2009; Legorburu *et al.*, 2009). Se han encontrado por ejemplo que los virus de enrollamiento estarían afectando seriamente las características del mosto, disminuyendo su contenido de azúcar y aumentando su acidez (Martelli *et al.*, 1993). Por otro lado se tiene algunos indicios de que la infección viral podría afectar la calidad de sus productos finales. En el caso del vino, un reporte realizado en el 2006 mostró que la infección viral con el virus GLRaV-3 disminuye el porcentaje de azúcar en las uvas que se usan para la elaboración de Vino Blanco de Sauvignon. Así mismo, Vega *et al.* (2011) indicaron que la infección viral con ese mismo virus en *V. vinifera* afectaría el

desarrollo del fruto, desarrollando una maduración incompleta, pero no se tiene un análisis final sobre la calidad en sí del vino producido con tales uvas infectadas. Por todo ello, es necesario determinar el impacto de las infecciones virales sobre las variedades pisqueras, evaluar características agronómicas (morfología y la fisiología) para identificar si existen anomalías en los principales órganos de una planta infectada. Según las evidencias en otras variedades se podría suponer que las infecciones por virus en uvas pisqueras tendrían efectos negativos en la productividad y calidad del fruto, y por ende incidiría negativamente en la calidad del producto final (Pisco).

Un método de diagnóstico fiable de patógenos de plantas requiere alta sensibilidad y especificidad, especialmente cuando se utiliza para determinar el estatus sanitario de material vegetal que se propagan vegetativamente (Martelli, 1999). El objetivo principal de esta tesis fue desarrollar una técnica simple, rápida, específica y sensible que permita procesar grandes cantidades de muestras para facilitar los estudios de detección viral de los principales virus que afectan las variedades pisqueras de uva.

A pesar que el ELISA se utiliza habitualmente para la detección de virus de plantas, se ha demostrado que carece de sensibilidad para la detección de virus en muy baja concentración. En un intento de superar este problema, se han desarrollado muchas pruebas moleculares y cebadores para amplificación del ácido nucleico mediante PCR para varios virus de vid como *nepovirus* (Martelli, 1993), *closterovirus* (Martelli *et al.*, 1997), *vitiviruses* (Boscia *et al.*, 1997) y GFkV (Sabanadzovic *et al.*, 1996).

Por ende en este trabajo se detectó la presencia de los genes de la proteína de cubierta de los virus GFkV y GLRaV-2 en una sola reacción ahorrando tiempo, costos y trabajo. Los productos de PCR múltiple fueron del tamaño esperado tanto en los controles positivos de cada virus o en la mezcla artificial, sin interferencias (Figura 19). Además, como se ha reportado en los diferentes estudios sobre infecciones virales, existe alta incidencia de encontrar infecciones virales múltiples, debido a una acumulación de virus en los ciclos sucesivos de la planta, es por ello que es necesario estandarizar un sistema de diagnóstico PCR múltiple, que permita la detección simultánea y sensible de los diferentes objetivos de ARN blanco en una sola reacción. En la actualidad este método es útil en virología vegetal, existen varios ejemplos de detección simultánea de varios ARN virales blanco (Minafra y Hadidi, 1994; Nemichov *et al.*, 1995; Jacobi *et al.*, 1998; Sharman *et al.*, 2000)

Por otro lado una de las desventajas de RT-PCR convencional radica en el paso inicial de la extracción de ARN, aunque existen diferentes procedimientos para realizar una adecuada extracción, estos son muy costosos al momento de analizar un buen número de muestras. En muchos trabajos se ha demostrado que los virus inmovilizados (La Notte *et al.*, 1997; Olmos *et al.*, 1996; Rowhani *et al.*, 1995) aumentarían la eficiencia del RT-PCR, por ello la Inmunocaptura RT-PCR se ha demostrado ser más sensible que el DAS-ELISA y RT-PCR para la detección de ARN viral en plantas infectadas (Acheche *et al.*, 1999).

Jansen *et al.* (1990) desarrolló la técnica de IC-RT-PCR donde los procedimientos de inmunocaptura del virus, síntesis de ADNc y la amplificación de ADNc viral por PCR fueron llevados a cabo en un solo tubo de polipropileno. En este caso se

adaptó la inmunocaptura de los viriones de GLRaV-2 y GFkV en una placa de microtitulación de polipropileno como ya se ha descrito en otros estudios (Nolasco *et al.*, 1993), con el fin de simplificar los pasos de lavado. Sin embargo, la etapa de amplificación se llevó a cabo en tiras de 8 pocillos para PCR. A fin de evitar la contaminación cruzada entre los pocillos, se utilizó las columnas impares de cada placa de microtitulación. Por otro lado, para eliminar la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR, se siguió el procedimiento de Jansen *et al.* (1990) en el que los pocillos se lavaron seis veces después de la incubación con la muestra. Bajo estas condiciones, la simplicidad de la técnica y el ahorro de tiempo, podría ser aplicable al diagnóstico de rutina en forma apropiada en laboratorios equipados. El ensayo de IC -RT-PCR para la detección de virus de GFkV y GLRaV-2 en tejidos de vid fue óptimo tanto para la detección individual como para la detección múltiple. (Figura 21)

Con respecto al análisis de las 3 técnicas diagnóstico utilizando muestras de campo. Se obtuvo una buena correlación entre los resultados de los ensayos de ELISA e IC-PCR en la detección de ambos virus. Todas las muestras que eran positivas por ELISA (30. 14% para GFkV y 28. 17% para GLRaV-2) fueron también positivas por IC-RT-PCR. Hubo algunas excepciones donde M-RT-PCR no detectó la presencia de estos virus (Tabla 28 y 30). Esto quizás se deba a que durante el proceso de extracción del ARN, las sustancias inhibitorias no fueron completamente eliminadas y estarían interfiriendo con la etapa de amplificación, inhibiendo la acción de la enzima ADN polimerasa (Taq). En el caso específico de vid, este tiene una alta presencia de los siguientes compuestos: polisacáridos, fenólicos y metabolitos secundarios. Los compuestos fenólicos se unen a

proteínas y a los ácidos nucleicos para formar complejos de alto peso molecular; adicionalmente los polisacáridos tienden a co-precipitar con el ARN en presencia de alcoholes, permaneciendo como contaminantes. (Salzmann *et al.*, 1999). Estos pudieron haber tenido un efecto en la integridad del ácido ribonucleico, disminuyendo y facilitando su posterior degradación (Cocolin *et al.*, 2003).

En términos generales para la detección del virus GLRaV-2, M- RT-PCR obtuvo un porcentaje de muestras positivas de 43.66% y M-IC-RT-PCR alcanzó un 50.7% de muestras positivas. Con respecto a la detección de infecciones del virus GFkV, con M-RT PCR se obtuvo un 78.08% y M-IC-RT-PCR un 61.64 % de muestras positivas (Tabla 27 y 29). Al analizar con más detalle estos resultados (Tabla 28 y 30) se ha observado que en algunos casos se presentó falsos negativos de la infección con M-IC-RT-PCR, en este caso quizás la inhibición se dio por la presencia de ribonucleasas, como el contenido de ARN es muy pequeño, estas enzimas pueden haberse mantenido degradando al ARN target.

Con estos datos, se identificó falsos negativos de la prueba DAS- ELISA. Se comprueba que las técnicas moleculares son más sensibles que DAS-ELISA en muestras de campo.

Como se describió en los resultados (tabla 28 y 30) se obtuvo 57 y 31 muestras positivas para el virus GFkV y GLRaV-2 por M-RT-PCR. Estas muestras fueron utilizadas para evaluar la especificidad de los cebadores y descartar que dichas muestras fueran falsos positivos, por razones de presupuesto no se pudo enviar las 88 muestras a secuenciar por ende se calculó un número de muestras mínima (productos de PCR) los cuales fueron secuenciados utilizando el programa online

Raosoft Simple Size Calculator (Raosoft, 2004). Se obtuvieron 16 secuencias consenso de los productos de PCR del gen de proteína de cubierta del virus GFkV, al ser confrontadas con la base de datos Genbank empleando el algoritmo Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se obtuvo un porcentaje de identidad mayor a 94% con los diferentes aislados del gen reportados. Además se tenía información fitosanitaria viral de las muestras, de donde provenían estas 16 secuencias, 6 de ellas provenían de muestras que tienen otro tipo de infección viral con GLRaV-1, GLRaV-2, GFLV, RSP (Tabla) y 10 secuencias provenían de muestras que solo mostraron infección con GFkV. Con el porcentaje de identidad con los aislados reportados y la información fitosanitaria se comprueba la especificidad de los cebadores utilizados para la detección del virus GFkV, descartando una reacción cruzada con otros virus.

Para el caso de los productos de PCR del gen de proteína de cubierta del virus GLRaV-2 se obtuvieron 7 secuencias al ser confrontadas con la base de datos Genbank empleando el algoritmo Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se obtuvo un porcentaje de identidad mayor a 99% con los diferentes aislados del gen reportados. Además se tenía información fitosanitaria viral de las muestras donde provenían estas 7 secuencias, 4 de ellas provenían de muestras que tienen otro tipo de infección viral con GLRaV-1, GFkV, ToRSV (Tabla) y 3 secuencias provenían de muestras que solo mostraron infección con GLRaV-2. Con el porcentaje de identidad con los aislados reportados y la información fitosanitaria se comprueba la especificidad de los cebadores utilizados para la detección del virus GLRaV - 2, descartando una reacción cruzada con otros virus o la presencia de falsos positivos.

Se evaluó la sensibilidad de las tres técnicas de diagnóstico para el diagnóstico de infección múltiple con GFkV y GLRaV-2, para ello se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-4} de los extractos de planta. La prueba M-IC-RT-PCR descrita en este documento es al menos 10 000 veces más sensible que DAS-ELISA, (Figura 22 y 23) y 100 veces más sensible que el M-RT-PCR (Figura 24). A diferencia de M-RT-PCR que solo fue 100 veces más sensible que DAS-ELISA. En términos generales se determinó que ambas técnicas moleculares son más sensibles que DAS-ELISA. Una de las limitantes para este análisis es que no se determinó el umbral de detección con respecto a la concentración de partículas de viriones tanto de GFkV como de GLRaV-2. Se han hecho otros estudios contrastando el umbral de detección del virus con diferentes métodos de diagnóstico por ejemplo en la detección del virus PVY de la Papa. Se encontró que tanto IC RT-PCR, RT-PCR y DAS-ELISA tenían diferentes sensibilidades. Ambas técnicas moleculares (IC RT-PCR, RT-PCR) podían detectar aproximadamente una concentración de 1pg de particulares virales. A diferencia de DAS-ELISA que tenía como límite de detección 10ng. (Gawande *et al.*, 2011) como se muestra en la siguiente figura:

| Metodo | Límite de detección | Sensibilidad | Volumen de la muestra |
|-----------|---------------------|--------------|-----------------------|
| RT-PCR | 1pg | 10^{-4} | 10ul |
| IC-RT-PCR | 1pg | 10^{-5} | 100ul |
| DAS-ELISA | 10ng | 10^{-2} | 100ul |

Con todo ello se demuestra que la técnica de IC-RT-PCR mejora la sensibilidad y especificidad cuando se compara con los sistemas de ELISA usados actualmente (i) alta sensibilidad debido al enriquecimiento inicial de viriones inmunocapturados paso seguido de la amplificación PCR; (ii) alta especificidad debido a la combinación de virus capturados por los anticuerpos específicos y la especificidad cebador; y (iii) la detección de virus directamente con los extractos en crudo de la planta en lugar realizar una purificado.

En la presente tesis se estandarizó la detección de IC-RT-PCR Y RT-PCR para el diagnóstico de los virus GFkV y GLRaV-2, se demostró que dichas técnicas superan a DAS-ELISA en sensibilidad y especificidad. Así mismo, los resultados muestran el primer reporte acerca de distribución, incidencia y prevalencia de 7 virus de importancia mundial en las principales zonas productoras de uvas pisqueras de las regiones de Ica, Arequipa y Tacna.

IX.-CONCLUSIONES

- La evaluación fitosanitaria de infecciones virales en variedades pisqueras de las regiones de Ica, Arequipa y Tacna con el análisis serológico DAS-ELISA evidencia un porcentaje promedio de infección virosa en plantaciones de vides en producción de 19.63 %
- Se determinó la incidencia viral total por virus en las 3 regiones de 7.04% para GFkV ; 3.15% para GLRaV-2; 2.73 % para GLRaV-1; para ToRSV 2.65% ; para GFLV 2.57% ; para GLVaR-3 2,32% ; y finalmente para ArMV de 2.24%.
- El virus de mayor incidencia fue el GFkV con 7.04% y el virus de mayor prevalencia fue GLRaV-2 con un 71.4%, siendo estos dos virus considerados los más importantes.
- Se ha detectado por primera vez en Perú la presencia de los virus GLRaV-2 y ArMV en plantaciones de Vid.
- La variedad Torontel fue la que obtuvo una mayor infección viral con un 29,8 %.
- Las técnicas moleculares fueron más sensibles en la detección de las infecciones con los virus GLRaV-2 y GFkV que DAS-ELISA, esto se confirmó cuando se realizaron las diluciones seriadas en el análisis de infección múltiple de una muestra y cuando se evaluó muestras de vid de campo.

X.- RECOMENDACIONES

1. Cuantificar la carga viral utilizando Real Time PCR y evaluar el efecto negativo de la infección viral en las variedades pisqueras.
2. Estandarizar metodologías de Saneamiento Viral: Termoterapia y quimioterapia para obtener un Germoplasma Libre de virus.
3. Análisis genéticos de poblaciones con los aislados de virus pertenecientes a Perú.

XI.-BIBLIOGRAFÍA

- Acheche, H., Fattouch, S., Mhirsi, S., Marzouki, N. & Marrakchi, M. Use of optimized PCR methods for the detection of GLRaV3: a closterovirus associated with grapevine leafroll in Tunisian grapevine plants. *Plant Mol Biol Rep* 1999, 17, 31- 42.
- AgroBanco. Cultivo de la Uva. Banco Agropecuario – Área de desarrollo 2008.
Disponible:
http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/4_cultivo_de_la_uva
- Al Rwahnih, M., Dolja, V., Daubert, S., Koonin, E., & Rowhani, A. Genomic and biological analyses of a virus from a symptomless grapevine support a new genus within the family Closteroviridae. *Virus Research* 2012, 163, 302–309.
- Alkowni, R., Zhang, Y.P., Rowhani, A., Uyemoto, J.K., Minafra, A. Biological, molecular, and serological studies of a novel strain of *Grapevine leafroll-associated virus 2*. *Virus Genes* 2011, 43(1),102-1
- Alleweldt, G. Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 1988, 75, 669-673.
- Brar, HS., Singh, Z., Swinny, RE. & Cameron, I. Girdling and grapevine leafroll associated viruses affect berry weight, colour development and accumulation of anthocyanins in “Crimson Seedless” grapes during maturation and ripening. *Plant Science* 2008, 175, 885–897.
- Burger, P., Bouquet, A & Striem, M.J. Grape breeding. In: Jain, S.M., Priyadarshan, P.M. (eds.), *Breeding plantation tree crops: Tropical species. Springer Science, New York* 2009, 161-189.
- Byoung-Cheorl, K., Yeam, I. & Molly, M. (2004). Genetics of Plant Virus Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43, 581-621.
- Cabello, F. Situación del patrimonio varietal de la especie *Vitis vinifera* L. *ACE Revista de Enología* 2004; N° 47.
Disponible en la web: http://www.acenologia.com/ciencia67_02.htm
- Cabello, F., Ortiz, JM., Muñoz-Organero, G., Rodríguez-Torres, I., Benito, A., Rubio, M.C., García-Muñoz, S. & Saiz, R. Variedades de Vid en España. *Ed Editorial Agrícola Española, Madrid* 2012, 504 pp.
- Camargo, U.A. Grape breeding for the subtropical and tropical regions of Brazil. *Acta Hortic.* 2000, 528, 473–477.
- Castillo, J. Enfermedades a virus que infectan a los cultivos de vid y maíz del Perú. En: *Actas del Tercer Congreso Peruano de Fitopatología*. Lima, Perú. Asociación Peruana de Fitopatología 1973, 44-48
- Charles, J. G., Cohen, D., Walker, J. T. S., Forgie, S. A., Bell, V. A., & Breen, K. C. A review of Grapevine leafroll-associated virus type 3(GLRaV-3) for the New Zealand wine industry: Report to New Zealand Wine growers. *Hort Research Client Report* 2006, 18447,79.
- Chomé, P., Sotés, V., Benayas, F., Cayuela, M., Hernández, M., Cabello, F., Ortiz, J., Rodríguez-Torres, I. & Chaves, J. Variedades de Vid. Registro de Variedades Comerciales. *Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Madrid* 2003, 303 pp.

- Clark, M.F. & Adams, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen Virol* 1977, 34(3), 475-83)
- CITEVID. Uva y el Pisco: Potencialidades Productivas. 2004. Disponible: <https://es.scribd.com/doc/216551783/Libro-La-Uva-y-El-Pisco>
- Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, R. Zironi and G. Comi. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomallus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 70 (3):1347-1355.
- Constable, F. E., Connellan, J., Nicholas, P., & Rodoni, B. C. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays and reverse transcription-polymerase chain reaction for the reliable detection of Australian grapevine viruses in two climates during three growing seasons. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2012, 18, 239–244.
- Credi, R. & Babini, A.R. Effect of virus and virus-like infections on the growth of grapevine rootstocks. *Advances in Horticultural Science* 1996, 10(2), 95-98
- Cretazzo, E., Tomás, M., Padilla, C., Rosselló, J., Medrano, H., Padilla, V., Cifre, J. Incidence of virus infection in old vineyards of local grapevine varieties from Majorca: implications for clonal selection strategies. *Span J Agric Res* 2010, 8(2),409-418.
- De Andrés, M.T., Benito, A., Pérez-Rivera, G., Ocete, R., Lopez, M.A., Gaforio, L., Muñoz, G., Cabello, F., Martínez Zapater, J.M. & Arroyo-García, R. Genetic diversity of wild grapevine population in Spain and their genetic relationships with cultivated grapevines. *Molecular Ecology* 2012, 21(4), 800-816.
- Digiaro, M., Elbeaino, T. & Martelli, GP. (2007). Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C. *J Virol Methods*, 141,34–40.
- Dovas, C. & Katis, N. (2003) A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the Vitivirus and Foveavirus genera in grapevine. *Journal of Virological Methods*, 170, 99-106.
- Engelbrecht, D. J., & Kasdorf, G. G. F. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* 1990, 22, 341–346.
- FAO, 2016 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Base de datos estadísticos (Online Database). URL: <http://faostat3.fao.org/compare/S> (03-febrero-2016)
- Fiore, N., Proda, S., Montealegre, J. & Zamorano, A. (2008) Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1),125-130.
- Fiore, N., Zamorano, A. & Abarca, C. (20015). Diagnóstico y saneamiento de virus, viroides y fitoplasmas que afectan a la vid. *Red Agrícola*, 71,52–57.
- Fortusini, A., Scattini, G., Prati, S., Cinquanta, S., & Belli, G. Transmission of Grapevine leafroll virus1 (GLRaV-1) and Grapevine virus

- A (GVA) by scale insects. *In Extended abstracts 12th meeting of ICVG 1997*, Lisbon, Portugal (pp. 121–122)
- Fribourg C.E. (2007) *Virus, Viriodes y Mollicutes de las Plantas cultivadas en el Perú*, 219 pp.
 - Galet P. Recherches sur le méthodes d'identification et classification des Vitaceés des zones tempérées (Tesis Doctoral). Université de Montpellier 1967.
 - Gawande S, Sukla A, Chimote VP, Kaushal N, Kundal P, Garg ID and Chimote KP. Development of PCR-based techniques for the detection of immobilised PVY virions. *J Plant Pathol* 2011, 93: 127-32
 - Gambino, G. & Gribaudo, I. (2006). Simultaneous detection of nine grapevine viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction with co-amplification of a plant RNA as internal control. *Virology*, 96,1223–1229.
 - Gambino, G., Navarro, B., Torchetti, E.M., La Notte, P., Schneider, A., Mannini, F. & Di Serio, F. (20014). Survey on viroids infecting grapevine in Italy: identification and characterization of Australian grapevine viroid and Grapevine yellow speckle viroid 2. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 199–205.
 - Golino, D.A., Sim, S. & Rowhani, A. The role of rootstock genotype in the effects of single and mixed infections of grapevine viruses. *Extended abstracts of the 14 th Meeting of the ICVG*, Locorotondo, Italy, 2003,136-137.
 - Greif, C., Garau, R., Boscia, D., Prota, V. A., Fiori, M., Bass, P., et al. The relationship of Grapevine leafroll-associated closterovirus 2 with a graft-incompatibility condition of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 1995, 34, 167–173.
 - Guido, H.M. Virus en carozos, pomáceas y vides: 10 años de estudios e investigaciones en Chile. *Boletín INIA – Santiago Chile* 2014, 289.
 - Guidoni, S., Mannini, F., Ferrandino, A., Argamante, N. & Di Stefano, R. Effect of virus status on leaf and berry phenolic compounds in two wine grapevine *Vitis vinifera* cultivars. *Acta Horticulturae* 2000, 526, 445-452.
 - He, P. & Wang, G. Studies on the resistance of wild *Vitis* species native to China to downy mildew, *Plasmopara viticola*. *Acta Horticulturae Sinica* 1986, 13, 17-24.
 - Hewitt, WB., Goheen, AC., Cory, L. & Luhn, C. (1972) Grapevine fleck disease, latent in many varieties, is transmitted by graft inoculation. *Ann Phytopathol*, 43:47.
 - Hidalgo, J., Hidalgo, L. *Tratado de viticultura I* 2011. Tomo I, Cap. I - XXVI
 - Hidalgo, L. *Tratado de Viticultura general* 1999. Madrid.
 - Hidalgo, L. *Tratado de viticultura general. 1ª Edición*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid 1993, 984 p.
 - Hommay, G., Komar, V., Lemaire, O., & Herrbach, E. Grapevine virus Atransmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *European Journal of Plant Pathology* 2008, 121, 185–188.

