



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN  
DEL**

**TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:** DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE  
LOS GÉNEROS *Potexvirus*, *Tombusvirus* Y *Tobamovirus* EN  
AGUAS DE RIEGO DE CULTIVOS DE CULTIVOS DE  
BABACO (*Vasconcellea × heilbornii*. var. *pentagona*), EN LA  
PROVINCIA DE PICHINCHA.

**AUTOR:** GUEVARA GUILLÉN, FIAMA ESTEFANY

**DIRECTOR:** FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER

**SANGOLQUÍ**

**2017**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Detección e identificación de virus de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en aguas de riego de cultivos de Babaco (*Vasconcellea × heilbornii*. var. *pentagona*), en la provincia de Pichincha.**” realizado por la señorita **FIAMA GUEVARA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **FIAMA GUEVARA** para que lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 14 de julio del 2017**

  
-----  
**FRANCISCO JAVIER FLORES FLOR**

**DIRECTOR**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **FIAMA ESTEFANY GUEVARA GUILLÉN**, con cédula de identidad N° 171959789-8, declaro que este trabajo de titulación “**Detección e identificación de virus de los géneros Potexvirus, Tombusvirus y Tobamovirus en aguas de riego de cultivos de Babaco (*Vasconcellea × heilbornii*. var. *pentagona*), en la provincia de Pichincha.**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

**Sangolquí, 14 de julio del 2017**

**FIAMA ESTEFANY GUEVARA GUILLÉN**

**C.C. 171959789-8**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y  
AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **FIAMA ESTEFANY GUEVARA GUILLÉN**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**Detección e identificación de virus de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en aguas de riego de cultivos de Babaco (*Vasconcellea × heilbornii*. var. *pentagona*), en la provincia de Pichincha.**”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

**Sangolquí, 14 de julio del 2017**

-----  
**FIAMA ESTEFANY GUEVARA GUILLÉN**

**C.C. 171959789-8**

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo a mi familia, quienes con su apoyo y consejos siempre me han ayudado a superar cada obstáculo y me han motivado a alcanzar mis metas.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres Geovanny y Raquel quienes han sido ejemplo de perseverancia y disciplina, quienes desde un inicio apoyaron mi carrera y me han motivado a ser mejor cada día. Agradezco a mis hermanas Sheila y Naomi por su amor, comprensión y alegría.

Agradezco al Grupo de Investigación en Microbiología y Ambiente (GIMA) de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE por facilitarme los equipos y reactivos usados en mi investigación. A la MSc. Alma Koch por permitirme trabajar en el Laboratorio de Microbiología Molecular, por brindarme sabios consejos no solo en el ámbito académico sino a nivel personal, gracias por enseñar día a día tantos valores. Al Dr. Andrés Izquierdo por el apoyo técnico durante la investigación. A mi director el Dr. Francisco Flores por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutela, por confiar en mi trabajo y por haber sido una fuente de inspiración dentro del mundo de la investigación científica. Gracias por sus consejos, su dedicación y enseñanzas.

También quiero agradecer al Programa de Fruticultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)-Granja Tumbaco y a la Granja La Morita de la Universidad Central del Ecuador, por la colaboración en cuanto a las muestras usadas. Especialmente al Ing. William Viera (INIAP) y al Proyecto “Biocontrol for Sustainable Farming Systems, Ecuador” del Ministerio de Asuntos Exteriores y Comercio (MFAT) de Nueva Zelanda, por su apoyo durante el proyecto. Agradezco también a la Ing. Andrea Sotomayor (INIAP) y el Sr. Orlando Trujillo (La Morita-UCE), por su apoyo en el proceso de muestreo.