- Infoagro, 2011. El cultivo de la vid. En: <http://www.infoagro.com/viticultura/vinas.htm>; consulta: enero de 2016.
- Ingrouille, M.J., Chase, M.W., Fay, M.F., Bowmann, D., Van der Bank, M. & Bruijn, D.E. Systematics of Vitaceae from the viewpoint of rbcL DNA sequence data. *Bot. J. Linnean Soc* 2002, 138, 421–432.
- Jacobi, V., Bachand, G.D., Hamelin, R.C., Castello, J.D. Development of a multiplex immunocapture RTPCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *J. Virol. Methods* 1998, 74: 167–178
- Jansen, R.W., Siegl, G. & Lemon, S.M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 2867–2871.
- Juarez, J., Duran-Vilan, N. & Arregui, J. (1988). Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. *Am. J. Enol. Vitic*, 39, 217-220.
- Kim, HR., Chung, JD., Kim, KR., Choi, YM., Yie, MS. & Park, JW. Effects of grapevine leafroll-associated virus 3 infection on vine growth and fruit quality in 'Kyoho' grapevines. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 2003, 44, 335-339.
- Kim, HR., Lee, SH., Lee, BC., Kim, YT & Park, JW. (2004) Identification of grapevine leafroll associated virus 3 Ampelovirus from grapevines in Korea. *Plant Pathol J.*, 20, 127–130.
- Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G. & Fuchs, M. Beneficial effect of selective virus elimination on the performance of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture* 2007, 58, 202-210.
- Koolivand, D., Sokhandan-Bashir, N., Akbar Behjatnia, S. A., & Jafazi Joozani, R. A. Detection of Grapevine fanleaf virus by immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) with recombinant antibody. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2014, 47, 2070–2077.
- Kovacs, LG., Hanami, H., Fortenberry, M., & Kaps, ML. Latent infection by phloem-limited viruses is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevines. *Extended abstracts of the 13 th Meeting of the ICVG*, Adelaide, Australia 2000, 158-159.
- Kovacs, L.G., Hanami, H., Fortenberry, M. & Kaps, ML. Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001, 52, 254-259.
- Krake, L.R. Characterization of grapevine leafroll disease by symptomatology. *The Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 1993, 8, 40–44.
- La Notte, P., Minafra, A. and Saldarelli, P. A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. *J Virol Methods* 1997, 66, 103-108.
- Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., & Lemaire, O. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology* 2012, 102, 717–723.

- Lima, M. F., Alkowni, R., Uyemoto, J. K., Golino, D. A., Osman, F., & Rowhani, A. Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem pitting-associated virus isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of Virology* 2006, 151, 1889–1894.
- Maliogka, V.I., Dovas, C.L., Katis, N.I. Generic and species-specific detection of viruses belonging to an evolutionary distinct lineage within the *Ampelovirus* genus. *J Virol. Methods* 2008. 154(1-2),41-7.
- Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs, M., Katis, N.I. Control of viruses infecting grapevine. *Adv virus Res* 2015, 91, 175-227.
- Mannini, F & Credi, R. Appraisal of agronomic and enological modifications in the performances of grapevine clones after virus eradication. *Extended abstracts of the 13th Meeting of the ICVG 2000*, Adelaide, 151-154.
- Maree, H. J., Almeida, R. P. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. Grapevine leafroll associated virus 3. *Frontiers in Microbiology* 2013,4,82.
- Martelli G.P. Graft-transmissible Diseases of Grapevines, Handbook for Detection and Diagnosis. Rome, Italy 1993
- Martelli, G.P. Grapevine degeneration–fanleaf. Graft-transmissible disease of grapevine. Handbook for detection and diagnosis. *Publication Division*, Rome, Italy, 1993, 9-18.
- Martelli, G. P. Infectious diseases and certification of grapevines. In G. P. Martelli & M. Digiario (Eds.) Proceedings of the Mediterranean network on grapevine closteroviruses 1992–1997 and the viroses and virus-like diseases of the grapevine a bibliographic report, 1985–1997. Bari: CIHEAM, p. 47–64 ,1999(Options Mediterraneennes: Serie B. Etudes et Recherches; n. 29)
-
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C., & Yoshikawa, N. The family Closteroviridae revised. *Archives of Virology* 2002,174, 2039-20.
- Martelli, G.P.; Agranovsky, A.A.; Bar-Joseph, M.; Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V.; Falk, B.W.; Gonsalves, D.; Jelkmann, W.; Karasev, A.V.; Minafra, A.; Namba, S.; Vetten; H.J.; Wisler, G.C.; Yoshikawa, N.. Family Closteroviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. , Ball L.A. (Eds.). *Virus Taxonomy. Eighth Report Of The International Committee On Taxonomy Of Viruses* 2005, Pp. 1077-1087.
- Martelli, G.P. & Boudon-Padieu, E. (2006). Directory of infectious diseases of grapevine and viruses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998–2004. *Options Mediterraneennes Serie B* , 55 ,279.
- Martelli, G.P., Adams, M.J., Kreuze, J.F. & Dolja, V.V. Family Flexiviridae: A case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 2007, 45,73–100.

- Martelli, G. P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A. A., Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Dovas, C. I., et al. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* 2012, 94, 7–19.
- Martelli, G.P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1S), 1-129.
- Mena, A. Recuperación, Caracterización y Conservación de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) minoritarias de Castilla – La Mancha (Tesis Doctoral). Universidad de Castilla La Mancha, Toledo 2013.
- Minafra, A. & Hadidi, A. (1994) Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated virus III from viruliferous mealybugs and infected tissue. *J Virol Methods*, 47, 175–188.
- MINAGRI. Anuario: Producción Agrícola 2014. Sistema Integrado de Estadística Agraria.
Disponible: <http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=publicaciones/anuarios-estadisticos>
- MINCETUR. (2004). Estudio acerca de las tecnologías de cultivo de vid, Producción de pisco y propuesta de cómo establecer Distintas calidades de pisco. Proyecto de Cooperación UE-Perú en materia de asistencia técnica relativa al comercio. *Informe Final*.
Disponible:
<http://www.mincetur.gob.pe/Comercio/ueperu/licitacion/pdfs/Informes/38.pdf>
- MINAGRI. INIA liberó tecnología para el manejo de brotamiento en uvas pisqueras. Revista Institucional Agro Innova 2012. Año 3 Edición N° 12.
Disponible:
<http://www.sierraexportadora.gob.pe/wp-content/uploads/biblioteca->
- MINAGRI. Informe de registro de productores de uva en las regiones de Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna y Lima provincias. Dirección General de Información Agraria- Dirección de Estadística 2008.
Disponible:
<http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/DocumentoFinalVid.pdf>
- Moreno, P. Caracterización de los recursos fitogenéticos de vid (*Vitis vinifera* L.) del Principado de Asturias (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba 2011.
- Mullins, M.G., Bouquet, A. & Williams, L.E. Biology of the Grapevine. *Cambridge University Press* 1992.
- Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M., & Nakano, M. Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Archives of Virology* 2008, 153: 1827–1832.
- Nassuth, A., Pollari, E., Helmeczy, K., Stewart, S. & Kofalvi, S. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J. Virol. Methods* 2000, 90, 37–49
- Nemichov, L., Hadidi, A., Candresse, T., Foster, J.A., verderevskaya, T. Sensitive detection of Apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Hort.* 1995, 386, 51–62.

- Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V. & Ponz, F. (1993). A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods*, 45(2),201–218.
- Nolasco, G., Mansinho, A., Santos, MT., Soares, C., Sequeira, Z., Sequeira, C., Correia, PK. & Sequeira, OA. Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. *European Journal of Plant Pathology* 2000, 106, 311–318.
- Nolasco, G., Sequeira, Z., Soares, C., Mansinho, A., Bailey, A. & Niblett, C. (2002). Asymmetric PCR ELISA: increased sensitivity and reduced cost for the detection of plant viruses. *European Journal of Plant Pathology*, 108 (4), 293-298.
- OIV 2015 Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Statistical Report on World vitiviniculture. Disponible en web : <http://www.oiv.int/es/> (Consultado en Enero, 2016)
- Olmos, A., Dasi, MA., Candresse, T. & Cambra, M. Print-capture PCR: a simple and high sensitive method for the detection of Plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Res* 1996, 24 (11), 2192-2193.
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D., & Rowhani, A. Real-time RT-PCR(TaqMan) assays for the detection of grapevine leafroll associated viruses 1–5 and 9. *Journal of Virological Methods* 2007, 141, 22–29.
- Palacios, V., Nebot, E. & Pérez, L. Aplicación de análisis estadísticos multivariantes al estudio del proceso de maduración de la uva en el marco del jerez. *Servicio de Publicaciones Universidad de Cádiz*, 1997.
- Panattoni, A., Luvisi, A., & Triolo, E. (2013) Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(1), 173–188.
- Patel, GI. & Olmo, HP. Cytogenetics of Vitis: I. The hybrid *V. vinifera* x *V. rotundifolia*. *Amer. J. Bot* 1955, 42, 141 -159.
- Pérez, J., Barros, S. & Peppi, M. (2000). Uso de material de propagación vitícola seleccionado y libre de virus. *Aconex*, 66, 7-11.
- Pinto, M., Lira, W., Ugalde, H. & Pérez, F. Fisiología de la latencia de las yemas de Vid: hipótesis actuales. *Universidad de Chile* 2003,16 p.
- Planchon, J.E. Monographie des Ampelideae vraies in *Monographia Phanerogamarum A. et C. de Candolle* 1887, 5, 305–364.
- Raosoft 2004. Sample size calculator. Disponible desde Internet en: <http://www.raosoft.com/samplesize.html> (con acceso el 20/04/2016).
- Reynier, A. *Manual de Viticultura*. Ed. Mundi-Prensa Madrid 2002, 497 pp.
- Reynier, A. *Manual de viticultura*. Quinta edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 1995
- Rowhani,A., Maningas, MA., Lile, LS., Daubert, SD. & Golino, DA. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 1995, 85: 347-352.
- Rowhani, A., Uyemoto, J. K., Golino, D. A., & Martelli, G. P. Pathogen testing and certification of Vitis and Prunus species. *Annual Review of Phytopathology* 2005, 43, 261–278.

- Royer, C. Mouvement historiques de la vigne dans le monde. In *La Vigne et le Vin* (La Manufacture et la Cité des sciences et de l'industrie, eds) 1988 , 15–25
- Sabanadzovic, S., Ghanem, NA., Castellano, MA., Digiario, M. & Martelli, GP. (2000). Grapevine fleck virus-like viruses in Vitis. *Arch Virol*, 145,553–565.
- Salazar, D & Melgarejo, P. Viticultura. Técnicas del cultivo de la vid, calidad de la uva y atributos de los vinos. *Ediciones Mundi-Prensa*, Madrid 2005
- Salzman, RA., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, PM., Bressan, RA. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Mol Biol Rep* 1999, 17: 11–17.
- Sharma, A. M., Wang, J., Duffy, S., Zhang, S., Wong, M. K., Rashed, A., et al. Occurrence of grapevine leafroll-associated virus complex in Napa Valley. *PLoS One* 2011, 6(10),26227
- Sharman, M., Thomas, J., Dietzgen, R.G. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *J. Virol. Methods* 2000, 89: 75–88
- Simon, A., Bodor, L. & Bujtas, G. Effect of grape viruses (fanleaf, yellow mosaic, leafroll) on quantity and quality of yield and on the status of grapevine plantation. *Extended Abstracts of the 14th ICVG Conference, Locorotondo, Italy* 2003,250-251.
- Tenorio, J., Perinango, C. & Orjeda, G. (2009) Virus en nuestras uvas pisqueras ¿Cómo detectarlos y controlarlos? *VIII Congreso Nacional del Pisco*. Lunahuana-Perú,22-24
- This, P., Lacombe, T. & Thomas, MR. Historical origins and genetics diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 2006, 22, 511-519.
- Thompson, J. R., Fuchs, M., McLane, H., Celebi-Toprak, F., Fischer, K. F., Potter, J. L., et al Profiling viral infections in grapevine using a randomly primed reverse transcription-polymerase chain reaction/microarray multiplex platform. *Phytopathology* 2014, 104,211–219.
- Tomazic, I., Petrovic, N. & Korosec-Koruza, Z. Effects of rugose wood and GLRaV-1 on yield of cv. 'Refosk' grapevines. *Acta Agriculturae Slovenic* 2005, 85, 91-96.
- Tomazik, I., Korošec-Koruza, Z. & Koruza, B. GLRaV-1 and stem pitting disease - two factors affecting the yield of grapevine CV Refosk. *Extended abstracts of the 13th Meeting of the ICVG, Adelaide*, 2000,159-161
- Tsai, C. W., Daugherty, M. P., & Almeida, R. P. P. Seasonal dynamics and virus translocation of Grapevine leafroll-associated virus 3in grapevine cultivars. *Plant Pathology* 2012, 61, 977–985.
- Uyemoto, JK. & Rowhani, A. Discovery of different grapevine sources with graft-transmissible agents causing union-incompatibility on sensitive rootstocks. *Extended abstracts of the 14 th ICVG Conference, Locorotondo, Italy* 2003, 139-140.

- Vega, A., Gutierrez, RA., Pena-Neira, A., Cramer, GR. & Arce-Johnson, P. Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Molecular Biology* 2011, 77, 261-274.
- Vişoiu, E., Buciumeanu, E., Teodorescu, Al. A comparative investigation on the the in vitro behaviour of the virus-free and virus-infected vine biological material. *Lucrări științifice UȘAMVB, B(XLIII)* 2000 ,227-229
- Walter, B. & Martelli, G.P. (1996). Sélection clonale de la vigne: sélection sanitaire et sélection pomologique. Influence des viroses et qualité. 1ere partie: Effets des viroses sur la culture des vignes et ses produits. *Bulletin de l' OIV*, 69, 945-971.
- Wan, Y., Schwaninger, H., He, P. & Wang, Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis* 2007, 46, 132-136.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J Virol Meth* 1992, 39, 27-37.

ANEXOS

Anexo 2: Preparación de soluciones Buffer para DAS-ELISA

1. Buffer de Sensibilización

| | 100ml |
|---------------------------------|--------|
| Na ₂ CO ₃ | 0.159g |
| NaHCO ₃ | 0.293g |

Mezclar los componentes en aproximadamente 90 ml. de agua Milli-Q; medir el pH 9.6 y completar a 100 ml.

2. Solución PBS 5X ; pH 7.4

| | 1000ml |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 40g |
| KCl | 1g |
| Na ₂ HPO ₄ | 5.75g |
| KH ₂ PO ₄ | 1g |

Mezclar los componentes en aproximadamente 900 ml. de agua destilada; medir el pH 7.4 y completar a 1000 ml. Conservar la solución a 4°C.

3. Solución PBS – Tween (PBS-T) ; pH 7.4

| | 1000ml |
|----------------------------|--------|
| Solución PBS 5X | 200ml |
| H ₂ O Destilada | 800ml |
| Tween 20 | 0.5 ml |

Conservar la solución a 4 ° C

4. Buffer de Maceración

| | 100ml |
|-------------------------------|-------|
| Solución PBS – Tween | 100ml |
| 2% Polivinilpirrolidona (PVP) | 2g |
| 1% Albumina | 1g |

5. Buffer de Conjugado

| | |
|-------------------------------|-------|
| | 100ml |
| Solución PBS – Tween | 100ml |
| 2% Polivinilpirrolidona (PVP) | 2g |
| 0.2% Albumina | 0.2g |

6. Buffer del Sustrato 5X : pH 9.8

| | |
|--------------------------|--------|
| | 1000ml |
| Dietanolamina | 582ml |
| H ₂ O Milli-Q | 338ml |
| HCl | 80 ml |

Conservar la solución a 4 ° C

7. Buffer de Revelado

| | |
|--------------------------|------|
| | 80ml |
| Buffer del Sustrato 5X | 64ml |
| H ₂ O Milli-Q | 12ml |

Mezclar los componentes finalmente se adiciona las pastillas de p-nitrofenilfosfato (1 Tableta cada 20 ml de buffer de revelado).

Anexo 3: Protocolo de extracción de ARN de hojas por CTAB Modificado

a) Preparación de Buffer de extracción CTAB 2%

| | |
|--------------------|----------------------|
| | Volumen final 500 mL |
| Tris.HCl 1M pH 8.0 | 50 mL |
| NaCl 1.4M | 40.9g |
| EDTA 0.5M | 50mL |

| | |
|------------------|-------------------|
| 2% CTAB | 10 g |
| H ₂ O | Completar a 500mL |

Para facilitar la preparación del buffer, primero adicionar la solución Tris-.HCl y regular el pH. Añadir los otros componentes y calentar a 80°C aprox. Finalmente agregar el CTAB, agitar hasta disolver el CTAB y complete el volumen con agua bi-distilada. Conserve a T° Ambiente. Cuando el buffer se utilice adicionar 1% mercaptoetanol y 2% PVP-40.

b) Extracción del ARN

1. Macerar 0.5g de tejido en 3mL de buffer de extracción.
2. Transferir 1,5 ml a un tubo eppendorf e incubar a 65°C por 15-20min.
3. Centrifugar a 14 000rpm por 5min a temperatura ambiente (TA).
4. Transferir el sobrenadante (SN) a un tubo eppendorf, la mayor cantidad posible sin llevar los residuos del tejido vegetal.
5. Mezclar el SN con igual volumen de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
6. Centrifugar 14 000rpm por 5min a temperatura ambiente.
7. Transferir el SN a un tubo eppendorf con mucho cuidado, sin transferir la interfase.
8. Repetir los pasos 5 y 6.
9. Transferir el SN a un tubo eppendorf con mucho cuidado Sin transferir la interfase.
10. Mezclar el SN con igual volumen de cloruro de litio (4M) e incubar a 4°C toda la noche.
11. Centrifugar a 14 000rpm x 20min a 4°C. Retirar el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado.
12. Lavar el pellet formado con 1ml de etanol al 70%. Centrifugar a 14000 rpm por 20 min. Retirar el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado.

13. Lavar el precipitado con 1 ml de etanol al absoluto. Centrifugar a 14000 rpm por 20 min. Retirar el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado.
14. Invertir los tubos y dejar secar sobre papel toalla por 10 min.
15. Resuspender el ARN en 50 μ L de agua estéril libre de ARNsas.