Es importante agradecer también a quienes me apoyaron siempre dentro del Laboratorio, a mi compañera de tesis Alejandra Oviedo, por ser paciente, dedicada y buena amiga, y por apoyarme en el desarrollo del proyecto. Agradezco también a los pasantes Valeria Faz, Sofía Robalino, Esteban Palacios, Eduardo Moncayo y Álvaro Sampedro por su buen ánimo para trabajar en el laboratorio, por su grandísima ayuda en los muestreos y por compartir momentos divertidos mientras trabajamos juntos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Formulación del Problema.....	1
1.2. Justificación del Problema .....	2
1.3. Objetivos de la Investigación .....	3
1.3.1. Objetivo general .....	3
1.3.2. Objetivos Específicos .....	3
1.4. Marco Teórico.....	3
1.4.1. Babaco ( <i>Vasconcellea × heilbornii</i> . var. <i>pentagona</i> ).....	3
1.4.2. Virus: Generalidades.....	9
1.4.3. Transcripción inversa seguida por la Reacción en cadena de la Polimerasa RT-PCR ...	17
1.5. Hipótesis.....	17
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
2.1. Zona de estudio .....	18
2.2. Duración de la investigación.....	18
2.3. Procedimientos .....	18
2.3.1. Toma de muestras de las aguas de riego y plantas .....	18
2.3.2. Acondicionamiento de muestras de agua para la obtención de concentrado viral.....	19
2.3.3. Extracción de ARN total de los concentrados virales y de plantas infectadas .....	20
2.3.4. Transcripción inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .....	20
2.3.5. Electroforesis .....	23
2.4. Determinación de virus fitopatógenos mediante Secuenciación de ADN complementario y búsqueda de homólogos mediante BLAST.....	23

CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....	25
3.1.Recolección y acondicionamiento de muestras plantas de babaco y agua de riego. ....	25
3.2.Concentración de partículas virales del agua de riego .....	26
3.3.Extracción de ARN y síntesis de ADNc .....	26
3.4.Amplificación de muestras mediante PCR convencional.....	26
3.5.Resultados de secuenciación y búsqueda de homólogos mediante BLAST .....	30
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	32
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....	36
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....	37
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	38



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detalle de primers usados .....	21
Tabla 2. Componentes y cantidades para reacción de PCR .....	22
Tabla 3. Parámetros para amplificación.....	23
Tabla 4. Resultados de secuenciación.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hábito de crecimiento y Distribución del babaco.....	4
Figura 2. Virión de <i>Potexvirus</i> sin envoltura.....	11
Figura 3. Expresión genómica del género <i>Potexvirus</i> . Genoma Lineal.....	12
Figura 4. Cápside icosaédrica de Tombusviridae.....	13
Figura 5. Genoma de Tombusviridae.....	14
Figura 6. Virión de <i>Tobamovirus</i> .....	15
Figura 7. Genoma de <i>Tobamovirus</i> .....	15
Figura 8. Reservorios de agua de riego.....	23
Figura 9. Muestras de plantas de babaco.....	23
Figura 10. Concentración viral. Método SKM.....	24
Figura 11. Electroforesis PCR <i>Potexvirus</i> de muestras de agua.....	25
Figura 12. Electroforesis PCR <i>Tombusvirus</i> de muestras de agua.....	25
Figura 13. Electroforesis PCR <i>Potexvirus</i> de hojas de babaco.....	26
Figura 14. Electroforesis PCR <i>Potexvirus</i> de hojas de babaco.....	26
Figura 15. Electroforesis PCR <i>Tombusvirus</i> de hojas de babaco.....	27
Figura 16. Electroforesis PCR <i>Potexvirus</i> de raíces de babaco.....	27

## RESUMEN

Las infecciones virales afectan a una gran variedad de cultivos en el Ecuador, causando importantes pérdidas económicas para el agricultor. En la actualidad los reportes de virus en cultivos frutales del país son escasos pero a nivel mundial cada día se descubren nuevos patosistemas virus/planta frutal. El objetivo del trabajo fue detectar por primera vez en Ecuador virus fitopatógenos de géneros previamente reportados en aguas, en dos reservorios de agua de riego para cultivos de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *pentagona*) en el sector de Tumbaco, Pichincha. Se ensayaron dos métodos de concentración viral: floculación con leche descremada y filtración en lana de vidrio, seguido de una precipitación con polietilenglicol. Se recolectaron muestras de hojas, frutos y raíces de plantas de babaco con síntomas de virosis, incluyendo mosaico y ampollamiento, para determinar la existencia del mismo tipo de virus en plantas y agua. Se extrajo ARN de los concentrados virales y de plantas, se sintetizó ADN complementario y, se amplificó utilizando primers genéricos para *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus*. Los resultados de secuenciación para muestras de agua indicaron la presencia de un *Tombusvirus*, un *Mandavirus* y un *Potexvirus*. Tanto en agua como en raíces y hojas de babaco, se identificaron varias cepas de un mismo *Potexvirus* similar a *Lagenaria Mild Mosaic Virus* y *Alternanthera Mosaic Virus*, pero que muestran porcentajes de identidad por debajo del criterio de demarcación. Los resultados evidencian que el agua podría ser un medio de transmisión de virus, y la presencia de ciertos virus aún no descritos.

Palabras clave:

- **AMPOLLAMIENTO**
- **FITOPATÓGENOS**
- **MOSAICO**
- **VIRUS**

## ABSTRACT

Viral diseases affect a wide variety of crops in Ecuador, which implies important money losses for the farmers. Currently, virus reports on Ecuadorian fruit crops are limited but new virus/plant pathosystems are being discovered constantly worldwide. The aim of this research project was to detect phytopathogenic viruses in irrigation water for the first time in Ecuador. The presence of three different genera of viruses that were previously reported in water was determined in two irrigation water reservoirs for babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *pentagona*) crops located in Tumbaco, Pichincha Province. Two methods of viral concentration were tested, skimmed milk flocculation and filtration using glass wool followed by polyethylenglycol precipitation. Babaco leaves, fruits and roots samples showing symptoms of virosis, including leaf yellowing and leaf curling, were collected to determine if the same type of virus was present in both plant and water. RNA was extracted from viral and plant concentrates, complementary DNA was synthesized and amplified using generic primers for *Potexvirus*, *Tombusvirus*, and *Tobamovirus*. Sequencing results for water samples indicated the presence of a *Tombusvirus*, a *Mandarivirus* and a *Potexvirus*. In both water and leaves and roots samples, several strains of a *Potexvirus* similar to *Lagenaria Mild Mosaic Virus* and *Alternanthera Mosaic Virus* were identified showing percentages of identity below the demarcation criteria for the genus. The results show that water can be a mechanism of virus transmission and revealed the presence of several undescribed, potentially phytopathogenic, virus species that could pose a threat to several crops in the country.

Key words:

- **LEAF CURLING**
- **LEAF YELLOWING**
- **PHYTOPATHOGENS**
- **VIRUSES**

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del Problema

En la actualidad se conocen cerca de 3705 virus de los cuales alrededor de 1000 son fitopatógenos (Kumar, Manchev, Patil, & Ivanona, 2016). Pocos virus, como el *Tobacco Mosaic Virus (TMV)*, pueden persistir largos periodos de tiempo en el ambiente, la mayoría de virus se transmiten de un hospedero a otro utilizando diferentes estrategias, como vectores, por propagación vegetativa a través de injertos, semillas o polen procedentes de plantas infectadas (Gergerich & Dolja, 2006). Otra forma de transmisión es el uso de herramientas de poda o similares sin desinfección (Kumar, Manchev, Patil, & Ivanona, 2016).

La presencia de virus fitopatógenos fuera de sus hospederos o vectores ha sido poco estudiada debido a la dificultad para detectar virus en matrices complejas como el suelo o ambientes acuáticos, ya sea por su baja concentración o porque no representaban problemas de salud pública, sin embargo virus fitopatógenos de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* han sido aislados a partir de muestras de agua de ríos y lagos en Alemania (Koenig & Lesemann, 1985) y en la actualidad más reportes se suman debido al potencial de contaminación de grandes extensiones de cultivos por agua de irrigación contaminada (Sevik, 2011); (Mehle & Ravnkar, 2012).