Anexo 4: Concentración y nivel de pureza de las extracciones de ARN

A partir de estos valores se tomaron diferentes volúmenes para la retrotranscripción.

| | Muestras | Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Absorbancia 260/280 |
|-------------------|-----------------|---|--------------------------------|
| REGIÓN ICA | 373-I | 242.7 | 2.06 |
| | 85 - I | 71 | 1.81 |
| | 156 -I | 71.3 | 1.84 |
| | 363 -I | 457.1 | 2.17 |
| | 399 -I | 14.7 | 2.62 |
| | 297 -I | 134.4 | 2.18 |
| | 305 -I | 70.3 | 2.20 |
| | 327 -I | 18.2 | 2.47 |
| | 279 -I | 136.8 | 2.10 |
| | 301 -I | 173.7 | 2.17 |
| | 272 -I | 142.1 | 2.03 |
| | 408 -I | 135.6 | 1.89 |
| | 424 -I | 153 | 2.00 |
| | 246 -I | 312 | 2.16 |
| | 265 -I | 222.2 | 2.10 |
| | 8 - V | 249.7 | 2.09 |
| | 14 - V | 481.9 | 2.12 |
| | 69 - V | 32.2 | 1.92 |
| | 7 - V | 80.5 | 1.57 |
| | 29 - V | 152 | 2.01 |
| | 215-I | 335.3 | 2.11 |
| | 218 -I | 107.7 | 2.06 |

| | Muestras | Concentración (µg/mL) | Absorbancia 260/280 |
|--|----------|--------------------------|------------------------|
| | | 321 - A | 640.5 |
| | 322 - A | 152.8 | 2.00 |
| | 9 - A | 257.2 | 2.12 |
| | 33 - A | 402.1 | 2.13 |
| | 63 - A | 409.8 | 2.10 |
| | 79 - A | 339.3 | 2.14 |
| | 86 - A | 56 | 1.98 |
| | 81 - A | 207.7 | 2.06 |
| | 84 - A | 114.9 | 2.05 |
| | 61 - A | 515.5 | 2.04 |
| | 73 - A | 845.8 | 2.12 |
| | 74 - A | 790.3 | 2.11 |
| | 80 - A | 183.7 | 2.04 |
| | 67 - A | 184.4 | 2.06 |
| | 126 - A | 212.2 | 2.07 |
| | 127 - A | 249.6 | 2.10 |
| | 158 - A | 181.4 | 2.09 |
| | 125 - A | 556.6 | 2.06 |
| | 180 - A | 129.7 | 2.01 |
| | 99 - A | 1174.1 | 2.13 |
| | 120 - A | 113.1 | 2.01 |
| | 153 - A | 81.7 | 2.01 |
| | 149 - A | 155.1 | 2.01 |
| | 160 - A | 107.4 | 2.07 |
| | 164 - A | 123.9 | 2.06 |
| | 275 - A | 42.5 | 1.79 |
| | 188 - A | 873.3 | 2.15 |
| | 203 - A | 869 | 2.16 |
| | 226 - A | 361.4 | 2.10 |
| | 266 - A | 161.8 | 1.98 |
| | 271 - A | 210.9 | 1.88 |
| | 259 - A | 420.1 | 2.10 |
| | 264 - A | 272.3 | 2.08 |
| | 250 - A | 274.5 | 2.08 |
| | 277 - A | 509.1 | 2.02 |
| | 257 - A | 499.3 | 2.03 |
| | 393 - A | 402.1 | 2.11 |
| | 300 - A | 57 | 1.96 |
| | 307 - A | 697.9 | 2.16 |
| | 303 - A | 122.1 | 2.03 |
| | 356 - A | 29.9 | 1.90 |
| | 327 - A | 32 | 1.76 |
| | 351 - A | 332.2 | 2.05 |
| | 308 - A | 137.6 | 2.02 |
| | 281 - A | 46.7 | 1.88 |
| | 282 - A | 18.9 | 1.83 |
| | 283 - A | 18.3 | 1.83 |
| | 280 - A | 54.4 | 1.85 |
| | 289 - A | 321.3 | 2.06 |

**REGIÓN
AREQUIPA**

| | Muestras | Concentración (µg/mL) | Absorbancia 260/280 |
|--|----------|--------------------------|------------------------|
| | | 271 - T | 270.2 |
| | 79 - T | 57.8 | 2.06 |
| | 69 - T | 34.2 | 2.09 |
| | 59 - T | 22.2 | 2.09 |
| | 10 - T | 24.1 | 2.09 |
| | 6 - T | 2.8 | 2,18 |
| | 2 - T | 7.2 | 2.09 |
| | 1 - T | 33.7 | 2.09 |
| | 16 - T | 3.8 | 2.10 |
| | 15 - T | 6 | 1.94 |
| | 102 - T | 4.70 | 2.14 |
| | 130 - T | 49.6 | 2.06 |
| | 98 - T | 7.4 | 2.05 |
| | 94 - T | 47.7 | 2.06 |
| | 97 - T | 10.4 | 2.01 |
| | 93 - T | 4.4 | 1.99 |
| | 123 - T | 1.1 | 1.72 |
| | 106 - T | 33.4 | 2.08 |
| | 107 - T | 7.8 | 1.91 |
| | 124 - T | 35.3 | 2.09 |
| | 243 - T | 20.9 | 2.01 |
| | 245 - T | 19.9 | 2.05 |
| | 195 - T | 17.9 | 2.01 |
| | 211 - T | 6.9 | 1.97 |
| | 263 - T | 13.1 | 2.01 |
| | 253 - T | 17.2 | 1.99 |
| | 186 - T | 7.9 | 1.90 |
| | 201 - T | 36.7 | 2.06 |
| | 198 - T | 2.1 | 1.95 |
| | 228 - T | 9.2 | 2.06 |
| | 325 - T | 33.1 | 2.08 |
| | 397 - T | 2.5 | 2.00 |
| | 307 - T | 9 | 1.88 |
| | 341 - T | 10.2 | 1.98 |
| | 361 - T | 24 | 2.09 |
| | 389 - T | 3.1 | 1.77 |
| | 380 - T | 12 | 2.04 |
| | 363 - T | 55.7 | 2.10 |
| | 366 - T | 9.7 | 1,94 |
| | 367 - T | 38 | 2.13 |
| | 381 - T | 37.5 | 2.14 |
| | 308 - T | 3.4 | 1.83 |
| | 372 - T | 27.3 | 2.06 |

**REGIÓN
TACNA**

Anexo 5: Síntesis de cADN

1. En un tubo de 2 mL, se combina lo siguiente con la muestra de ARN y se ajusta a un volumen de 12 μL :

| Componentes | Volumen |
|--|----------------------|
| Ramdon Primers (50ng/ul) | 1 μL |
| ARN (100-500 μg) | X μL |
| 10 mM dNTP | 1 μL |
| Agua tratada con dietilpirocarbonato (Agua DEPC) | (12-X) μL |
| Total | 12 μL |

2. Desnaturalizar el ARN y el cebador incubando por 5 min a 65°C y colocar a 4°C por 5 min.
3. Preparar el master mix en hielo y agitar en vortex.

| Componentes | 1 reacción |
|-------------------|-----------------|
| Tampón5X cADN | 4 μL |
| DTT 0.1M | 1 μL |
| Rnase OUT 40U/ul | 1 μL |
| Agua DEPC | 1 μL |
| Enzima M-MLV 200U | 1 μL |
| Total | 8 μL |

4. Colocar 8 μL de master mix en cada tubo de reacción desnaturalizado.
5. Colocar la muestra en el termociclador con las siguientes condiciones de incubación.

| |
|----------------|
| 25 °C x 10 min |
| 37 °C x 50 min |
| 70 °C x 15 min |

6. Almacenar a -80°C.

Anexo 6: Lecturas de absorbancia en la prueba de DAS-ELISA a 405nm y su respectivo Punto de Corte por placa

| Zona ICA | | | | | | | | |
|----------------|---------|------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|--------------|---------------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa I | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLFV | GLFV | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 359 -I | 0.1554 | 0.1259 | 0.1200 | 0.0685 | 0.1384 | 0.0905 | 0.128 |
| 2 | 360 -I | 0.1235 | 0.1324 | 0.0905 | 0.0687 | 0.1137 | 0.0867 | 0.1113 |
| 3 | 361 -I | 0.1485 | 0.1295 | 0.1019 | 0.0722 | 0.1596 | 0.0867 | 0.1209 |
| 4 | 362 -I | 0.1224 | 0.1287 | 0.0896 | 0.0734 | 0.1594 | 0.0964 | 0.1076 |
| 5 | 363 -I | 0.1172 | 0.189* | 0.1016 | 0.0785 | 0.1589* | 0.1035 | 0.1334 |
| 6 | 364 -I | 0.1250 | 0.1315 | 0.1013 | 0.0749 | 0.1597 | 0.0954 | 0.1155 |
| 7 | 365 -I | 0.1296 | 0.1006 | 0.0982 | 0.079 | 0.1632 | 0.0922 | 0.0906 |
| 8 | 366 -I | 0.1522 | 0.1198 | 0.0953 | 0.0693 | 0.1435 | 0.1009 | 0.1333 |
| 9 | 367 -I | 0.1196 | 0.1308 | 0.0925 | 0.0729 | 0.0871 | 0.0928 | 0.1114 |
| 10 | 368 -I | 0.1283 | 0.1421 | 0.0881 | 0.0719 | 0.097 | 0.0802 | 0.1105 |
| 11 | 369 -I | 0.1115 | 0.1271 | 0.0895 | 0.0762 | 0.0946 | 0.0893 | 0.1144 |
| 12 | 370 -I | 0.1142 | 0.1392 | 0.0981 | 0.0744 | 0.0968 | 0.0809 | 0.1043 |
| 13 | 371 -I | 0.1071 | 0.1235 | 0.0870 | 0.0735 | 0.0968 | 0.0837 | 0.1121 |
| 14 | 372 -I | 0.1166 | 0.1398 | 0.0921 | 0.0735 | 0.1039 | 0.0906 | 0.1072 |
| 15 | 373 -I | 0.1174 | 0.164* (a) | 0.0921 | 0.0727 | 0.1035 | 0.1017 | 0.1364 |
| 16 | 374 -I | 0.1285 | 0.1549 | 0.0853 | 0.071 | 0.0925 | 0.0879 | 0.0979 |
| 17 | 375 -I | 0.1506 | 0.1215 | 0.0900 | 0.0751 | 0.1008 | 0.0815 | 0.1152 |
| 18 | 376 -I | 0.1464 | 0.1298 | 0.0805 | 0.0754 | 0.1021 | 0.0809 | 0.1008 |
| 19 | 377 -I | 0.1324 | 0.1094 | 0.0842 | 0.0773 | 0.1084 | 0.071 | 0.1084 |
| 20 | 378 -I | 0.1428 | 0.1355 | 0.0826 | 0.0723 | 0.1043 | 0.0912 | 0.1253 |
| 21 | 379 -I | 0.1219 | 0.1181 | 0.0857 | 0.0817 | 0.109 | 0.1113 | 0.1102 |
| 22 | 380 -I | 0.1437 | 0.1288 | 0.0873 | 0.0758 | 0.1259 | 0.0934 | 0.1194 |
| 23 | 381 -I | 0.1517 | 0.1409 | 0.0807 | 0.0754 | 0.1104 | 0.0853 | 0.1105 |
| 24 | 382 -I | 0.2121 | 0.1242 | 0.0961 | 0.076 | 0.1017 | 0.0926 | 0.1317 |
| 25 | 383 -I | 0.1049 | 0.1025 | 0.0842 | 0.0843 | 0.1118 | 0.0934 | 0.132 |
| 26 | 384 -I | 0.1747 | 0.1446 | 0.0771 | 0.0807 | 0.1127 | 0.086 | 0.1345 |
| 27 | 385 -I | 0.1772 | 0.1285 | 0.0841 | 0.0824 | 0.1236 | 0.0935 | 0.1054 |
| 28 | 386 -I | 0.1452 | 0.1360 | 0.0761 | 0.0801 | 0.1226 | 0.0861 | 0.1182 |
| 29 | 387 -I | 0.1256 | 0.1317 | 0.0776 | 0.0811 | 0.1124 | 0.0874 | 0.1129 |
| 30 | 388 -I | 0.1406 | 0.1269 | 0.0772 | 0.0807 | 0.0975 | 0.0933 | 0.129 |
| 31 | 389 -I | 0.1623 | 0.1349 | 0.0770 | 0.0792 | 0.1239 | 0.0956 | 0.1117 |
| 32 | 390 -I | 0.2651 | 0.1260 | 0.0746 | 0.0763 | 0.1081 | 0.0823 | 0.109 |
| 33 | 391 -I | 0.1541 | 0.1785 | 0.0925 | 0.0968 | 0.1198 | 0.0973 | 0.2171 |
| 34 | 392 -I | 0.1249 | 0.1479 | 0.0839 | 0.0852 | 0.1113 | 0.1016 | 0.1627 |
| 35 | 393 -I | 0.1157 | 0.1546 | 0.0855 | 0.0877 | 0.114 | 0.0945 | 0.1687 |
| 36 | 394 -I | 0.1202 | 0.1256 | 0.0856 | 0.0867 | 0.1118 | 0.1102 | 0.1674 |
| 37 | 395 -I | 0.1087 | 0.1307 | 0.0820 | 0.0875 | 0.1192 | 0.1046 | 0.1427 |
| 38 | 396 -I | 0.1050 | 0.1308 | 0.0845 | 0.0877 | 0.1122 | 0.1109 | 0.1484 |
| 39 | 397 -I | 0.1149 | 0.1262 | 0.0832 | 0.0858 | 0.1073 | 0.1139 | 0.1492 |
| 40 | 398 -I | 0.1398 | 0.1258 | 0.0835 | 0.0858 | 0.0858 | 0.0954 | 0.2423 |
| 41 | 399 -I | 0.1628 | 0.2934* | 0.0860 | 0.0956 | 0.1222* (a) | 0.1091 | 0.1596 |
| 42 | 400 -I | 0.1234 | 0.1448 | 0.0778 | 0.0868 | 0.1012 | 0.1015 | 0.1252 |
| 43 | 71 -I | 0.1190 | 0.1299 | 0.0848 | 0.0948 | 0.1206 | 0.0945 | 0.1091 |
| 44 | 72 -I | 0.1014 | 0.1225 | 0.0809 | 0.0896 | 0.1103 | 0.0904 | 0.121 |
| 45 | 73 -I | 0.1182 | 0.1278 | 0.0764 | 0.0876 | 0.1168 | 0.1139 | 0.1457 |
| 46 | 74 -I | 0.1089 | 0.1108 | 0.0744 | 0.0895 | 0.098 | 0.0874 | 0.1226 |
| 47 | 75 -I | 0.1093 | 0.1170 | 0.0746 | 0.0897 | 0.1028 | 0.0945 | 0.1425 |
| 48 | 76 -I | 0.1438 | 0.1174 | 0.0757 | 0.0868 | 0.1202 | 0.0928 | 0.152 |
| 49 | 77 -I | 0.1659 | 0.1294 | 0.0817 | 0.086 | 0.1117 | 0.0927 | 0.1517 |
| 50 | 78 -I | 0.1124 | 0.1249 | 0.0751 | 0.0841 | 0.0916 | 0.0817 | 0.1059 |
| 51 | 79 -I | 0.1314 | 0.1186 | 0.0754 | 0.089 | 0.12 | 0.0874 | 0.1388 |
| 52 | 80 -I | 0.1135 | 0.1124 | 0.0761 | 0.0863 | 0.1076 | 0.0875 | 0.085 |
| 53 | 81 -I | 0.1037 | 0.1087 | 0.0744 | 0.0878 | 0.1191 | 0.0835 | 0.1359 |
| 54 | 82 -I | 0.1085 | 0.1278 | 0.0730 | 0.0859 | 0.1004 | 0.0827 | 0.1217 |
| 55 | 83 -I | 0.1106 | 0.1067 | 0.0733 | 0.0878 | 0.109 | 0.0834 | 0.1142 |
| 56 | 84 -I | 0.1387 | 0.1130 | 0.0743 | 0.0835 | 0.0911 | 0.0859 | 0.1431 |
| 57 | 85 -I | 0.1455 | 0.0941* | 0.0842 | 0.0892 | 0.115 | 0.0819 | 0.142 |
| 58 | 86 -I | 0.1244 | 0.0966 | 0.0794 | 0.0864 | 0.1005 | 0.0972 | 0.1473 |
| 59 | 87 -I | 0.1191 | 0.1194 | 0.0771 | 0.0814 | 0.1116 | 0.1097 | 0.1353 |
| 60 | 88 -I | 0.1118 | 0.1070 | 0.0783 | 0.086 | 0.0995 | 0.0931 | 0.1374 |
| 61 | 89 -I | 0.0951 | 0.0998 | 0.0752 | 0.0872 | 0.1035 | 0.0847 | 0.1201 |
| 62 | 90 -I | 0.1006 | 0.1203 | 0.0734 | 0.0916 | 0.0962 | 0.0804 | 0.1097 |
| 63 | 91 -I | 0.1077 | 0.1081 | 0.0735 | 0.0842 | 0.0939 | 0.0895 | 0.1181 |
| 64 | 92 -I | 0.1390 | 0.1103 | 0.0708 | 0.0852 | 0.1003 | 0.099 | 0.1259 |
| 65 | 93 -I | 0.1472 | 0.0994 | 0.0824 | 0.0893 | 0.0992 | 0.1168 | 0.1428 |
| 66 | 94 -I | 0.1238 | 0.1169 | 0.0784 | 0.0802 | 0.0956 | 0.0851 | 0.1289 |
| 67 | 95 -I | 0.1321 | 0.1091 | 0.0792 | 0.0853 | 0.0866 | 0.0957 | 0.1237 |
| 68 | 96 -I | 0.1133 | 0.1076 | 0.0873 | 0.0834 | 0.0956 | 0.0882 | 0.1387 |
| 69 | 97 -I | 0.1103 | 0.1248 | 0.0757 | 0.0863 | 0.1221 | 0.0948 | 0.1418 |
| 70 | 98 -I | 0.1107 | 0.1046 | 0.0731 | 0.0834 | 0.0825 | 0.0824 | 0.1221 |
| 71 | 99 -I | 0.1141 | 0.1036 | 0.0769 | 0.1 | 0.0818 | 0.0932 | 0.1204 |
| 72 | 100 -I | 0.1372 | 0.1027 | 0.0726 | 0.0849 | 0.0747 | 0.0858 | 0.1331 |
| 73 | 141 -I | 0.1263 | 0.1029 | 0.0849 | 0.0829 | 0.09 | 0.1014 | 0.1501 |
| 74 | 142 -I | 0.1220 | 0.1107 | 0.0783 | 0.0772 | 0.0845 | 0.0836 | 0.1377 |
| 75 | 143 -I | 0.1256 | 0.1201 | 0.0783 | 0.0862 | 0.0885 | 0.086 | 0.1038 |
| 76 | 144 -I | 0.1184 | 0.1086 | 0.0761 | 0.0857 | 0.0985 | 0.0845 | 0.122 |
| 77 | 145 -I | 0.1120 | 0.1039 | 0.0718 | 0.0835 | 0.0999 | 0.0817 | 0.1153 |
| 78 | 146 -I | 0.1093 | 0.1005 | 0.0747 | 0.0825 | 0.0891 | 0.0845 | 0.1178 |
| 79 | 147 -I | 0.1133 | 0.1047 | 0.0745 | 0.0861 | 0.0856 | 0.0825 | 0.1152 |
| 80 | 149 -I | 0.1321 | 0.1029 | 0.0739 | 0.0831 | 0.0874 | 0.0823 | 0.127 |
| 81 | 148 -I | 0.1188 | 0.1243 | 0.0764 | 0.0889 | 0.0922 | 0.0878 | 0.112 |
| 82 | 150 -I | 0.1171 | 0.1047 | 0.0772 | 0.0831 | 0.0812 | 0.083 | 0.112 |
| 83 | 151 -I | 0.1179 | 0.0996 | 0.0784 | 0.0939 | 0.0955 | 0.0854 | 0.1287 |
| 84 | 152 -I | 0.1249 | 0.0998 | 0.0772 | 0.0881 | 0.0929 | 0.08 | 0.1242 |
| 85 | 153 -I | 0.1097 | 0.1455 | 0.0725 | 0.085 | 0.103 | 0.0765 | 0.1087 |
| 86 | 154 -I | 0.1233 | 0.0994 | 0.0744 | 0.0865 | 0.0967 | 0.087 | 0.1268 |
| 87 | 155 -I | 0.1192 | 0.1057 | 0.0797 | 0.0857 | 0.0936 | 0.1003 | 0.148 |
| 88 | 156 -I | 0.1335 | 0.1896* | 0.0663 | 0.0835 | 0.0657* | 0.086 | 0.1214 |
| 89 | 157 -I | 0.2050 | 0.1026 | 0.0740 | 0.093 | 0.091 | 0.0997 | 0.1179 |
| 90 | 158 -I | 0.1839 | 0.1143 | 0.0832 | 0.0887 | 0.0947 | 0.0949 | 0.1298 |
| Controles | CP | 3.5152 | 2.6718 | 2.8523 | 3.5382 | 3.6906 | 2.032 | 3.5457 |
| | CN | 0.1114 | 0.1066 | 0.0698 | 0.0872 | 0.0894 | 0.0968 | 0.1102 |
| Punto de Corte | | 0.2046 | 0.1873 | 0.1149 | 0.11335583 | 0.1588 | 0.13099333 | 0.19352842 |