En el Ecuador son pocos los registros de virus fitopatógenos que afectan a los cultivos de interés, así como el estudio de sus fuentes y mecanismos de transmisión, lo cual es necesario si se pretenden establecer controles de diseminación de estas partículas y prevenir el desarrollo de enfermedades virales difíciles de controlar, que podrían devenir en disminución de la productividad y afectación de la calidad de los productos finales. En la provincia de Pichincha, cultivos frutales como el babaco se han visto afectados por virus, donde se han distinguido síntomas como clorosis en forma de mosaico, ampollamiento y deformación en hojas, de los cuales no han sido identificados los agentes causales a través de técnicas de biología molecular. Se ha reportado en babaco la presencia del virus del Mosaico de la Papaya (*PapMV*), únicamente por medio de microscopía electrónica y técnicas serológicas (Pisi & Vicchi, 1989).

Es necesario entonces confirmar dichos resultados mediante técnicas de biología molecular, las cuales en la actualidad, junto con las técnicas de secuenciación, han permitido establecer relaciones entre grupos, géneros y familias, lo que ha mejorado el conocimiento de la variedad de virus existentes, la especificidad de hospederos y el descubrimiento de virus en nuevos hospederos y nuevas localidades (Jordan, Guaragna, Van Buren, & Putnam, 2008).

## 1.2. Justificación del Problema

El Ecuador es un país que posee una amplia diversidad biológica, debido a su ubicación geográfica estratégica y la existencia de microclimas que favorecen la producción de ciertos cultivos. Esta riqueza proyecta la actividad agrícola y la seguridad alimentaria, como actividades de importancia económica nacional (PRO ECUADOR-Inversiones, 2012); (Robles, Herrera, & Torres, 2016).

En el Ecuador el cultivo de babaco se realiza principalmente en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Azuay y Loja; y es de interés para los agricultores, por su alto rendimiento en pequeñas superficies (Soria, 1997). Este frutal está dentro del grupo de cultivos no tradicionales; su comercialización es interna, con gran demanda debido a sus propiedades nutricionales y usos medicinales.

Es un fruto con gran potencial de exportación e industrialización. En la década de 1990, se exportaba babaco hacia el mercado internacional, a países como Holanda y Alemania. Pero para el año 2000, la producción y comercialización de esta fruta decayó debido principalmente a problemas fitosanitarios y al limitado conocimiento de los agricultores en cuanto al mantenimiento del cultivo (Quindi, 2004); (Tobar, 2008). Por ello la mejora de la calidad de los cultivos y el conocimiento de los agentes fitopatógenos que afectan al babaco en nuestro país, permitirá reducir las pérdidas registradas en la productividad. El conocimiento de las fuentes de contaminación y transmisión de virus, a través de la detección e identificación de virus fitopatógenos de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en plantas y aguas de riego de cultivos de Babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii*. var. *pentagona*), permitirá elaborar planes de control; promoviendo el interés

de los agricultores por retomar la producción y comercialización interna y externa de este frutal andino.

La información generada enriquecerá el conocimiento, bastante limitado, sobre los patógenos del babaco, con la posibilidad de determinar inclusive la presencia de especies de virus que no han sido reportadas previamente en el país. Finalmente este estudio puede replicarse para el análisis de virus fitopatógenos de otros cultivos de interés para el país, así como de virus patógenos humanos que puedan ser transmitidos por aguas de riego.

### **1.3. Objetivos de la Investigación**

#### 1.3.1. Objetivo general

Detectar e identificar virus de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en plantas y aguas de riego de cultivos de Babaco (*Vasconcellea × heilbornii*. var. *pentagona*), en la provincia de Pichincha.

#### 1.3.2. Objetivos Específicos

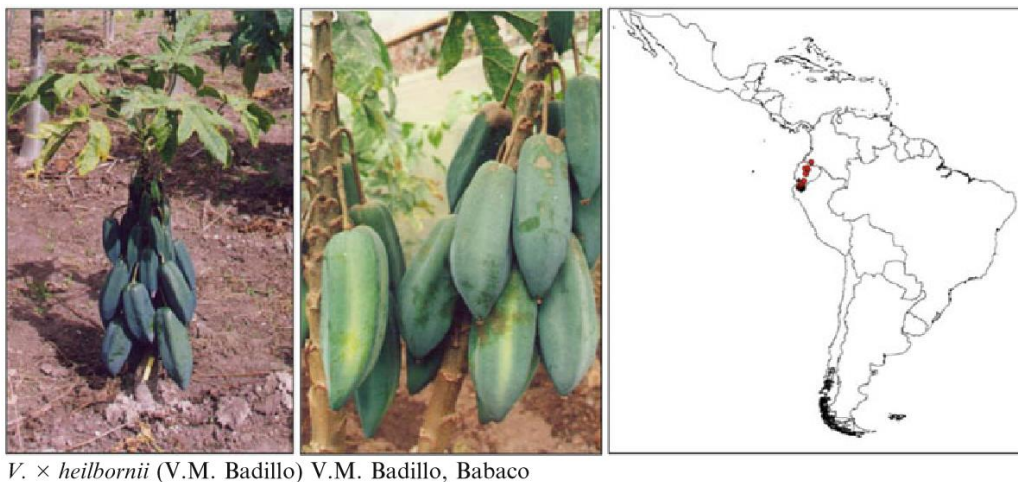
- Evaluar dos técnicas de concentración de partículas virales en muestras de agua de riego.
- Identificar la presencia de virus de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus*, mediante técnicas de biología molecular.
- Determinar si el agua de riego es una posible fuente de contaminación de cultivos de babaco infectados.

### **1.4. Marco Teórico**

#### 1.4.1. Babaco (*Vasconcellea × heilbornii*. var. *pentagona*)

#### 1.4.1.1. Origen e Historia

El babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii*. var. *pentagona*), es una planta nativa de las montañas subtropicales del Ecuador, región sur del callejón interandino, específicamente de la provincia de Loja. Se puede encontrar también al norte de Perú (Fig 1.) y al sur de Colombia (Scheldeman, y otros, 2011); (Soria & Viteri, 1999). Según Lim (2012), el babaco es conocido también con otros nombres tales como “papaya de altura”, “papaya de montaña” o “hijo del sol”.



**Figura 1.** Hábito de crecimiento y Distribución del Babaco (*V. x heilbornii*) en América del Sur. Fuente: (Scheldeman, y otros, 2011).

Heilborn en 1992, realizó por primera vez la descripción taxonómica del babaco, asignándole el nombre de *Carica pentagona*, por sus similitudes con la papaya (*Carica papaya*). Más tarde, en el año 2000, gracias a análisis filogenéticos, se demostró que las denominadas “papayas de montaña”, pertenecen a un género distinto a *Carica*, se estableció el género *Vasconcellea*; y se describió al babaco como un híbrido natural partenocárpico, derivado del cruce entre *Vasconcellea cundinamarcensis* (Chamburo) y *Vasconcellea stipulata* (Toronche), especies que se distribuyen desde Centro América hasta el norte de Perú, respectivamente (Scheldeman, y otros, 2011).



#### 1.4.1.2. Condiciones ambientales

El babaco se desarrolla en valles cálidos y lugares secos. Crece en altitudes comprendidas entre los 1500 y 2500 msnm, a una temperatura entre 14 y 20°C, con humedad relativa del 70 al 80% y precipitaciones anuales de 600-1400 mm para su óptimo crecimiento (Soria, 1997); (Soria & Viteri, 1999); (Lim, 2012). Además este cultivo se adapta a varios tipos de suelos, ya sean arenosos, arcillosos o limosos con pH entre 5.8 a 8.2 (Viteri, 1992).