Muestras en **negrita y sombreadas** dieron Positivo por DAS ELISA
 * Muestras seleccionadas para la detección por RT-PCR e IC-RT-PCR
 (a) Muestras negativas con valores de absorbancia cercanas al Punto de Corte

| Zona ICA | | | | | | | | |
|------------|---------|------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa II | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLFV | GLFV | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 159 -I | 0.1622 | 0.1666 | 0.0863 | 0.0745 | 0.0877 | 0.1113 | 0.1186 |
| 2 | 160 -I | 0.1492 | 0.1501 | 0.08 | 0.0745 | 0.0822 | 0.104 | 0.1204 |
| 3 | 161 -I | 0.143 | 0.1638 | 0.0795 | 0.0717 | 0.0833 | 0.0948 | 0.1362 |
| 4 | 162 -I | 0.1588 | 0.1572 | 0.0833 | 0.0725 | 0.0807 | 0.1014 | 0.127 |
| 5 | 163 -I | 0.144 | 0.1323 | 0.0802 | 0.0746 | 0.0805 | 0.0865 | 0.111 |
| 6 | 164 -I | 0.1508 | 0.1464 | 0.0809 | 0.0658 | 0.0766 | 0.0895 | 0.1155 |
| 7 | 165 -I | 0.1392 | 0.1486 | 0.0754 | 0.0753 | 0.082 | 0.0856 | 0.1084 |
| 8 | 166 -I | 0.1574 | 0.1111 | 0.0786 | 0.0706 | 0.0823 | 0.1012 | 0.1408 |
| 9 | 167 -I | 0.1478 | 0.1557 | 0.0817 | 0.0727 | 0.0895 | 0.1097 | 0.1195 |
| 10 | 168 -I | 0.1294 | 0.1384 | 0.0838 | 0.0743 | 0.0788 | 0.104 | 0.1124 |
| 11 | 169 -I | 0.1205 | 0.0694 | 0.0795 | 0.0742 | 0.0878 | 0.08 | 0.1077 |
| 12 | 170 -I | 0.1236 | 0.1498 | 0.0875 | 0.0753 | 0.0881 | 0.0919 | 0.1295 |
| 13 | 171 -I | 0.1311 | 0.1086 | 0.0899 | 0.0729 | 0.0849 | 0.0859 | 0.1132 |
| 14 | 172 -I | 0.1264 | 0.1523 | 0.08 | 0.075 | 0.0926 | 0.08 | 0.0992 |
| 15 | 173 -I | 0.1333 | 0.1677 | 0.0835 | 0.0715 | 0.0794 | 0.101 | 0.0967 |
| 16 | 174 -I | 0.151 | 0.0967 | 0.0787 | 0.0725 | 0.0814 | 0.0906 | 0.1302 |
| 17 | 175 -I | 0.1345 | 0.1433 | 0.0866 | 0.0731 | 0.0941 | 0.1041 | 0.0875 |
| 18 | 176 -I | 0.1377 | 0.1445 | 0.0855 | 0.0759 | 0.0793 | 0.0936 | 0.1086 |
| 19 | 177 -I | 0.1249 | 0.117 | 0.082 | 0.0743 | 0.0796 | 0.0956 | 0.1121 |
| 20 | 178 -I | 0.1324 | 0.1573 | 0.0857 | 0.0748 | 0.0803 | 0.098 | 0.1247 |
| 21 | 179 -I | 0.1217 | 0.1593 | 0.0812 | 0.0714 | 0.0867 | 0.0812 | 0.0886 |
| 22 | 180 -I | 0.1158 | 0.1363 | 0.0762 | 0.0712 | 0.1083 | 0.0898 | 0.0946 |
| 23 | 182 -I | 0.1338 | 0.1633 | 0.0815 | 0.0733 | 0.0794 | 0.0915 | 0.1254 |
| 24 | 183 -I | 0.1363 | 0.1448 | 0.0777 | 0.0687 | 0.0807 | 0.0869 | 0.1324 |
| 25 | 276 -I | 0.1557 | 0.1546 | 0.0876 | 0.0778 | 0.0873 | 0.1182 | 0.1447 |
| 26 | 277 -I | 0.1292 | 0.1691 | 0.0781 | 0.0738 | 0.0808 | 0.1058 | 0.1249 |
| 27 | | | | | | | | |

| Zona ICA | | | | | | | | |
|----------------|---------|------------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa III | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLV | GfKv | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 401 -I | 0.2052 | 0.1221 | 0.1022 | 0.0699 | 0.1079 | 0.1184 | 0.1663 |
| 2 | 402 -I | 0.1585 | 0.1132 | 0.0802 | 0.0696 | 0.0949 | 0.1077 | 0.1294 |
| 3 | 403 -I | 0.146 | 0.1188 | 0.0757 | 0.0712 | 0.1054 | 0.1014 | 0.115 |
| 4 | 404 -I | 0.1422 | 0.1171 | 0.0792 | 0.0683 | 0.0956 | 0.107 | 0.1226 |
| 5 | 405 -I | 0.1377 | 0.1189 | 0.0813 | 0.071 | 0.0964 | 0.1111 | 0.1371 |
| 6 | 406 -I | 0.1612 | 0.1275 | 0.0867 | 0.0739 | 0.1693 | 0.0915 | 0.1158 |
| 7 | 407 -I | 0.1632 | 0.1249 | 0.0834 | 0.0753 | 0.119 | 0.1069 | 0.1532 |
| 8 | 408 -I | 0.1833 | 0.1681* | 0.0837 | 0.0663 | 0.1136* (a) | 0.1117 | 0.203189 |
| 9 | 409 -I | 0.1962 | 0.1252 | 0.0817 | 0.0788 | 0.1007 | 0.1057 | 0.1461 |
| 10 | 410 -I | 0.138 | 0.1088 | 0.0806 | 0.0747 | 0.1216 | 0.0905 | 0.0919 |
| 11 | 411 -I | 0.1307 | 0.1269 | 0.0796 | 0.0731 | 0.1006 | 0.0941 | 0.089 |
| 12 | 412 -I | 0.1411 | 0.1343 | 0.0825 | 0.075 | 0.1089 | 0.0893 | 0.0936 |
| 13 | 413 -I | 0.1228 | 0.1367 | 0.0743 | 0.0749 | 0.0962 | 0.0906 | 0.0977 |
| 14 | 414 -I | 0.1383 | 0.1238 | 0.0821 | 0.0722 | 0.168 | 0.115 | 0.1012 |
| 15 | 415 -I | 0.1438 | 0.1145 | 0.079 | 0.0732 | 0.1295 | 0.098 | 0.0927 |
| 16 | 416 -I | 0.1594 | 0.115 | 0.0774 | 0.0683 | 0.0987 | 0.0955 | 0.1338 |
| 17 | 417 -I | 0.1839 | 0.1413 | 0.101 | 0.079 | 0.1022 | 0.1242 | 0.1613 |
| 18 | 418 -I | 0.1351 | 0.116 | 0.0955 | 0.0738 | 0.1252 | 0.0952 | 0.0876 |
| 19 | 419 -I | 0.1218 | 0.1031 | 0.0753 | 0.2138 | 0.1027 | 0.0922 | 0.0901 |
| 20 | 420 -I | 0.1311 | 0.1114 | 0.078 | 0.0771 | 0.1039 | 0.0934 | 0.0941 |
| 21 | 421 -I | 0.1357 | 0.1077 | 0.0763 | 0.4769 | 0.1236 | 0.0901 | 0.0948 |
| 22 | 422 -I | 0.1194 | 0.1111 | 0.0746 | 0.0978 | 0.1 | 0.0876 | 0.0953 |
| 23 | 423 -I | 0.1347 | 0.1063 | 0.0798 | 0.0757 | 0.0993 | 0.0999 | 0.099 |
| 24 | 424 -I | 0.1537 | 0.105* | 0.0783 | 0.0719 | 0.13* (a) | 0.112 | 0.0854 |
| 25 | 425 -I | 0.1951 | 0.1283 | 0.1013 | 0.0796 | 0.0994 | 0.116 | 0.152 |
| 26 | 426 -I | 0.1385 | 0.1331 | 0.0792 | 0.0748 | 0.1035 | 0.0957 | 0.0984 |
| 27 | 427 -I | 0.1243 | 0.1208 | 0.0754 | 0.0735 | 0.0999 | 0.1022 | 0.1038 |
| 28 | 428 -I | 0.1252 | 0.1145 | 0.0787 | 0.073 | 0.0987 | 0.0925 | 0.099 |
| 29 | 429 -I | 0.1347 | 0.1127 | 0.0787 | 0.0708 | 0.105 | 0.0849 | 0.0932 |
| 30 | 430 -I | 0.1259 | 0.1159 | 0.0774 | 0.0721 | 0.1004 | 0.1136 | 0.0852 |
| 31 | 431 -I | 0.1279 | 0.1125 | 0.0782 | 0.0751 | 0.1091 | 0.0868 | 0.0962 |
| 32 | 432 -I | 0.1474 | 0.1264 | 0.0835 | 0.0712 | 0.2297 | 0.1023 | 0.1291 |
| 33 | 224 -I | 0.2523 | 0.1224 | 0.0883 | 0.074 | 0.1197 | 0.1024 | 0.1494 |
| 34 | 225 -I | 0.1239 | 0.1128 | 0.0793 | 0.0751 | 0.1039 | 0.0961 | 0.1041 |
| 35 | 226 -I | 0.1279 | 0.1053 | 0.0781 | 0.0425 | 0.0973 | 0.0881 | 0.095 |
| 36 | 227 -I | 0.1267 | 0.1061 | 0.0771 | 0.0742 | 0.0987 | 0.0919 | 0.0937 |
| 37 | 228 -I | 0.1427 | 0.1098 | 0.0799 | 0.0709 | 0.1078 | 0.0844 | 0.1042 |
| 38 | 229 -I | 0.1333 | 0.1088 | 0.078 | 0.0738 | 0.1007 | 0.0892 | 0.099 |
| 39 | 230 -I | 0.1311 | 0.1132 | 0.0774 | 0.0734 | 0.1316 | 0.0944 | 0.0996 |
| 40 | 231 -I | 0.1241 | 0.1373 | 0.072 | 0.0709 | 0.1023 | 0.0971 | 0.1785 |
| 41 | 232 -I | 0.2508 | 0.1239 | 0.0876 | 0.0737 | 0.1276 | 0.1097 | 0.1467 |
| 42 | 233 -I | 0.1551 | 0.1065 | 0.0796 | 0.0753 | 0.1326 | 0.0887 | 0.1022 |
| 43 | 234 -I | 0.1561 | 0.1189 | 0.0843 | 0.0757 | 0.1615 | 0.0918 | 0.1065 |
| 44 | 235 -I | 0.1251 | 0.112 | 0.0791 | 0.0775 | 0.1384 | 0.1009 | 0.1072 |
| 45 | 236 -I | 0.1261 | 0.1091 | 0.0776 | 0.0719 | 0.1259 | 0.0862 | 0.1018 |
| 46 | 237 -I | 0.1256 | 0.1104 | 0.0828 | 0.1513 | 0.097 | 0.0936 | 0.0944 |
| 47 | 238 -I | 0.1924 | 0.1158 | 0.0863 | 0.0701 | 0.1183 | 0.0932 | 0.1016 |
| 48 | 239 -I | 0.1732 | 0.1225 | 0.0802 | 0.0795 | 0.0897 | 0.096 | 0.1366 |
| 49 | 240 -I | 0.2325 | 0.1349 | 0.0862 | 0.0761 | 0.1251 | 0.1169 | 0.1631 |
| 50 | 241 -I | 0.1399 | 0.1157 | 0.0818 | 0.0725 | 0.1089 | 0.0968 | 0.0989 |
| 51 | 242 -I | 0.1375 | 0.1121 | 0.0771 | 0.0723 | 0.1958 | 0.0951 | 0.1078 |
| 52 | 243 -I | 0.1307 | 0.11 | 0.1043 | 0.0738 | 0.1692 | 0.0953 | 0.1092 |
| 53 | 244 -I | 0.1444 | 0.1196 | 0.0839 | 0.0779 | 0.1146 | 0.0904 | 0.1018 |
| 54 | 245 -I | 0.1393 | 0.1232 | 0.0763 | 0.0721 | 0.122 | 0.0918 | 0.1024 |
| 55 | 246 -I | 0.127 | 0.1444* | 0.0779 | 0.0695 | 0.1121 | 0.1023 | 0.1207 |
| 56 | 247 -I | 0.1719 | 0.1288 | 0.0769 | 0.0683 | 0.0946 | 0.1011 | 0.1417 |
| 57 | 248 -I | 0.2412 | 0.123 | 0.0787 | 0.0746 | 0.1353 | 0.1122 | 0.1714 |
| 58 | 249 -I | 0.1387 | 0.1097 | 0.0803 | 0.0724 | 0.0928 | 0.0951 | 0.1016 |
| 59 | 250 -I | 0.1387 | 0.1126 | 0.0753 | 0.0701 | 0.1056 | 0.092 | 0.1032 |
| 60 | 251 -I | 0.125 | 0.108 | 0.0766 | 0.0751 | 0.1144 | 0.0933 | 0.1007 |
| 61 | 252 -I | 0.12 | 0.1176 | 0.08 | 0.0743 | 0.0974 | 0.1026 | 0.0998 |
| 62 | 253 -I | 0.1529 | 0.1148 | 0.0758 | 0.0707 | 0.1214 | 0.0983 | 0.1026 |
| 63 | 254 -I | 0.1474 | 0.1152 | 0.0741 | 0.0699 | 0.1119 | 0.0923 | 0.1055 |
| 64 | 255 -I | 0.1685 | 0.1078 | 0.0792 | 0.0692 | 0.1046 | 0.0909 | 0.1324 |
| 65 | 256 -I | 0.2299 | 0.1187 | 0.0796 | 0.0979 | 0.129 | 0.1095 | 0.1593 |
| 66 | 257 -I | 0.1376 | 0.1064 | 0.0807 | 0.087 | 0.1178 | 0.1057 | 0.1063 |
| 67 | 258 -I | 0.1425 | 0.1103 | 0.0821 | 0.0817 | 0.1179 | 0.0864 | 0.146 |
| 68 | 259 -I | 0.1218 | 0.1189 | 0.0794 | 0.0798 | 0.1323 | 0.091 | 0.1131 |
| 69 | 260 -I | 0.1185 | 0.1106 | 0.0766 | 0.0711 | 0.1097 | 0.0835 | 0.099 |
| 70 | 261 -I | 0.1154 | 0.1091 | 0.078 | 0.0739 | 0.1073 | 0.0829 | 0.1005 |
| 71 | 262 -I | 0.1192 | 0.109 | 0.0748 | 0.0736 | 0.1025 | 0.0909 | 0.1128 |
| 72 | 263 -I | 0.1532 | 0.1148 | 0.0789 | 0.0684 | 0.106 | 0.0867 | 0.1377 |
| 73 | 264 -I | 0.23 | 0.1127 | 0.0866 | 0.0769 | 0.1263 | 0.1047 | 0.1368 |
| 74 | 265 -I | 0.1232 | 0.1006* | 0.0806 | 0.0761 | 0.1014 | 0.1113 | 0.1065 |
| 75 | 266 -I | 0.124 | 0.1147 | 0.0759 | 0.0704 | 0.113 | 0.0859 | 0.0986 |
| 76 | 267 -I | 0.1502 | 0.104 | 0.0785 | 0.0728 | 0.1295 | 0.0965 | 0.115 |
| 77 | 268 -I | 0.1154 | 0.1045 | 0.0757 | 0.0711 | 0.114 | 0.0898 | 0.0972 |
| 78 | 269 -I | 0.1184 | 0.1042 | 0.0752 | 0.0742 | 0.0939 | 0.0835 | 0.097 |
| 79 | 270 -I | 0.2143 | 0.1251 | 0.0812 | 0.0722 | 0.1267 | 0.0928 | 0.1211 |
| 80 | 271 -I | 0.1558 | 0.1052 | 0.0827 | 0.0659 | 0.1051 | 0.0652 | 0.1327 |
| 81 | 272 -I | 0.2978 | 0.1508* (a) | 0.0865 | 0.0833 | 0.117 | 0.1131 | 0.1649 |
| 82 | 273 -I | 0.163 | 0.1123 | 0.0771 | 0.0818 | 0.1233 | 0.0885 | 0.1105 |
| 83 | 274 -I | 0.1198 | 0.1112 | 0.0753 | 0.0794 | 0.1296 | 0.0915 | 0.101 |
| 84 | 275 -I | 0.1407 | 0.1105 | 0.0838 | 0.0704 | 0.127 | 0.0943 | 0.1183 |
| Controles | CP | 1.4107 | 2.3623 | 2.9889 | 2.6148 | 3.4368 | 2.5673 | 3.5457 |
| | CN | 0.1224 | 0.1112 | 0.0766 | 0.072 | 0.1086 | 0.0797 | 0.121 |
| Punto de Corte | | 0.22986743 | 0.16540533 | 0.10056673 | 0.09773242 | 0.1674902 | 0.14005314 | 0.16383835 |

Muestras en **negrita y sombreadas** dieron Positivo por DAS ELISA
 * Muestras seleccionadas para la detección por RT-PCR e IC-RT-PCR
 (a) Muestras negativas con valores de absorbancia cercanas al Punto de Corte

| Zona ICA | | | | | | | | |
|------------|---------|------------------------|---------|---------|--------|-------------|--------|--------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa IV | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLV | GfKv | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 1 -V | 2.1723 | 0.2554 | 0.4578 | 0.325 | 0.5521 | 0.2644 | 0.3684 |
| 2 | 2 -V | 1.6529 | 0.3116 | 0.4379 | 0.3665 | 3.5746 | 0.3698 | 0.4438 |
| 3 | 3 -V | 1.4121 | 0.2935 | 0.4482 | 0.3439 | 0.7494 | 0.297 | 0.3563 |
| 4 | 4 -V | 1.75 | 0.2897 | 0.6169 | 0.478 | 3.4693 | 0.277 | 0.4426 |
| 5 | 5 -V | 2.3744 | 0.2678 | 0.4962 | 0.3619 | 0.6568 | 0.3501 | 0.4432 |
| 6 | 6 -V | 1.6081 | 0.3056 | 0.4397 | 0.4227 | 3.7117 | 0.2889 | 0.364 |
| 7 | 7 -V | 1.8121 | 0.2638 | 0.4075 | 0.3241 | 1.148* (a) | 0.3023 | 0.3684 |
| 8 | 8 -V | 3.1586 | 0.3298 | 0.459 | 0.315 | 1.05* (a) | 0.3807 | 0.3277 |
| 9 | 9 -V | 0.9188 | 0.686 | 0.5072 | 0.3062 | 2.8815 | 0.3415 | 0.3324 |
| 10 | 10 -V | 0.6223 | 0.3648 | 0.5093 | 0.3538 | 0.6803 | 0.306 | 0.282 |
| 11 | 11 -V | 0.6486 | 0.3974 | 0.4603 | 0.3491 | 0.7487 | 0.2962 | 0.4328 |
| 12 | 12 -V | 0.6081 | 0.4001 | 0.4645 | 0.3342 | 0.745 | 0.2366 | 0.281 |
| 13 | 13 -V | 0.6822 | 0.3437 | 3.5914 | 0.3903 | 0.7714 | 0.2971 | 0.2872 |
| 14 | 14 -V | 0.6899 | 0.4498* | 0.7069 | 0.3181 | 0.6773 | 0.3264 | 0.3581 |
| 15 | 15 -V | 0.6892 | 0.364 | 0.4539 | 0.3674 | 0.5897 | 0.3211 | 0.2975 |
| 16 | 16 -V | 0.8296 | 0.3511 | 0.4547 | 0.3332 | 0.6582 | 0.3073 | 0.2917 |
| 17 | 17 -V | 0.6079 | 0.2056 | 0.4041 | 0.3453 | 0.8289 | 0.3042 | 0.2756 |
| 18 | 18 -V | 0.4668 | 0.2226 | 0.4754 | 0.3193 | 0.8121 | 0.3517 | 0.3091 |
| 19 | 19 -V | 0.6101 | 0.254 | 0.5282 | 0.3389 | 0.777 | 0.4174 | 0.3477 |
| 20 | 20 -V | 0.6758 | 0.2376 | 0.5234 | 0.3345 | 3.629 | 0.353 | 0.3456 |
| 21 | 21 -V | 0.6404 | 0.2427 | 0.4654 | 0.325 | 0.7874 | 0.3493 | 0.2912 |
| 22 | 22 -V | 0.4694 | 0.2954 | 0.4729 | 0.3438 | 0.562 | 0.4395 | 0.3076 |
| 23 | 23 -V | 0.4638 | 0.2155 | 0.4599 | 0.3496 | 0.6893 | 0.365 | 0.3191 |
| 24 | 24 -V | 0.5747 | 0.2295 | 0.4277 | 0.3203 | 0.6372 | 0.3177 | 0.3385 |
| 25 | 25 -V | 0.5457 | 0.4038 | 0.5177 | 0.3163 | 0.7538 | 0.3369 | 0.3442 |
| 26 | 26 -V | 0.6188 | 0.3653 | 0.5384 | 0.3473 | 0.8744 | 0.2922 | 0.3056 |
| 27 | 27 -V | 0.8846 | 0.3501 | 0.4864 | 0.3383 | 0.7419 | 0.2788 | 0.3228 |
| 28 | 28 -V | 0.3615 | 0.3799 | 0.5056 | 0.3473 | 0.7541 | 0.3556 | 0.3854 |
| 29 | 29 -V | 0.6389 | 0.344 | 0.4802 | 0.3443 | 1.1143* (a) | 0.3499 | 0.2906 |
| 30 | 30 -V | 0.5953 | 0.4251 | 0.4534 | 0.3275 | 0.6644 | 0.3779 | 0.3112 |
| 31 | 31 -V | 0.5246 | 0.3692 | 0.4921 | 0.3252 | 0.6675 | 0.4286 | 0.3068 |
| 32 | 32 -V | 0.6767 | 0.3542 | 0.4874 | 0.3515 | 0.7478 | 0.3678 | 0.3601 |
| 33 | 33 -V | 0.9239 | 0.2218 | 0.5791 | 0.3587 | 0.8212 | 0.2713 | 0.3433 |
| 34 | 34 -V | 0.8333 | 0.2017 | 0.5134 | 0.325 | 0.8289 | 0.2237 | 0.267 |

| Zona AREQUIPA | | | | | | | | |
|----------------|---------|------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa I | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLFV | GFKV | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 1-A | 0.1471 | 0.0863 | 0.0762 | 0.0939 | 0.1892 | 0.4858 | 0.4598 |
| 2 | 2-A | 0.1388 | 0.0816 | 0.074 | 0.0919 | 0.1655 | 0.4296 | 0.3901 |
| 3 | 3-A | 0.1207 | 0.0768 | 0.0752 | 0.09 | 0.1697 | 0.5319 | 0.4102 |
| 4 | 4-A | 0.1116 | 0.0784 | 0.0789 | 0.1218 | 0.1873 | 0.5298 | 0.3307 |
| 5 | 5-A | 0.1239 | 0.0846 | 0.0778 | 0.0893 | 0.1693 | 0.5233 | 0.3991 |
| 6 | 6-A | 0.1225 | 0.0768 | 0.0819 | 0.0877 | 0.1524 | 0.5524 | 0.3689 |
| 7 | 7-A | 0.1178 | 0.078 | 0.0877 | 0.0869 | 0.1847 | 0.5497 | 0.4094 |
| 8 | 8-A | 0.1624 | 0.0853 | 0.0868 | 0.1087 | 0.1946 | 0.5157 | 0.3351 |
| 9 | 9-A | 0.1325 | 0.0804* | 0.0734 | 0.089 | 0.167 | 0.479 | 0.4656 |
| 10 | 10-A | 0.1008 | 0.0767 | 0.0724 | 0.0809 | 0.1737 | 0.3103 | 0.4102 |
| 11 | 11-A | 0.0901 | 0.0736 | 0.0717 | 0.0872 | 0.1475 | 0.4266 | 0.3792 |
| 12 | 12-A | 0.0951 | 0.0777 | 0.081 | 0.0873 | 0.1658 | 0.4862 | 0.3366 |
| 13 | 13-A | 0.094 | 0.0724 | 0.0758 | 0.0891 | 0.195 | 0.524 | 0.4478 |
| 14 | 14-A | 0.0909 | 0.0744 | 0.0811 | 0.0573 | 0.151 | 0.551 | 0.4092 |
| 15 | 15-A | 0.0967 | 0.0776 | 0.0877 | 0.0542 | 0.1941 | 0.6096 | 0.4466 |
| 16 | 16-A | 0.1204 | 0.0759 | 0.071 | 0.0761 | 0.1687 | 0.5531 | 0.4067 |
| 17 | 17-A | 0.1147 | 0.076 | 0.0723 | 0.1043 | 0.1923 | 0.4742 | 0.343 |
| 18 | 18-A | 0.0972 | 0.0755 | 0.0736 | 0.0911 | 0.1779 | 0.3443 | 0.4106 |
| 19 | 19-A | 0.0874 | 0.0745 | 0.0737 | 0.0874 | 0.1585 | 0.4319 | 0.3456 |
| 20 | 20-A | 0.0866 | 0.0748 | 0.0743 | 0.0852 | 0.1815 | 0.4967 | 0.3528 |
| 21 | 21-A | 0.0898 | 0.0696 | 0.0815 | 0.1066 | 0.1649 | 0.5833 | 0.4064 |
| 22 | 22-A | 0.0874 | 0.0703 | 0.079 | 0.1688 | 0.1473 | 0.5438 | 0.3837 |
| 23 | 23-A | 0.0979 | 0.0749 | 0.078 | 0.1058 | 0.1907 | 0.624 | 0.4033 |
| 24 | 24-A | 0.1167 | 0.0725 | 0.0746 | 0.115 | 0.1718 | 0.5592 | 0.3818 |
| 25 | 25-A | 0.1172 | 0.0785 | 0.0732 | 0.1074 | 0.1736 | 0.4634 | 0.4075 |
| 26 | 26-A | 0.0921 | 0.0737 | 0.0756 | 0.0857 | 0.1418 | 0.2813 | 0.3731 |
| 27 | 27-A | 0.0872 | 0.0712 | 0.0756 | 0.0852 | 0.1893 | 0.4772 | 0.3131 |
| 28 | 28-A | 0.0868 | 0.0747 | 0.0789 | 0.093 | 0.1807 | 0.5913 | 0.3713 |
| 29 | 29-A | 0.0862 | 0.0739 | 0.0761 | 0.0868 | 0.1683 | 0.4874 | 0.3703 |
| 30 | 30-A | 0.0897 | 0.0729 | 0.0815 | 0.0873 | 0.1568 | 0.5575 | 0.4076 |
| 31 | 31-A | 0.089 | 0.0716 | 0.0815 | 0.0882 | 0.1913 | 0.5117 | 0.3608 |
| 32 | 32-A | 0.1044 | 0.0735 | 0.076 | 0.097 | 0.2084 | 0.4791 | 0.4721 |
| 33 | 33-A | 0.1056 | 0.0792* | 0.0743 | 0.1298 | 0.2789 | 0.5228 | 0.3632 |
| 34 | 34-A | 0.0919 | 0.0695 | 0.0791 | 0.0915 | 0.206 | 0.5057 | 0.379 |
| 35 | 35-A | 0.0832 | 0.0693 | 0.0776 | 0.0902 | 0.1744 | 0.508 | 0.3066 |
| 36 | 36-A | 0.0798 | 0.0722 | 0.0748 | 0.0861 | 0.1516 | 0.3731 | 0.2825 |
| 37 | 37-A | 0.0805 | 0.0726 | 0.0772 | 0.0887 | 0.1443 | 0.4328 | 0.3155 |
| 38 | 38-A | 0.0852 | 0.0732 | 0.0893 | 0.0874 | 0.1824 | 0.4741 | 0.3707 |
| 39 | 39-A | 0.0857 | 0.0873 | 0.0823 | 0.0861 | 0.2127 | 0.6191 | 0.398 |
| 40 | 40-A | 0.1022 | 0.0713 | 0.0779 | 0.085 | 0.2953 | 0.5482 | 0.4293 |
| 41 | 41-A | 0.1018 | 0.0754 | 0.0736 | 0.0903 | 0.1806 | 0.3682 | 0.3158 |
| 42 | 42-A | 0.0935 | 0.0692 | 0.0721 | 0.0864 | 0.2031 | 0.5135 | 0.3918 |
| 43 | 43-A | 0.0833 | 0.0752 | 0.0734 | 0.0977 | 0.183 | 0.4174 | 0.3189 |
| 44 | 44-A | 0.0819 | 0.0737 | 0.0755 | 0.0819 | 0.1629 | 0.3868 | 0.3144 |
| 45 | 45-A | 0.084 | 0.0717 | 0.0953 | 0.0882 | 0.1701 | 0.7369 | 0.3446 |
| 46 | 46-A | 0.0848 | 0.0724 | 0.0847 | 0.091 | 0.3182 | 0.6469 | 0.377 |
| 47 | 47-A | 0.0851 | 0.069 | 0.0806 | 0.0918 | 0.187 | 0.5871 | 0.3225 |
| 48 | 48-A | 0.0971 | 0.0709 | 0.074 | 0.0901 | 0.2675 | 0.6024 | 0.3188 |
| 49 | 49-A | 0.1047 | 0.0738 | 0.0762 | 0.1014 | 0.18 | 0.4831 | 0.5604 |
| 50 | 50-A | 0.0922 | 0.0675 | 0.0814 | 0.0892 | 0.1847 | 0.5555 | 0.4232 |
| 51 | 51-A | 0.0897 | 0.0719 | 0.0791 | 0.0921 | 0.261 | 0.5687 | 0.3491 |
| 52 | 52-A | 0.0841 | 0.0709 | 0.1051 | 0.0925 | 0.2119 | 0.5171 | 0.3581 |
| 53 | 53-A | 0.0887 | 0.0678 | 0.0772 | 0.0874 | 0.1947 | 0.5641 | 0.4034 |
| 54 | 54-A | 0.0811 | 0.0692 | 0.0808 | 0.0835 | 0.1588 | 0.4749 | 0.3178 |
| 55 | 55-A | 0.089 | 0.0707 | 0.0908 | 0.0863 | 0.1888 | 0.6073 | 0.3649 |
| 56 | 56-A | 0.1155 | 0.0729 | 0.0728 | 0.0819 | 0.0735 | 0.5721 | 0.4072 |
| 57 | 57-A | 0.1085 | 0.0759 | 0.0748 | 0.0997 | 0.1755 | 0.4403 | 0.4026 |
| 58 | 58-A | 0.0928 | 0.0691 | 0.075 | 0.0914 | 0.1539 | 0.4285 | 0.4206 |
| 59 | 59-A | 0.0836 | 0.072 | 0.0776 | 0.0844 | 0.1328 | 0.4623 | 0.4032 |
| 60 | 60-A | 0.0812 | 0.0767 | 0.0918 | 0.0874 | 0.1537 | 0.5721 | 0.3738 |
| 61 | 61-A | 0.0849 | 0.0744 | 0.0883 | 0.128 | 1.5725* | 0.5281 | 0.3771 |
| 62 | 62-A | 0.0854 | 0.0703 | 0.0784 | 0.1026 | 1.4156 | 0.5112 | 0.3785 |
| 63 | 63-A | 0.0937 | 0.0635* | 0.081 | 0.1075 | 0.4961* | 0.6871 | 0.5503 |
| 64 | 64-A | 0.1029 | 0.0712 | 0.0737 | 0.0825 | 0.1644 | 0.4948 | 0.6828 |
| 65 | 65-A | 0.1203 | 0.0732 | 0.086 | 0.1951 | 0.2172 | 0.4709 | 0.4131 |
| 66 | 66-A | 0.1137 | 0.0749 | 0.0714 | 0.0928 | 0.3057 | 0.4556 | 0.5735 |
| 67 | 67-A | 0.098 | 0.0752 | 0.0764 | 0.0825 | 0.4935* | 0.4462 | 0.5299 |
| 68 | 68-A | 0.0884 | 0.075 | 0.0801 | 0.0859 | 0.1974 | 0.5027 | 0.336 |
| 69 | 69-A | 0.0881 | 0.0705 | 0.0819 | 0.097 | 0.181 | 0.5658 | 0.2768 |
| 70 | 70-A | 0.0915 | 0.0674 | 0.0791 | 0.0948 | 0.2732 | 0.569 | 0.2371 |
| 71 | 71-A | 0.0903 | 0.0704 | 0.0787 | 0.0874 | 0.0485 | 0.6003 | 0.2814 |
| 72 | 72-A | 0.1161 | 0.0704 | 0.0701 | 0.0843 | 0.1746 | 0.5998 | 0.2849 |
| 73 | 73-A | 0.0994 | 0.0724 | 0.0731 | 0.0922 | 0.8461* | 0.4243 | 0.4016 |
| 74 | 74-A | 0.0918 | 0.0666 | 0.1381 | 0.0912 | 1.0703* | 0.4116 | 0.467 |
| 75 | 75-A | 0.0862 | 0.0711 | 0.0752 | 0.0885 | 0.1685 | 0.4427 | 0.3851 |
| 76 | 76-A | 0.0849 | 0.073 | 0.075 | 0.083 | 0.1599 | 0.3956 | 0.3472 |
| 77 | 77-A | 0.0855 | 0.0745 | 0.081 | 0.0988 | 0.5374 | 0.471 | 0.3416 |
| 78 | 78-A | 0.0893 | 0.0706 | 0.0832 | 0.0901 | 0.3308 | 0.4368 | 0.3408 |
| 79 | 79-A | 0.094 | 0.0906* | 0.0742 | 0.1019 | 0.2186* | 0.4714 | 0.3919 |
| 80 | 80-A | 0.121 | 0.0746 | 0.0863 | 0.122 | 0.5162* | 0.5852 | 0.4782 |
| 81 | 81-A | 0.1057 | 0.0747 | 0.0805 | 0.0963 | 0.4217* | 0.3124 | 0.4721 |
| 82 | 82-A | 0.1013 | 0.0683 | 0.0853 | 0.107 | 0.1975 | 0.3672 | 0.4182 |
| 83 | 83-A | 0.0858 | 0.0701 | 0.0823 | 0.094 | 0.7005 | 0.4134 | 0.5061 |
| 84 | 84-A | 0.0868 | 0.0696 | 0.0802 | 0.0955 | 0.4826* | 0.5529 | 0.3604 |
| 85 | 85-A | 0.1064 | 0.0702 | 0.0847 | 0.1099 | 0.2631 | 0.4559 | 0.3724 |
| 86 | 86-A | 0.0929 | 0.0679 | 0.078 | 0.1006 | 0.2414* | 0.4313 | 0.3002 |
| 87 | 87-A | 0.0945 | 0.072 | 0.0765 | 0.0829 | 0.1683 | 0.4567 | 0.3625 |
| 88 | 88-A | 0.1279 | 0.0746 | 0.0721 | 0.0889 | 0.1642 | 0.3971 | 0.4165 |
| 89 | 89-A | 0.1383 | 0.0811 | 0.0774 | 0.0882 | 0.165 | 0.3681 | 0.6966 |
| 90 | 90-A | 0.1222 | 0.0741 | 0.0753 | 0.1097 | 0.1784 | 0.3568 | 0.6981 |
| Controles | CP | 1.8988 | 2.0782 | 3.0309 | 3.5532 | 2.1643 | 3.7027 | 2.0296 |
| | CN | 0.1004 | 0.0739 | 0.0742 | 0.0844 | 0.1061 | 0.3236 | 0.2374 |
| Punto de Corte | | 0.15893215 | 0.09636535 | 0.10339308 | 0.1409705 | 0.3570067 | 0.82517155 | 0.62956781 |

Muestras en **negrita y sombreadas** dieron Positivo por DAS ELISA

* Muestras seleccionadas para la detección por RT-PCR e IC-RT-PCR

| Zona AREQUIPA | | | | | | | | |
|---------------|---------|------------------------|---------|---------|--------|---------|---------------|---------------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa II | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLFV | GFKV | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 91-A | 0.321 | 0.1081 | 0.0816 | 0.0731 | 0.1241 | 0.1723 | 0.1115 |
| 2 | 92-A | 0.1861 | 0.1102 | 0.0761 | 0.0729 | 0.1081 | 0.1606 | 0.0954 |
| 3 | 93-A | 0.1515 | 0.1017 | 0.0694 | 0.0758 | 0.1231 | 0.2694 | 0.1101 |
| 4 | 94-A | 0.1412 | 0.0988 | 0.0691 | 0.0765 | 0.1397 | 0.1697 | 0.0995 |
| 5 | 95-A | 0.1301 | 0.1002 | 0.0696 | 0.0662 | 0.1008 | 0.1758 | 0.094 |
| 6 | 96-A | 0.1434 | 0.1598 | 0.0723 | 0.0717 | 0.1108 | 0.2009 | 0.092 |
| 7 | 97-A | 0.1732 | 0.1063 | 0.0722 | 0.0672 | 0.1128 | 0.2021 | 0.098 |
| 8 | 98-A | 0.3507 | 0.1049 | 0.0684 | 0.0624 | 0.1137 | 0.2028 | 0.1353 |
| 9 | 99-A | 0.1578 | 0.1089 | 0.0791 | 0.0886 | 0.1384* | 0.1836 | 0.092 |
| 10 | 100-A | 0.0845 | 0.1113 | 0.0745 | 0.0696 | 0.1193 | 0.155 | 0.0865 |
| 11 | 101-A | 0.089 | 0.0966 | 0.0711 | 0.0676 | 0.1109 | 0.2021 | 0.0997 |
| 12 | 102-A | 0.0836 | 0.0927 | 0.0714 | 0.072 | 0.1038 | 0.1509 | 0.0876 |
| 13 | 103-A | 0.1006 | 0.1028 | 0.0695 | 0.0674 | 0.1244 | 0.1387 | 0.0837 |
| 14 | 104-A | 0.0948 | 0.1037 | 0.0701 | 0.0692 | 0.0991 | 0.1405 | 0.0783 |
| 15 | 105-A | 0.1215 | 0.1125 | 0.0726 | 0.0655 | 0.1248 | 0.1845 | 0.081 |
| 16 | 106-A | 0.1937 | 0.103 | 0.0664 | 0.0616 | 0.102 | 0.1694 | 0.0951 |
| 17 | 107-A | 0.1344 | 0.1022 | 0.0777 | 0.0717 | 0.1062 | 0.1281 | 0.0962 |
| 18 | 108-A | 0.0842 | 0.0951 | 0.0762 | 0.0704 | 0.1126 | 0.1713 | 0.085 |
| 19 | 109-A | 0.2284 | 0.1596 | 0.0646 | 0.067 | 0.1425 | 0.1503 | 0.1105 |
| 20 | 110-A | 0.0816 | 0.0934 | 0.0746 | 0.0648 | 0.1027 | 0.1363 | 0.0816 |
| 21 | 111-A | 0.0892 | 0.0944 | 0.0719 | 0.0655 | 0.1057 | 0.1208 | 0.0882 |
| 22 | 112-A | 0.0919 | 0.0933 | 0.0723 | 0.0716 | 0.0992 | 0.1439 | 0.0804 |
| 23 | 113-A | 0.0859 | 0.0982 | 0.0698 | 0.0692 | 0.1164 | 0.2829 | 0.0798 |
| 24 | 114-A | 0.0884 | 0.0956 | 0.069 | 0.0705 | 0.1012 | 0.3899 | 0.0755 |
| 25 | 115-A | 0.1529 | 0.1067 | 0.0699 | 0.0709 | 0.0969 | 0.1616 | 0.1028 |
| 26 | 116-A | 0.1156 | 0.1355 | 0.0787 | 0.0785 | 0.0963 | 0.1784 | 0.0769 |
| 27 | 117-A | 0.0777 | 0.1432 | 0.0714 | 0.0748 | 0.093 | 0.1489 | 0.0793 |
| 28 | 118-A | 0.0895 | 0.134 | 0.0719 | 0.0718 | 0.1092 | 0.1976 | 0.0803 |
| 29 | 119-A | 0.0872 | 0.1386 | | | | | |

| Zona AREQUIPA | | | | | | | | |
|----------------|---------|------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa III | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLFV | GfKv | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 181 - A | 0.3434 | 0.186 | 0.1119 | 0.0798 | 0.1822 | 0.267 | 0.1965 |
| 2 | 182 - A | 0.2765 | 0.1494 | 0.1099 | 0.0817 | 0.1315 | 0.4188 | 0.2313 |
| 3 | 183 - A | 0.2303 | 0.1274 | 0.1017 | 0.0751 | 0.1286 | 0.2978 | 0.2629 |
| 4 | 184 - A | 0.2412 | 0.1358 | 0.1095 | 0.0797 | 0.1587 | 0.2669 | 0.2819 |
| 5 | 185 - A | 0.2681 | 0.1195 | 0.1136 | 0.1142 | 0.1338 | 0.2743 | 0.2862 |
| 6 | 186 - A | 0.2556 | 0.127 | 0.1355 | 0.0745 | 0.138 | 0.2821 | 0.2707 |
| 7 | 187 - A | 0.2572 | 0.1264 | 0.1246 | 0.0796 | 0.1554 | 0.3035 | 0.2824 |
| 8 | 188 - A | 0.8465 | 0.1627* | 0.108 | 0.066 | 0.1829* | 0.2898 | 0.3044 |
| 9 | 189 - A | 0.2307 | 0.1305 | 0.143 | 0.081 | 0.1309 | 0.2597 | 0.2391 |
| 10 | 190 - A | 0.1253 | 0.1159 | 0.102 | 0.1006 | 0.1328 | 0.209 | 0.1256 |
| 11 | 191 - A | 0.1307 | 0.111 | 0.1679 | 0.0725 | 0.1236 | 0.2379 | 0.1947 |
| 12 | 192 - A | 0.1207 | 0.1042 | 0.0526 | 0.0877 | 0.1675 | 0.2384 | 0.2529 |
| 13 | 193 - A | 0.1249 | 0.1014 | 0.1287 | 0.0955 | 0.1559 | 0.3219 | 0.2532 |
| 14 | 194 - A | 0.1375 | 0.1115 | 0.0779 | 0.0714 | 0.1057 | 0.2446 | 0.2614 |
| 15 | 195 - A | 0.1479 | 0.1059 | 0.1238 | 0.083 | 0.1449 | 0.2376 | 0.2621 |
| 16 | 196 - A | 0.2358 | 0.1137 | 0.0995 | 0.0688 | 0.0902 | 0.2474 | 0.255 |
| 17 | 197 - A | 0.2411 | 0.1116 | 0.192 | 0.1053 | 0.2615 | 0.2424 | 0.2438 |
| 18 | 198 - A | 0.1115 | 0.1043 | 0.093 | 0.0908 | 0.1358 | 0.2495 | 0.1517 |
| 19 | 199 - A | 0.1055 | 0.0999 | 0.0944 | 0.0725 | 0.1537 | 0.319 | 0.2366 |
| 20 | 200 - A | 0.1488 | 0.1003 | 0.0929 | 0.0812 | 0.1712 | 0.2428 | 0.2379 |
| 21 | 201 - A | 0.1067 | 0.1167 | 0.1127 | 0.0776 | 0.1508 | 0.2779 | 0.245 |
| 22 | 202 - A | 0.1106 | 0.0983 | 0.0945 | 0.0668 | 0.1382 | 0.2701 | 0.2279 |
| 23 | 203 - A | 0.1231 | 0.0956* | 0.1272 | 0.0621 | 0.1142 | 0.2443 | 0.2424 |
| 24 | 204 - A | 0.1663 | 0.1556 | 0.1017 | 0.0638 | 0.1341 | 0.2509 | 0.2533 |
| 25 | 205 - A | 0.3085 | 0.1143 | 0.1117 | 0.0728 | 0.1197 | 0.2403 | 0.2117 |
| 26 | 206 - A | 0.1266 | 0.1098 | 0.1141 | 0.0611 | 0.1552 | 0.2818 | 0.2065 |
| 27 | 207 - A | 0.1043 | 0.1053 | 0.1028 | 0.0671 | 0.1694 | 0.2878 | 0.1491 |
| 28 | 208 - A | 0.1294 | 0.1095 | 0.0943 | 0.1777 | 0.1219 | 0.3052 | 0.1639 |
| 29 | 209 - A | 0.1141 | 0.1005 | 0.0918 | 0.07 | 0.1332 | 0.3016 | 0.2376 |
| 30 | 210 - A | 0.169 | 0.1059 | 0.0915 | 0.0747 | 0.1427 | 0.2918 | 0.2294 |
| 31 | 211 - A | 0.1239 | 0.0979 | 0.1588 | 0.0675 | 0.1435 | 0.2861 | 0.2483 |
| 32 | 212 - A | 0.1521 | 0.1033 | 0.1149 | 0.0546 | 0.1461 | 0.2561 | 0.2525 |
| 33 | 213 - A | 0.1921 | 0.1128 | 0.1119 | 0.0777 | 0.1213 | 0.2666 | 0.2412 |
| 34 | 214 - A | 0.1238 | 0.1039 | 0.1042 | 0.0734 | 0.1277 | 0.326 | 0.2213 |
| 35 | 215 - A | 0.1244 | 0.1068 | 0.1179 | 0.0749 | 0.1376 | 0.2843 | 0.3784 |
| 36 | 216 - A | 0.1263 | 0.1275 | 0.1964 | 0.0758 | 0.1296 | 0.3061 | 0.2183 |
| 37 | 217 - A | 0.1137 | 0.163 | 0.0952 | 0.0748 | 0.1383 | 0.3368 | 0.4242 |
| 38 | 218 - A | 0.105 | 0.1024 | 0.1309 | 0.08 | 0.1506 | 0.2889 | 0.2198 |
| 39 | 219 - A | 0.1755 | 0.0972 | 0.0969 | 0.0881 | 0.1572 | 0.3078 | 0.2317 |
| 40 | 220 - A | 0.1307 | 0.1085 | 0.0988 | 0.0811 | 0.1119 | 0.2517 | 0.2576 |
| 41 | 221 - A | 0.2175 | 0.0999 | 0.121 | 0.0817 | 0.1206 | 0.2217 | 0.2151 |
| 42 | 222 - A | 0.1143 | 0.1133 | 0.1128 | 0.0888 | 0.1178 | 0.2114 | 0.2758 |
| 43 | 223 - A | 0.1323 | 0.099 | 0.1398 | 0.0912 | 0.1249 | 0.229 | 0.235 |
| 44 | 224 - A | 0.1006 | 0.1036 | 0.1257 | 0.0755 | 0.1168 | 0.2097 | 0.225 |
| 45 | 225 - A | 0.1836 | 0.1511 | 0.1106 | 0.0847 | 0.1252 | 0.2194 | 0.2108 |
| 46 | 226 - A | 0.1261 | 0.137* | 0.1267 | 0.0725 | 0.1268 | 0.213 | 0.2437 |
| 47 | 227 - A | 0.1431 | 0.1014 | 0.1017 | 0.08 | 0.1271 | 0.2622 | 0.2432 |
| 48 | 228 - A | 0.1166 | 0.0971 | 0.2212 | 0.0842 | 0.155 | 0.2599 | 0.2314 |
| 49 | 229 - A | 0.2009 | 0.1067 | 0.1167 | 0.0779 | 0.1344 | 0.3035 | 0.1359 |
| 50 | 230 - A | 0.1094 | 0.1128 | 0.2196 | 0.3103 | 0.1274 | 0.2236 | 0.0484 |
| 51 | 231 - A | 0.1173 | 0.1235 | 0.1004 | 0.0895 | 0.1297 | 0.2553 | 0.2391 |
| 52 | 232 - A | 0.1229 | 0.1021 | 0.1164 | 0.0756 | 0.1233 | 0.237 | 0.0933 |
| 53 | 233 - A | 0.1079 | 0.1073 | 0.1214 | 0.0719 | 0.1097 | 0.2172 | 0.2097 |
| 54 | 234 - A | 0.1071 | 0.1086 | 0.097 | 0.0887 | 0.1195 | 0.2331 | 0.3038 |
| 55 | 235 - A | 0.1163 | 0.1013 | 0.1164 | 0.0756 | 0.1534 | 0.2524 | 0.237 |
| 56 | 236 - A | 0.1253 | 0.0972 | 0.0903 | 0.0726 | 0.106 | 0.2944 | 0.238 |
| 57 | 237 - A | 0.0544 | 0.1254 | 0.1441 | 0.0833 | 0.1222 | 0.2415 | 0.3976 |
| 58 | 238 - A | 0.1047 | 0.1044 | 0.1906 | 0.0895 | 0.1101 | 0.2401 | 0.8687 |
| 59 | 239 - A | 0.0861 | 0.1008 | 0.1042 | 0.0849 | 0.124 | 0.2451 | 0.8685 |
| 60 | 240 - A | 0.1154 | 0.1294 | 0.4886 | 0.0725 | 0.1226 | 0.2328 | 0.465 |
| 61 | 241 - A | 0.1211 | 0.105 | 0.1128 | 0.0738 | 0.0851 | 0.2243 | 0.327 |
| 62 | 242 - A | 0.1145 | 0.1014 | 0.1403 | 0.0751 | 0.1145 | 0.285 | 0.3096 |
| 63 | 243 - A | 0.1195 | 0.0997 | 0.15 | 0.0739 | 0.1449 | 0.2524 | 0.2492 |
| 64 | 244 - A | 0.1526 | 0.1533 | 0.1215 | 0.074 | 0.1464 | 0.2615 | 0.2579 |
| 65 | 245 - A | 0.2098 | 0.1256 | 0.1559 | 0.085 | 0.1315 | 0.2574 | 0.1137 |
| 66 | 246 - A | 0.1467 | 0.1057 | 0.1471 | 0.0783 | 0.1291 | 0.2207 | 0.1108 |
| 67 | 247 - A | 0.1206 | 0.102 | 0.1386 | 0.0852 | 0.1282 | 0.2144 | 0.1591 |
| 68 | 248 - A | 0.1107 | 0.1189 | 0.1157 | 0.075 | 0.2764 | 0.2131 | 0.091 |
| 69 | 249 - A | 0.1301 | 0.1277 | 0.1066 | 0.0881 | 0.1533 | 0.2551 | 0.1093 |
| 70 | 250 - A | 0.1125 | 0.1093 | 0.1095 | 0.0774 | 0.2361* | 0.2613 | 0.1071 |
| 71 | 251 - A | 0.1197 | 0.1101 | 0.1171 | 0.075 | 0.0966 | 0.4375 | 0.1109 |
| 72 | 252 - A | 0.1791 | 0.1055 | 0.1945 | 0.0867 | 0.1078 | 0.2608 | 0.1118 |
| 73 | 253 - A | 0.1937 | 0.1162 | 0.1193 | 0.077 | 0.1496 | 0.2393 | 0.1993 |
| 74 | 254 - A | 0.1577 | 0.1352 | 0.1583 | 0.0792 | 0.1575 | 0.2272 | 0.1286 |
| 75 | 255 - A | 0.1372 | 0.101 | 0.1681 | 0.0732 | 0.1661 | 0.2033 | 0.3091 |
| 76 | 256 - A | 0.1243 | 0.1094 | 0.1684 | 0.0744 | 0.1416 | 0.2291 | 0.2322 |
| 77 | 257 - A | 0.1521 | 0.1357 | 0.1258 | 0.0849 | 0.4138* | 0.2534 | 0.2264 |
| 78 | 258 - A | 0.1298 | 0.1128 | 0.1264 | 0.074 | 0.2136 | 0.3971 | 0.2326 |
| 79 | 259 - A | 0.1415 | 0.1244 | 0.16 | 0.0734 | 0.0845* | 0.5705 | 0.2462 |
| 80 | 260 - A | 0.3415 | 0.111 | 0.1071 | 0.0862 | 0.1624 | 0.3523 | 0.2466 |
| 81 | 261 - A | 0.2525 | 0.118 | 0.1067 | 0.0773 | 0.1431 | 0.2967 | 0.359 |
| 82 | 262 - A | 0.2691 | 0.1612 | 0.2195 | 0.0785 | 0.1565 | 0.2365 | 0.3299 |
| 83 | 263 - A | 0.2188 | 0.155 | 0.1188 | 0.0853 | 0.1531 | 0.2338 | 0.2599 |
| 84 | 264 - A | 0.1443 | 0.1153 | 0.1171 | 0.0875 | 0.1973* | 0.2411 | 0.2686 |
| 85 | 265 - A | 0.1126 | 0.1453* | 0.1031 | 0.0729 | 0.1706 | 0.2701 | 0.4845 |
| 86 | 266 - A | 0.1397 | 0.1115 | 0.1063 | 0.0776 | 0.1729 | 0.2719 | 0.5793 |
| 87 | 270 - A | 0.1248 | 0.1042 | 0.1413 | 0.086 | 0.1631 | 0.2304 | 0.4086 |
| 88 | 271 - A | 0.4196 | 0.157* | 0.0973 | 0.0862 | 0.2142*(a) | 0.2811 | 0.908 |
| 89 | 273 - A | 0.2187 | 0.1299 | 0.097 | 0.0804 | 0.1627 | 0.2354 | 0.8905 |
| 90 | 275 - A | 0.3203 | 0.4886* | 0.1044 | 0.0884 | 0.2588 | 0.226 | 0.8843 |
| 91 | 277 - A | 0.3963 | 0.1211 | 0.0918 | 0.077 | 0.2548* | 0.2145 | 0.8693 |
| Controles | CP | 3.3693 | 2.2327 | 3.5153 | 2.4592 | 2.1852 | 2.2301 | 3.2806 |
| | CN | 0.1307 | 0.0954 | 0.0835 | 0.0924 | 0.148 | 0.1995 | 0.2379 |
| Punto de Corte | | 0.37607481 | 0.18556732 | 0.21943902 | 0.11403355 | 0.23507986 | 0.39694379 | 0.52525877 |

Muestras **en negrita y sombreadas** dieron Positivo por DAS ELISA
 * Muestras seleccionadas para la detección por RT-PCR e IC-RT-PCR
 (a) Muestras negativas con valores de absorbancia cercanas al Punto de Corte

| Zona AREQUIPA | | | | | | | | |
|---------------|---------|------------------------|----------------|---------|--------|----------------|--------|--------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa IV | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLFV | GfKv | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 300 - A | 0.1761 | 0.114* | 0.0819 | 0.0919 | 0.1376* | 0.4032 | 0.1575 |
| 2 | 301 - A | 0.147 | 0.0948 | 0.0786 | 0.0839 | 0.1018 | 0.4395 | 0.1493 |
| 3 | 302 - A | 0.1501 | 0.0932 | 0.0795 | 0.0886 | 0.1073 | 0.382 | 0.1497 |
| 4 | 303 - A | 0.1267 | 0.096*(a) | 0.0798 | 0.0843 | 0.1013* | 0.3327 | 0.1555 |
| 5 | 304 - A | 0.1306 | 0.0856 | 0.0761 | 0.0837 | 0.0973 | 0.3215 | 0.1398 |
| 6 | 305 - A | 0.1244 | 0.088 | 0.0829 | 0.0849 | 0.0969 | 0.3428 | 0.1309 |
| 7 | 306 - A | 0.1527 | 0.0917 | 0.0771 | 0.0919 | 0.1102 | 0.4368 | 0.1537 |
| 8 | 307 - A | 0.3433 | 0.1246* | 0.0767 | 0.0807 | 0.1068* | 0.4329 | 0.1672 |
| 9 | 308 - A | 0.1535 | 0.0957 | 0.0798 | 0.0825 | 0.1203*(a) | 0.3011 | 0.1423 |
| 10 | 309 - A | 0.0988 | 0.0756 | 0.0716 | 0.0814 | 0.1034 | 0.248 | 0.108 |
| 11 | 310 - A | 0.1003 | 0.0768 | 0.0852 | 0.0841 | 0.0986 | 0.2614 | 0.1211 |
| 12 | 311 - A | 0.0989 | 0.0775 | 0.0756 | 0.0792 | 0.106 | 0.3338 | 0.1252 |
| 13 | 312 - A | 0.0952 | 0.0947 | 0.0842 | 0.077 | 0.1114 | 0.2899 | 0.1141 |
| 14 | 313 - A | 0.0962 | 0.0761 | 0.0748 | 0.0817 | 0.1051 | 0.3386 | 0.1319 |
| 15 | 314 - A | 0.1068 | 0.0754 | 0.0739 | 0.0796 | 0.1107 | 0.3263 | 0.1388 |
| 16 | 315 - A | 0.1886 | 0.0818 | 0.0729 | 0.074 | 0.1096 | 0.2818 | 0.1179 |
| 17 | 316 - A | 0.119 | 0.097 | 0.0781 | 0.0816 | 0.1172 | 0.335 | 0.1684 |
| 18 | 317 - A | 0.0935 | 0.0821 | 0.072 | 0.076 | 0.0855 | 0.2905 | 0.1214 |
| 19 | 318 - A | 0.0865 | 0.0812 | 0.0839 | 0.0821 | 0.0944 | 0.3429 | 0.1332 |
| 20 | 319 - A | 0.0834 | 0.0803 | 0.0723 | 0.0806 | 0.0954 | 0.3371 | 0.1341 |
| 21 | 324 - A | 0.0848 | 0.0785 | 0.0725 | 0.0773 | 0.0918 | 0.321 | 0.1219 |
| 22 | 325 - A | 0.0847 | 0.0821 | 0.0764 | 0.0794 | 0.1025 | 0.3019 | 0.1283 |
| 23 | 326 - A | 0.0826 | 0.0844 | 0.0708 | 0.0799 | 0.0875 | 0.3073 | 0.1256 |
| 24 | 327 - A | 0.1013 | 0.1153* | 0.0708 | 0.0739 | 0.0943* | 0.2959 | 0.1178 |
| 25 | 328 - A | 0.1032 | 0.0916 | 0.0762 | 0.0785 | 0.1006 | 0 | |

| Zona ICA-TACNA-AREQUIPA | | | | | | | | |
|-------------------------|---------|------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa IV | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GLV | GFkV | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 181 - I | 0.1174 | 0.16 | 0.0787 | 0.081 | 0.1483 | 0.1322 | 0.3879 |
| 2 | 184 - I | 0.1095 | 0.1376 | 0.0766 | 0.0798 | 0.197 | 0.1268 | 0.1864 |
| 3 | 185 - I | 0.103 | 0.1209 | 0.0764 | 0.0758 | 0.195 | 0.1054 | 0.1485 |
| 4 | 186 - I | 0.0901 | 0.0952 | 0.0735 | 0.077 | 0.1028 | 0.0981 | 0.1072 |
| 5 | 187 - I | 0.1055 | 0.1204 | 0.0732 | 0.0775 | 0.1078 | 0.1132 | 0.1299 |
| 6 | 188 - I | 0.1085 | 0.1244 | 0.0729 | 0.0791 | 0.1282 | 0.1201 | 0.1356 |
| 7 | 189 - I | 0.139 | 0.132 | 0.0758 | 0.0768 | 0.1471 | 0.1135 | 0.135 |
| 8 | 190 - I | 0.1385 | 0.1086 | 0.0708 | 0.0756 | 0.1353 | 0.1176 | 0.1295 |
| 9 | 191 - I | 0.1285 | 0.1472 | 0.0803 | 0.0855 | 0.155 | 0.1287 | 0.1988 |
| 10 | 192 - I | 0.0908 | 0.1294 | 0.075 | 0.0756 | 0.1449 | 0.1086 | 0.1506 |
| 11 | 193 - I | 0.0941 | 0.135 | 0.0786 | 0.0802 | 0.1477 | 0.1024 | 0.1374 |
| 12 | 194 - I | 0.096 | 0.1243 | 0.0756 | 0.0798 | 0.1291 | 0.1124 | 0.1159 |
| 13 | 195 - I | 0.084 | 0.1071 | 0.0732 | 0.0741 | 0.104 | 0.0878 | 0.1093 |
| 14 | 196 - I | 0.0916 | 0.1278 | 0.0988 | 0.0794 | 0.1469 | 0.1039 | 0.13 |
| 15 | 197 - I | 0.1233 | 0.12 | 0.0764 | 0.0769 | 0.1353 | 0.1025 | 0.123 |
| 16 | 198 - I | 0.1062 | 0.1074 | 0.0754 | 0.0739 | 0.0981 | 0.1078 | 0.1128 |
| 17 | 199 - I | 0.1296 | 0.1509 | 0.0781 | 0.076 | 0.1434 | 0.115 | 0.1931 |
| 18 | 200 - I | 0.0951 | 0.1294 | 0.0783 | 0.0803 | 0.2009 | 0.1122 | 0.1353 |
| 19 | 201 - I | 0.0899 | 0.1047 | 0.075 | 0.0733 | 0.1001 | 0.0753 | 0.1106 |
| 20 | 202 - I | 0.0914 | 0.1077 | 0.0753 | 0.07 | 0.0977 | 0.098 | 0.1149 |
| 21 | 203 - I | 0.089 | 0.1298 | 0.0735 | 0.0708 | 0.1112 | 0.1026 | 0.1243 |
| 22 | 204 - I | 0.0917 | 0.108 | 0.0722 | 0.0698 | 0.1339 | 0.1048 | 0.1163 |
| 23 | 205 - I | 0.0882 | 0.1284 | 0.0729 | 0.0704 | 0.1455 | 0.1132 | 0.1342 |
| 24 | 206 - I | 0.1054 | 0.1008 | 0.07 | 0.069 | 0.0937 | 0.0871 | 0.1088 |
| 25 | 207 - I | 0.1296 | 0.1224 | 0.0774 | 0.0739 | 0.1048 | 0.109 | 0.1403 |
| 26 | 208 - I | 0.0915 | 0.1084 | 0.0741 | 0.0727 | 0.0999 | 0.0877 | 0.1063 |
| 27 | 209 - I | 0.0947 | 0.1161 | 0.0749 | 0.0724 | 0.0914 | 0.0871 | 0.1079 |
| 28 | 210 - I | 0.0891 | 0.1027 | 0.0711 | 0.0712 | 0.1047 | 0.1059 | 0.1063 |
| 29 | 211 - I | 0.0837 | 0.1067 | 0.0735 | 0.072 | 0.0986 | 0.0941 | 0.1111 |
| 30 | 212 - I | 0.0916 | 0.1187 | 0.0754 | 0.0711 | 0.1239 | 0.1062 | 0.1175 |
| 31 | 213 - I | 0.0886 | 0.1074 | 0.0743 | 0.0725 | 0.1078 | 0.0853 | 0.1029 |
| 32 | 214 - I | 0.119 | 0.1022 | 0.0729 | 0.0698 | 0.1322 | 0.0977 | 0.1152 |
| 33 | 215 - I | 0.1431 | 0.1739* | 0.0795 | 0.0779 | 0.1966* | 0.1351 | 0.1688 |
| 34 | 216 - I | 0.0892 | 0.1087 | 0.0741 | 0.071 | 0.0923 | 0.092 | 0.1219 |
| 35 | 217 - I | 0.0836 | 0.1015 | 0.0707 | 0.0713 | 0.0945 | 0.0905 | 0.1127 |
| 36 | 218 - I | 0.0826 | 0.0924* | 0.0687 | 0.0719 | 0.0958* | 0.0966 | 0.1098 |
| 37 | 219 - I | 0.0824 | 0.1071 | 0.0734 | 0.0691 | 0.1059 | 0.0852 | 0.1135 |
| 38 | 220 - I | 0.0887 | 0.1072 | 0.0718 | 0.0699 | 0.095 | 0.0915 | 0.1021 |
| 39 | 221 - I | 0.0893 | 0.1204 | 0.0755 | 0.0715 | 0.1465 | 0.1111 | 0.1371 |
| 40 | 222 - I | 0.1144 | 0.0969 | 0.0724 | 0.0667 | 0.1178 | 0.1041 | 0.1248 |
| 41 | 223 - I | 0.1391 | 0.1453 | 0.0787 | 0.0743 | 0.1165 | 0.1162 | 0.1695 |
| 42 | 224 - I | 0.0902 | 0.1115 | 0.0717 | 0.0715 | 0.1295 | 0.1075 | 0.1152 |
| 43 | 225 - I | 0.0797 | 0.1095 | 0.0668 | 0.0687 | 0.0962 | 0.0783 | 0.1171 |
| 44 | 226 - I | 0.0847 | 0.1154 | 0.0722 | 0.0712 | 0.193 | 0.1301 | 0.1228 |
| 45 | 227 - I | 0.0815 | 0.0966 | 0.071 | 0.0664 | 0.0982 | 0.0891 | 0.1026 |
| 46 | 228 - I | 0.0914 | 0.1218 | 0.0778 | 0.0701 | 0.151 | 0.1146 | 0.1255 |
| 47 | 229 - I | 0.0839 | 0.12 | 0.073 | 0.0699 | 0.2398 | 0.1133 | 0.123 |
| 48 | 230 - I | 0.1382 | 0.1412 | 0.108 | 0.0697 | 0.2176 | 0.1173 | 0.1362 |
| 49 | 231 - I | 0.1594 | 0.1357 | 0.0773 | 0.0764 | 0.2042 | 0.1375 | 0.1617 |
| 50 | 232 - I | 0.0925 | 0.1378 | 0.0721 | 0.0754 | 0.2269 | 0.1225 | 0.1416 |
| 51 | 233 - I | 0.0843 | 0.1133 | 0.0701 | 0.0703 | 0.191 | 0.0979 | 0.1242 |
| 52 | 234 - I | 0.0796 | 0.1061 | 0.0686 | 0.0697 | 0.0987 | 0.0836 | 0.1061 |
| 53 | 235 - I | 0.087 | 0.1464 | 0.0719 | 0.0709 | 0.3703 | 0.122 | 0.1382 |
| 54 | 236 - I | 0.0858 | 0.1184 | 0.0701 | 0.0693 | 0.211 | 0.0975 | 0.1149 |
| 55 | 237 - I | 0.0906 | 0.1509 | 0.0719 | 0.0746 | 0.2076 | 0.115 | 0.1426 |
| 56 | 238 - I | 0.1007 | 0.1208 | 0.0691 | 0.0666 | 0.1053 | 0.0941 | 0.1197 |
| 57 | 239 - I | 0.246 | 0.1561 | 0.0782 | 0.0775 | 0.1332 | 0.1336 | 0.1689 |
| 58 | 240 - I | 0.0959 | 0.1366 | 0.076 | 0.0775 | 0.2116 | 0.1388 | 0.1263 |
| 59 | 271 - T | 0.0943 | 0.1667* | 0.0742 | 0.0727 | 0.3423 | 0.0829 | 0.1554 |
| 60 | 272 - T | 0.0869 | 0.1429 | 0.0707 | 0.0722 | 0.1262 | 0.0934 | 0.1282 |
| 61 | 273 - T | 0.0832 | 0.1189 | 0.0739 | 0.0721 | 0.1182 | 0.0942 | 0.1704 |
| 62 | 274 - T | 0.0981 | 0.1424 | 0.077 | 0.0701 | 0.143 | 0.1024 | 0.3047 |
| 63 | 275 - T | 0.0862 | 0.1551 | 0.0762 | 0.0705 | 0.1485 | 0.1 | 0.1376 |
| 64 | 276 - T | 0.1118 | 0.119 | 0.0701 | 0.0675 | 0.1179 | 0.0859 | 0.1223 |
| 65 | 277 - T | 0.16 | 0.1559 | 0.0789 | 0.0785 | 0.1158 | 0.1162 | 0.1788 |
| 66 | 278 - T | 0.0828 | 0.1325 | 0.0722 | 0.0722 | 0.1107 | 0.0927 | 0.1383 |
| 67 | 279 - T | 0.0865 | 0.135 | 0.0716 | 0.0702 | 0.1054 | 0.1019 | 0.134 |
| 68 | 280 - T | 0.0918 | 0.1093 | 0.0712 | 0.072 | 0.1008 | 0.0873 | 0.1084 |
| 69 | 281 - T | 0.0909 | 0.1145 | 0.0688 | 0.0743 | 0.2362 | 0.0921 | 0.1443 |
| 70 | 282 - T | 0.0798 | 0.1038 | 0.0696 | 0.072 | 0.0977 | 0.0911 | 0.1156 |
| 71 | 283 - T | 0.0824 | 0.1022 | 0.0734 | 0.0696 | 0.1016 | 0.0931 | 0.1163 |
| 72 | 284 - T | 0.1383 | 0.1203 | 0.0708 | 0.0694 | 0.1224 | 0.0991 | 0.1389 |
| 73 | 285 - T | 0.153 | 0.108 | 0.0832 | 0.0763 | 0.1121 | 0.1247 | 0.1701 |
| 74 | 286 - T | 0.0937 | 0.1359 | 0.0778 | 0.0726 | 0.2337 | 0.1001 | 0.1384 |
| 75 | 288 - T | 0.0952 | 0.132 | 0.0775 | 0.0731 | 0.2172 | 0.0793 | 0.1399 |
| 76 | 289 - T | 0.0843 | 0.1252 | 0.0742 | 0.0722 | 0.1474 | 0.1 | 0.1285 |
| 77 | 290 - T | 0.0806 | 0.1117 | 0.0738 | 0.0706 | 0.0995 | 0.0782 | 0.1108 |
| 78 | 291 - T | 0.0839 | 0.1154 | 0.0721 | 0.0714 | 0.0961 | 0.0841 | 0.1149 |
| 79 | 292 - T | 0.0867 | 0.0953 | 0.0713 | 0.0693 | 0.0978 | 0.088 | 0.1084 |
| 80 | 293 - T | 0.1171 | 0.1255 | 0.0732 | 0.072 | 0.1228 | 0.0935 | 0.1345 |
| 81 | 294 - T | 0.1741 | 0.1274 | 0.079 | 0.0749 | 0.0971 | 0.1021 | 0.146 |
| 82 | 295 - T | 0.087 | 0.095 | 0.0728 | 0.0937 | 0.0941 | 0.0846 | 0.1168 |
| 83 | 296 - T | 0.0839 | 0.0934 | 0.0748 | 0.0711 | 0.1027 | 0.0874 | 0.121 |
| 84 | 297 - T | 0.0893 | 0.1059 | 0.0726 | 0.0711 | 0.0993 | 0.094 | 0.1183 |
| 85 | 298 - T | 0.0906 | 0.1042 | 0.0863 | 0.0725 | 0.2199 | 0.0978 | 0.1336 |
| 86 | 299 - T | 0.0892 | 0.1163 | 0.0728 | 0.0711 | 0.1167 | 0.101 | 0.1143 |
| 87 | 320 - A | 0.1075 | 0.1384 | 0.0802 | 0.0725 | 0.1111 | 0.1647 | 0.1432 |
| 88 | 321 - A | 0.1481 | 0.1696* | 0.0754 | 0.0721 | 0.076* | 0.1227 | 0.1416 |
| 89 | 322 - A | 0.3034 | 0.1837* | 0.0839 | 0.0761 | 0.112* | 0.1702 | 0.2298 |
| 90 | 323 - A | 0.1842 | 0.1473 | 0.0791 | 0.0732 | 0.1055 | 0.1273 | 0.1693 |
| Controles | CP | 3.5517 | 3.1733 | 2.8523 | 2.4388 | 3.6906 | 2.5673 | 0.2803 |
| | CN | 0.123 | 0.1059 | 0.0712 | 0.0709 | 0.1278 | 0.0943 | 0.1158 |
| Punto de Corte | | 0.18315717 | 0.20095685 | 0.09360601 | 0.09233855 | 0.1899255 | 0.16339054 | 0.21544312 |

Muestras en **negrita y sombreadas** dieron Positivo por DAS ELISA

* Muestras seleccionadas para la detección por RT-PCR e IC-RT-PCR

| Zona TACNA-AREQUIPA | | | | | | | | |
|---------------------|---------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| N° Muestra | Muestra | DAS ELISA-Placa | | | | | | |
| | | GLRaV-1 | GLRaV-2 | GLRaV-3 | GFLV | GfKv | ArMV | ToRSV |
| | | Absorbancia OD (405nm) | | | | | | |
| 1 | 265 - A | 0.1273 | 0.1024 | 0.1198 | 0.0737 | 0.1038 | 0.1304 | 0.1776 |
| 2 | 267 - A | 0.1281 | 0.0824 | 0.0664 | 0.076 | 0.0937 | 0.1408 | 0.1312 |
| 3 | 268 - A | 0.1327 | 0.0829 | 0.0679 | 0.0686 | 0.0883 | 0.1164 | 0.1456 |
| 4 | 272 - A | 0.1276 | 0.0849 | 0.0677 | 0.0655 | 0.0864 | 0.1155 | 0.1608 |
| 5 | 276 - A | 0.119 | 0.0878 | 0.07 | 0.0651 | 0.0994 | 0.1194 | 0.136 |
| 6 | 278 - A | 0.1144 | 0.0857 | 0.067 | 0.0664 | 0.087 | 0.114 | 0.128 |
| 7 | 279 - A | 0.1136 | 0.0865 | 0.0686 | 0.0681 | 0.0846 | 0.1297 | 0.1421 |
| 8 | 280 - A | 0.1385 | 0.1737 | 0.0662 | 0.0653 | 0.0922* | 0.1306 | 0.1529 |
| 9 | 281 - A | 0.2101 | 0.1047* | 0.0747 | 0.0701 | 0.0989* | 0.1257 | 0.1381 |
| 10 | 282 - A | 0.11 | 0.0816* | 0.0655 | 0.0633 | 0.091* | 0.1108 | 0.1235 |
| 11 | 283 - A | 0.1094 | 0.1044* | 0.0648 | 0.0825 | 0.0809* | 0.0898 | 0.1264 |
| 12 | 284 - A | 0.1292 | 0.0975 | 0.0702 | 0.0755 | 0.0893 | 0.1068 | 0.1246 |
| 13 | 285 - A | 0.0863 | 0.0846 | 0.0657 | 0.0714 | 0.0866 | 0.1138 | 0.122 |
| 14 | 286 - A | 0.0876 | 0.0867 | 0.0683 | 0.0686 | 0.0876 | 0.1039 | 0.122 |
| 15 | 287 - A | 0.1068 | 0.0873 | 0.0672 | 0.0685 | 0.0866 | 0.1188 | 0.1263 |
| 16 | 288 - A | 0.0962 | 0.0901 | 0.0678 | 0.0667 | 0.0889 | 0.1361 | 0.1563 |
| 17 | 289 - A | 0.1005 | 0.0987 | 0.0671 | 0.0651 | 0.1527* | 0.1312 | 0.14 |
| 18 | 290 - A | 0.088 | 0.0839 | 0.0794 | 0.0818 | 0.0952 | 0.1315 | 0.1221 |
| 19 | 291 - A | 0.0864 | 0.0961 | 0.0669 | 0.0927 | 0.0946 | 0.1084 | 0.145 |
| 20 | 293 - A | 0.1028 | 0.0873 | 0.0728 | 0.0792 | 0.1194 | 0.1327 | 0.1573 |
| 21 | 294 - A | 0.092 | 0.0858 | 0.0661 | 0.1014 | 0.0916 | 0.1145 | 0.1311 |
| 22 | 295 - A | 0.0941 | 0.0922 | 0.0814 | 0.0763 | 0.0953 | 0.1083 | 0.1186 |
| 23 | 296 - A | 0.0922 | 0.0868 | 0.0695 | 0.0868 | 0.081 | 0.1101 | 0.1252 |
| 24 | 297 - A | 0.1024 | 0.0942 | 0.0713 | 0.0815 | 0.0936 | 0.1217 | 0.1337 |
| 25 | 298 - A | 0.1108 | 0.0913 | 0.0708 | 0.0656 | 0.1015 | 0.1188 | 0.1315 |
| 26 | 299 - A | 0.116 | 0.0935 | 0.0664 | 0.0708 | 0.1044 | 0.1394 | 0.1236 |
| 27 | 395 - A | 0.102 | 0.0878 | 0.0887 | 0.0866 | 0.1175 | 0.1215 | 0.1128 |
| 28 | 396 - A | 0.1116 | 0.0891 | 0.0838 | 0.0963 | 0.1718 | 0.1121 | 0.1315 |
| 29 | 397 - A | 0.1018 | 0.0912 | 0.0897 | 0.0768 | 0.0851 | 0.1006 | 0.1115 |
| 30 | 398 - A | 0.098 | 0.0929 | 0.0971 | 0.0859 | 0.0928 | 0.1076 | 0.1198 |
| 31 | 399 - A | 0.1024 | 0.0923 | 0.0689 | 0.0823 | 0.0999 | 0.1439 | 0.1176 |
| 32 | 400 - A | 0.143 | 0.0925 | 0.0757 | 0.0748 | 0.0846 | 0.1219 | 0.1251 |
| 33 | 300 - T | 0.1095 | 0.0895 | 0.0714 | 0.0675 | 0.089 | 0.0946 | 0.1481 |
| 34 | 301 - T | 0.0935 | 0.082 | 0.0739 | 0.0662 | 0.0924 | 0.123 | 0.1376 |
| 35 | 302 - T | 0.1053 | 0.1035 | 0.1283 | 0.0792 | 0.1072 | 0.0974 | 0.1252 |
| 36 | 303 - T | 0.1206 | 0.0845 | 0.1126 | 0.1647 | 0.1035 | 0.0934 | 0.154 |
| 37 | 304 - T | 0.1042 | 0.0938 | 0.1002 | 0.0822 | 0.0872 | 0.0857 | 0.145 |
| 38 | 305 - T | 0.1047 | 0.0934 | 0.0852 | 0.0861 | 0.1394 | 0.0944 | 0.1786 |
| 39 | 306 - T | 0.1437 | 0.0936 | 0.0844 | 0.0962 | 0.0969 | 0.1125 | 0.1699 |
| Controles | CP | 1.1979 | 1.4502 | 3.5153 | 2.1042 | 3.3258 | 1.3133 | 1.2861 |
| | CN | 0.0831 | 0.0895 | 0.07 | 0.0756 | 0.0952 | 0.1041 | 0.1062 |
| Punto de Corte | | 0.17220431 | 0.12052577 | 0.1116385 | 0.11717578 | 0.13298715 | 0.17592378 | 0.20677383 |

Muestras **en negrita y sombreadas** dieron Positivo por DAS ELISA

* Muestras seleccionadas para la detección por RT-PCR e IC-RT-PCR

Anexo 07: Resultados de Muestras de Campo analizadas por DAS-ELISA / M-RT-PCR / M- IC-RT-PCR para el diagnóstico del Virus GLRaV-2

| Muestras | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
|----------|-----------|-------------------------|-------------|
| 373 - I | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 85 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 156 - I | Positivo | Positivo | Positivo |
| 363 - I | Positivo | Negativo | Positivo |
| 399 - I | Positivo | Positivo | Positivo |
| 297 - I | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 305 - I | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 327 - I | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 279 - I | Positivo | Negativo | Positivo |
| 301 - I | Positivo | Negativo | Positivo |
| 272 - I | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 408 - I | Positivo | Positivo | Positivo |
| 424 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 246 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 265 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 14 - V | Negativo | Negativo | Negativo |
| 69 - V | Negativo | Negativo | Negativo |
| 321 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 322 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 215 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 218 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 271 - Ta | Negativo | Negativo | Negativo |
| 9 - A | Negativo | Positivo | Positivo |
| 33 - A | Negativo | Positivo | Positivo |
| 63 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 79 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 126 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 127 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 158 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 125 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 180 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 275 - A | Positivo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 188 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 203 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 226 - A | Negativo | Positivo | Positivo |
| 266 - A | Negativo | Positivo ^{Sec} | Positivo |

| Muestras | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
|----------|-----------|-------------------------|-------------|
| 271 - A | Negativo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 393 - A | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 300 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 307 - A | Positivo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 303 - A | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 356 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 327 - A | Positivo | Negativo | Positivo |
| 351 - A | Positivo | Negativo | Positivo |
| 281 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 282 - A | Negativo | Positivo ^{Sec} | Negativo |
| 283 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 79 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 69 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 59 - T | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 10 - T | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 102 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 130 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 98 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 94 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 97 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 243 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 245 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 195 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 211 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 325 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 397 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 341 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 361 - T | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 389 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 380 - T | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 363 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 366 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 367 - T | Positivo | Negativo | Positivo |
| 381 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 308 - T | Positivo | Positivo | Positivo |

Negativo*: Muestras Negativas por DAS-ELISA cuyas absorbancias estaban cercanas al punto de corte

Positivo^{Sec}: Muestras positivas enviadas a secuenciar

Anexo 08: Resultados de Muestras de Campo analizadas por DAS-ELISA / M-RT-PCR / M- IC-RT-PCR para el diagnóstico del Virus GfKv

| Muestras | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
|----------|-----------|-------------------------|-------------|
| 156 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 399 - I | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 363 - I | Positivo | Negativo | Positivo |
| 305 - I | Negativo | Negativo | Negativo |
| 279 - I | Negativo* | Negativo | Positivo |
| 297 - I | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 424 - I | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 408 - I | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 218 - I | Negativo | Positivo | Negativo |
| 322 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 321 - A | Negativo | Negativo | Negativo |
| 215 - I | Positivo | Positivo | Positivo |
| 8 - V | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 29 - V | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Negativo |
| 7 - V | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Negativo |
| 79 - A | Negativo | Positivo | Positivo |
| 86 - A | Negativo | Positivo | Positivo |
| 81 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 84 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 67 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 63 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 80 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 73 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 74 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 61 - A | Positivo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 120 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 153 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 99 - A | Negativo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 164 - A | Negativo* | Positivo | Negativo |
| 160 - A | Positivo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 149 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 259 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 188 - A | Negativo | Positivo | Positivo |
| 264 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 271 - A | Negativo* | Positivo | Negativo |
| 250 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 277 - A | Positivo | Positivo | Positivo |

| Muestras | DAS-ELISA | M-RT-PCR | M-IC-RT-PCR |
|----------|-----------|-------------------------|-------------|
| 257 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 351 - A | Negativo | Negativo | Positivo |
| 356 - A | Negativo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 327 - A | Negativo | Negativo | Positivo |
| 303 - A | Negativo | Positivo | Positivo |
| 307 - A | Negativo | Negativo | Positivo |
| 308 - A | Negativo* | Negativo | Positivo |
| 300 - A | Positivo | Positivo | Positivo |
| 393 - A | Positivo | Negativo | Positivo |
| 283 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 282 - A | Negativo | Positivo ^{Sec} | Negativo |
| 280 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 281 - A | Negativo | Positivo | Negativo |
| 289 - A | Positivo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 10 - T | Negativo | Positivo | Negativo |
| 6 - T | Negativo | Positivo | Negativo |
| 2 - T | Negativo | Positivo | Negativo |
| 1 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 16 - T | Positivo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 15 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 93 - T | Negativo | Negativo | Negativo |
| 123 - T | Negativo* | Positivo | Negativo |
| 106 - T | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Negativo |
| 107 - T | Negativo* | Positivo | Negativo |
| 124 - T | Positivo | Positivo | Positivo |
| 263 - T | Negativo | Positivo | Negativo |
| 253 - T | Negativo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 186 - T | Negativo | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 201 - T | Negativo | Positivo | Negativo |
| 198 - T | Negativo* | Positivo ^{Sec} | Positivo |
| 228 - T | Negativo* | Negativo | Negativo |
| 372 - T | Negativo | Positivo | Positivo |
| 367 - T | Negativo | Negativo | Positivo |
| 308 - T | Negativo | Negativo | Positivo |
| 363 - T | Negativo* | Positivo | Positivo |
| 307 - T | Positivo | Negativo | Positivo |

Negativo*: Muestras Negativas por DAS-ELISA cuyas absorbancias estaban cercanas al punto de corte

Positivo^{Sec}: Muestras positivas enviadas a secuenciar

Anexo 09: Secuencias de GFkV Consenso y BLAST con Secuencias del GenBank

Las 16 secuencias consenso de GFkV:

#Consenso 424I

**GCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCTTGGTCAGCGCTCCGGTCCCT
GCTGCGCCACCCGCCCAACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGAGTAAGCATCCAC
CTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCCTCCTACCCTC
C**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E-value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Seq 424I | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate SK36 coat protein gene, partial cds | 285 | 285 | 96% | 2e-73 | 99% | JN133934.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK121 coat protein gene, partial cds | 279 | 279 | 96% | 8e-72 | 98% | JN133957.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK106 coat protein gene, partial cds | 279 | 279 | 96% | 8e-72 | 98% | JN133953.1 |

#Consenso 7V

**GCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCCTGGTCAGCGCTCCGGTCCCT
TCTGCGCCACCCGCCCAACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGTGTAAGCATCCAC
CTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACCGGACCGAGTCCTCCTACACCT
CCCT**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E-value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Seq 7V | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate CI-1155 coat protein (CP) gene, complete cds | 291 | 291 | 100% | 4e-75 | 98% | HQ688989.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK107 coat protein gene, partial cds | 285 | 285 | 97% | 2e-73 | 98% | JN133954.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK53 coat protein gene, partial cds | 285 | 285 | 97% | 2e-73 | 98% | JN133940.1 |

#Consenso 99A

ACCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCCTGGTCAGCGCTCCGGT
CCCTTCCGCGCCACCAGCCCCGACCGCCATGCCCGCAACCCTCGAGAAGCATCC
ACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACCGGCACCGAGTCCTCCTACAC
CTCCCTGTCCA

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E-value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Seq 99A | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate BF coat protein gene, complete cds | 274 | 274 | 99% | 4e-70 | 95% | JN022610.1 |
| Grapevine fleck virus isolate CH21-68.2 coat protein gene, partial cds | 265 | 265 | 100% | 2e-67 | 94% | GU372373.1 |
| Grapevine fleck virus isolate CH9-11 coat protein gene, partial cds | 265 | 265 | 100% | 2e-67 | 94% | GU372372.1 |

#Consenso 160A

ACCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCAGACTCTCGCCTGGTCAGCGCTCCGCT
CCCTGCTGCACCACccGCcCCGACCGCTATtGCCCGCAACCCTCGGAAGAGCATCC
ACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACCGAGTCCTCCTACAC
CTCCCTGTCCAA

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E-value | %Identidad | Accesión |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Seq 160A | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate BF coat protein gene, complete cds | 292 | 292 | 98% | 1e-75 | 97% | JN022610.1 |
| Grapevine fleck virus complete genome, isolate MT48, genomic RNA | 289 | 289 | 99% | 1e-74 | 96% | AJ309022.1 |
| Grapevine fleck virus partial cp gene for coat protein, isolate Kullu | 283 | 283 | 99% | 7e-73 | 96% | HE649964.1 |

#Consenso 289A

CCAGCCTGCCGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCCTGGTCAGCGCTCCGCTC
CCTGCTGCGCCGCCCGCCCCGACCGCCATGCCCGCAACCCTCGGTAAGCATCC
ACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCGCCGAGTCCTCCTACAC
CTCC

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E-value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Seq 289T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate BF coat protein gene, complete cds | 278 | 278 | 100% | 3e-71 | 96% | JN022610.1 |

| | | | | | | |
|--|-----|-----|------|-------|-----|------------|
| Grapevine fleck virus complete genome, isolate MT48, genomic RNA | 272 | 272 | 100% | 1e-69 | 96% | HE649964.1 |
| Grapevine fleck virus isolate CZ1 coat protein gene, partial cds | 270 | 270 | 94% | 5e-69 | 97% | JN133957.1 |

#Consenso 282A

CCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCTTGGTCAGCGCTCCGGTC
CCTGCTGCGCCACCCGCCCAACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGTGTAAGCATC
CACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCCTCCTACA
CCTCCCTGT

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|---|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 282T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate SK36 coat protein gene, partial cds | 305 | 305 | 95% | 1e-79 | 100% | JN133934.1 |
| Grapevine fleck virus partial cp gene for coat protein, isolate Kullu | 303 | 303 | 100% | 5e-79 | 98% | HE649964.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK121 coat protein gene, partial cds | 300 | 300 | 95% | 7e-78 | 99% | JN133957.1 |

#Consenso 16T

GCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCTTGGTCAGCGCCCTGCTGCG
CCACCCGCCCAACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGTGTAAGCATCCACCTCCCCT
TCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCCTCCTACACCTCCCTGTC

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 16T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate SK121 coat protein gene, partial cds | 268 | 268 | 96% | 2e-68 | 96% | JN133957.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK103 coat protein gene, partial cds | 268 | 268 | 97% | 2e-68 | 96% | JN133952.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK100 coat protein gene, partial cds | 268 | 268 | 96% | 2e-68 | 96% | JN133951.1 |

#Consenso 106T

ACCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCAGACTCTCGCGTGGTCAGCGCTCCGCT
CCCTGCTGCGCCACCCGCCCGACCGCGATTGCCCGCAACCCTCGTGTAAGCATC
CACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCCTCCTACA
CCTCCCTGTC

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E-value | %Identidad | Accesión |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Seq 106T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate BF coat protein gene, complete cds | 296 | 296 | 100% | 9e-77 | 97% | JN022610.1 |
| Grapevine fleck virus complete genome, isolate MT48, genomic RNA | 296 | 296 | 100% | 9e-77 | 97% | AJ309022.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK56 coat protein gene, partial cds | 291 | 291 | 94% | 4e-75 | 98% | JN133941.1 |

#Consenso 186T

CCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCTTGGTCAGCGCTCCGGTC
CCTGCTGCGCCACCcGCCCCAACCGCGATTGCCCGCAACCCTCGtGtAAGCATCCA
CCTCCCCTTCCAGTTCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCTCCTACACC
TCCCTGT

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|---|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 186T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate SK 36 coat protein gene, partial cds | 300 | 300 | 95% | 7e-78 | 99% | JN133934.1 |
| Grapevine fleck virus partial cp gene for coat protein, isolate Kullu | 298 | 298 | 100% | 2e-77 | 98% | HE649964.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK121 coat protein gene, partial cds | 294 | 294 | 95% | 3e-76 | 99% | JN133957.1 |

#Consenso 198T

TGACCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCCTGGTCAGCGCTCCG
CTCCCTGCTGCGCCACCAGCCCCAACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGtGTAAGCA
TCCACCTGCCCTTCCAGTTCTGTGGTATGATATCACAGGCACCGAGTCTCCTA
CACCTCCCTGTC

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 198T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate CI-1155 coat protein (CP) gene, complete cds | 300 | 300 | 100% | 7e-78 | 97% | HQ688989.1 |
| Grapevine fleck virus isolate HN-5 coat protein (CP) gene, partial cds | 294 | 294 | 100% | 3e-76 | 97% | KT946647.1 |
| Grapevine fleck virus partial cp gene for coat protein, isolate Kullu | 294 | 294 | 100% | 3e-76 | 97% | HE649964.1 |

#Consenso 61A

**ACCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCGGACTCTCGCTTGGTCAGCGCTCCGCT
CCCTGCTGCGCCACAAGGGGCCACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGtGtAAGCATC
CACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACCGAGTCTCTCTACA
CCTCCCTGT**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 61A | | | | | | |
| Grapevine fleck virus partial cp gene for coat protein, isolate Kullu | 278 | 278 | 100% | 3e-71 | 95% | HE649964.1 |
| Grapevine fleck virus complete genome, isolate MT48, genomic RNA | 278 | 278 | 100% | 3e-71 | 95% | AJ309022.1 |
| Grapevine fleck virus isolate CI-1155 coat protein (CP) gene, complete cds | 279 | 279 | 98% | 7e-68 | 94% | HQ688989.1 |

#Consenso 356A

**CCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCCTGGTCAGCGCTCCGCTC
CCTGCTGCGCCGCCCGCCCCGACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGTGTAAAGCATC
CACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGAGCCGAGTCTCTCTACA
CCTCCA**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 356I | | | | | | |
| Grapevine fleck virus complete genome, isolate MT48, genomic RNA | 285 | 285 | 99% | 2e-73 | 97% | AJ309022.1 |
| Grapevine fleck virus isolate CI-1155 coat protein (CP) gene, complete cds | 283 | 283 | 99% | 6e-73 | 96% | HQ688989.1 |
| Grapevine fleck virus isolate CZ1 coat protein gene, partial cds | 281 | 281 | 94% | 2e-72 | 98% | JN133960.1 |

#Consenso 253T

**ACCAGCCTGCGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCTTGGTCAGCGCTCCGCTC
CCTGCTGCGCCACCCGCCCAACCGCGATTGCCCGCAACCCTCGtGTAAGCATCC
ACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCTCTCTACAC
CTCCCTG**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|---|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 253T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus partial cp gene for coat protein, isolate Kullu | 296 | 296 | 100% | 8e-77 | 98% | HE649964.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK121 coat protein gene, partial cds | 294 | 294 | 94% | 3e-76 | 99% | JN133957.1 |

| | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-------|-----|------------|
| Grapevine fleck virus isolate SK103 coat protein gene, partial cds | 294 | 294 | 94% | 3e-76 | 99% | JN133952.1 |
|--|-----|-----|-----|-------|-----|------------|

#Consenso 399I

**TGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCTTGGTCAGCGCTCCGGTCCCTGCTGCG
CCACccGCCCCAACCGCGATTGCCCGCAACCCTCGtGtaAGCATCCACCTCCCCTTC
CAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCCTCCTACACCTCCCTGT**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 16T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate SK36 coat protein gene, partial cds | 298 | 298 | 100% | 2e-77 | 96% | JN133934.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK121 coat protein gene, partial cds | 292 | 292 | 100% | 1e-75 | 96% | JN133957.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK106 coat protein gene, partial cds | 292 | 292 | 100% | 1e-75 | 96% | JN133953.1 |

#Consenso 8V

**ACCGCCTGGCGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCTTGGTCAGCGCTCCGG
TCCCTGCTGCGCCACCCGCCCCaACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGTGTGAGCAT
CCACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGGCACTGAGTCCTCCTAC
ACCTCCCTGTCC**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 16T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate SK36 coat protein gene, partial cds | 300 | 300 | 93% | 7e-78 | 99% | JN133934.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK121 coat protein gene, partial cds | 294 | 294 | 93% | 3e-76 | 99% | JN133957.1 |
| Grapevine fleck virus isolate SK106 coat protein gene, partial cds | 294 | 294 | 93% | 3e-76 | 99% | JN133953.1 |

#Consenso 29V

**GACCAGCCTGCTGTCTCTAGCTCTCGCTCTGACTCTCGCCTGGTCAGCGCTCCG
GTCCCTTCTGCGCCACCCGCCCCGACCGCTATTGCCCGCAACCCTCGTGTGAGC
ATCCACCTCCCCTTCCAGTTCCTGTGGTATGACATCACGGCACCGAGTCCTCCT
ACACCTCCCTGTCCA**

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 16T | | | | | | |
| Grapevine fleck virus isolate HN-5 coat protein (CP) gene, partial | 296 | 296 | 100% | 9e-77 | 97% | KT946647.1 |

| cds | | | | | | |
|--|-----|-----|------|-------|-----|------------|
| Grapevine fleck virus isolate CH21-68.2 coat protein gene, partial cds | 296 | 296 | 100% | 9e-77 | 97% | GU372373.1 |
| Grapevine fleck virus isolate CH9-11 coat protein gene, partial cds | 296 | 296 | 100% | 9e-77 | 97% | GU372372.1 |

Anexo 10: Secuencias de GLRaV-2 Consenso y BLAST con Secuencias del GenBank

Las siete secuencias consenso de GLRaV-2:

266A

CTAGTCTAAATGGTGTGCGACAAGAAGCTCTTATCTGCTGAAGTTGTAAAAATGTTGGT
GCAGAAAGGGGCTCCTAACGAGGGTATAGAAGTGGTGTTCGGTCTACTCCTTTACGCA
CTCGCGCAAGAACCACGTCTCCTAAGGTTTCAGCGCGCAGATTTCAGACGTTATATTTT
CAAATAGTTTCGGAGAGAGGAATGTGGTAGTAACAGAGGGTGACCTTAAGAAGGTAC
TCGACGGGTGTGCGCCTCTCACTAGGTTCACTAATAAACTTAGAACGTTTGGTCGTAC
TTTCACTGAGGCTTACGTTGACTTTTGTATCGCGTATAAGCACAAATTACCCCAACTCA
ACGCCGCGGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTAAGTTAGCTGCAGATTTTCT
GGTACTTGCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGATGTTTCGCGAGTAT
GTACGCTCTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGTGAGC

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E-value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Seq 266A | | | | | | |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 capsid protein (CP) gene cds | 929 | 929 | 100% | 0 | 99% | KF007286.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate RCA major coat protein, 19 kDa protein, and 24 kDa protein genes, complete cds | 929 | 929 | 100% | 0 | 99% | KP704564.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate PMC-083 coat protein gene, partial cds | 929 | 929 | 100% | 0 | 99% | HM185277.1 |

275A

TAGTCTAAATGGTGTGCGACAAGAAGCTCTTATCTGCTGAAGTTGTAAAAATGTTGGTG
CAGAAAGGAGCTCCTAACGAGGGTATAGAAGTGGTGTTCGGTCTACTCCTTTACGCAC
TCGCGGCAAGAACCACGTCTCCTAAGGTTTCAGCGCGCAGATTTCAGACGTTATATTTT
AAATAGTTTCGGAGAGAGGAATGTGGTAGTAACAGAGGGTGACCTTAAGAAGGTACT
CGACGGGTGTGCGCCTCTCACTAGGTTCACTAATAAACTTAGAACGTTTCGGTCGTA
TTCACTGAGGCTTACGTTGACTTTTGTATCGCGTATAAGCACAAATTACCCCAACTCA
ACGCCGCGGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTAAGTTAGCTGCAGATTTTCT
GGTACTTGCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGATGTTTCGCGAGTAT
GTACGCTCTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGTGAGCAATCTGCGT

CGCGGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTAAGTCTAGCTGCAGATTTTCTGGGT
 ACTTGCCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGATGTTTCGCGAGTATGTACG
 CTCTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGTGAGCAATCTG

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 282A | | | | | | |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 capsid protein (CP) gene cds | 931 | 931 | 100% | 0 | 99% | KF007286.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate RCA major coat protein, 19 kDa protein, and 24 kDa protein genes, complete cds | 931 | 931 | 100% | 0 | 99% | KP704564.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate PMC-083 coat protein gene, partial cds | 931 | 931 | 100% | 0 | 99% | HM185277.1 |

303A

ATAACCGACGCCTCTAGTCTAAATGGTGTGCGACAAGAAGCTCTTATCTGCTGAAGTTG
 TAAAAATGTTGGTGCAGAAAGGGGCTCCTAACGAGGGTATAGAAGTGGTGTTCGGTC
 TACTCCTTTACGCACTCGCGCAAGAACCACGTCTCCTAAGGTTTCAGCGCGCAGATTC
 AGACGTTATATTTTCAAATAGTTTCGGAGAGAGGAATGTGGTAGTAACAGAGGGTGA
 CCTTAAGAAGGTACTCGACGGGTGTGCGCCTCTCACTAGGTTCACTAATAAACTTAGA
 ACGTTTGGTTCGTACTTTCACTGAGGCTTACGTTGACTTTTGTATCGCGTATAAGCACAA
 ATTACCCCAACTCAACGCCGCGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTAAGT
 GCTGCAGATTTTCTGGGTACTTGCCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGA
 TGTTTCGCGAGTATGTACGCTCTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGTGA
 GCAATCTGCGTCAGCTA

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 303A | | | | | | |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 capsid protein (CP) gene cds | 981 | 981 | 100% | 0 | 99% | KF007286.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate RCA major coat protein, 19 kDa protein, and 24 kDa protein genes, complete cds | 981 | 981 | 100% | 0 | 99% | KP704564.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate PMC-083 coat protein gene, partial cds | 981 | 981 | 100% | 0 | 99% | HM185277.1 |

307A

GCCTCTAGTCTAAATGGTGTGCGACAAGAAGCTCTTATCTGCTGAAGTTGTAAAAATGT
 TGGTGCAGAAAGGGGCTCCTAACGAGGGTATAGAAGTGGTGTTCGGTCTACTCCTTTA

CGCACTCGCGGCAAGAACCACGTCTCCTAAGGTTTCAGCGCGCAGATTCAGACGTTATA
TTTTCAAATAGTTTTCGGAGAGAGGAATGTGGTAGTAACAGAGGGTGACCTTAAGAAG
GTA CTGACGGGTGTGCGCCTCTACTAGGTTCACTAATAAACTTAGAACGTTTGGTC
GTA CTTTACTGAGGCTTACGTTGACTTTTTGTATCGCGTATAAGCACAAATTACCCCA
ACTCAACGCCGCGGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTA CTTAGCTGCAGAT
TTTCTGGGTACTTGCCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGATGTTTCGCGA
GTATGTACGCTCTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGTGAGC

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 307A | | | | | | |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 capsid protein (CP) gene cds | 937 | 937 | 100% | 0 | 99% | KF007286.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate RCA major coat protein, 19 kDa protein, and 24 kDa protein genes, complete cds | 937 | 937 | 100% | 0 | 99% | KP704564.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate PMC-083 coat protein gene, partial cds | 937 | 937 | 100% | 0 | 99% | HM185277.1 |

393A

TCTAAATGGTGTGCGACAAGAAGCTCTTATCTGCTGAAGTTGTAAAAATGTTGGTGCAG
AAAGGGGCTCCTAACGAGGGTATAGAAGTGGTGTTCGGTCTACTCCTTTACGCACTCG
CGGCAAGAACCACGTCTCCTAAGGTTTCAGCGCGCAGATTCAGACGTTATATTTTCAA
TAGTTTCGGAGAGAGGAATGTGGTAGTAACAGAGGGTGACCTTAAGAAGGTACTCGA
CGGGTGTGCGCCTCTACTAGGTTCACTAATAAACTTAGAACGTTTCGGTTCGTA CTTT
ACTGAGGCTTACGTTGACTTTTTGTATCGCGTATAAGCACAAATTACCCCAACTCAACG
CCGCGGCGGAATTGGGGATTCCAGCTGAAGATTCGTA CTTAGCTGCAGATTTTCTGGG
TACTTGCCCCGAAGCTCTCTGAATTACAGCAAAGTAGGAAGATGTTTCGCGAGTATGTAC
GCTCTAAAACTGAAGGTGGAGTGGTAAATACACCAGT

| Secuencias | Max score | Total score | Query cover | E- value | %Identidad | Accesión |
|--|-----------|-------------|-------------|----------|------------|------------|
| Seq 393A | | | | | | |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 capsid protein (CP) gene cds | 920 | 920 | 100% | 0 | 99% | KF007286.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate RCA major coat protein, 19 kDa protein, and 24 kDa protein genes, complete cds | 920 | 920 | 100% | 0 | 99% | KP704564.1 |
| Grapevine leafroll-associated virus 2 isolate PMC-083 coat protein gene, partial cds | 920 | 920 | 100% | 0 | 99% | HM185277.1 |