#### 1.4.1.3. Características botánicas y productivas

La planta de babaco es un arbusto herbáceo, que puede alcanzar alturas de 1,5 a 4 m. Su sistema radicular es poco profundo, con raíces tuberosas de color marrón claro. Su tronco presenta cicatrices foliares similares a la papaya, no es leñoso, es cilíndrico y de color verde cuando joven y marrón grisáceo cuando es adulto, no presenta ramificaciones. Presenta hojas alternas, grandes de hasta 60 cm de diámetro, verdes, palmeadas con cinco a siete lóbulos, nervaduras medias y venas laterales sobre pecíolos largos que sobresalen del tronco, similares a la papaya. Es una planta dioica, cuyas flores son únicamente femeninas y solitarias, surgen de la axila de la hoja, son de color amarillo y sépalos verdes. Los frutos por otra parte, son partenocárpico, es decir no contienen semillas; tienen una forma pentagonal de 20 a 30 cm de longitud y de 12 a 18 cm de ancho, de color verde y de color amarillo al madurar, su pulpa es blanca amarillenta, muy jugosa y ácida. Su propagación es por vía asexual o vegetativa, a través de estacas o por injertos (Lim, 2012); (Robles, Herrera, & Torres, 2016).

#### 1.4.1.4. Usos

El babaco es un frutal que tiene alto valor nutricional, gracias a su alto contenido de potasio, vitamina C, vitamina B2, B3 y vitamina A. Presenta un alto contenido de enzimas proteolíticas, atractivas para la industria, además es usado como laxante en las comunidades donde se cultiva (Lim, 2012).

#### 1.4.1.5. Taxonomía

**Dominio:** Eucariota

**Reino:** Viridiplantae

**Filo o División:** Fanerógamas

**Subdivisión:** Angiospermas

**Clase:** Eudicotiledóneas

**Subclase:** Rósidas

**Orden:** Brassicales

**Familia:** Caricaceae

**Género:** *Vasconcellea*

**Especie:** *V. x herilbornii* var. *pentagona*

Fuente: (NCBI, 2016).

#### 1.4.1.6. Principales enfermedades del babaco

En los cultivos de babaco se han reportado síntomas causados por diferentes agentes fitopatógenos, como hongos, bacterias, nematodos y virus.

##### 1.4.1.6.1. Enfermedades causadas por hongos

En cultivos de babaco se han reportado varias enfermedades fúngicas tales como la denominada Cenicilla causada por *Oidium caricae* que ataca principalmente al envés de las hojas, donde aparecen manchas blancas de aspecto polvoso que generan áreas cloróticas en el haz de la hoja, este hongo puede atacar también los peciolo y pedúnculos florales. La lancha temprana, una enfermedad que ataca al sistema foliar y presenta manchas amarillas que se tornan pardas y generan grandes zonas necróticas, cuyo agente causal es *Alternaria* sp. La pudrición del fruto causada por *Collectotrichum* sp. y la pudrición del cuello causada por *Phytophthora* sp. (Viteri, 1992).

Se ha observado también otras enfermedades como la antracnosis causada por *Mycosphaerella* sp., se caracteriza por presentar manchas irregulares que en estados avanzados provocan que las hojas se resquebrajen y el tejido necrosado se caiga; cuando los frutos son infectados, los síntomas aparecen en la maduración como látex exudado, lesiones circulares y blandas en su superficie. La Marchitez Vascular del Babaco (MVB), causada por *Fusarium oxysporum*., es una enfermedad ampliamente distribuida en el país, fue caracterizada en el año 2000 y se han reportado grandes pérdidas en el rendimiento de cultivos de babaco para el sector productivo. En esta enfermedad el patógeno invade el sistema vascular de la planta provocando necrosis de las células de los tejidos conductores, lo que se puede traducir en síntomas como clorosis y marchitamiento general de la planta y posteriormente la muerte (Robles, Herrera, & Torres, 2016).

#### 1.4.1.6.2. Enfermedades causadas por bacterias

Existen dos enfermedades bacterianas que atacan al babaco, la primera es el tumor del cuello causada por *Agrobacterium* sp., la enfermedad inicia su ataque a través de heridas producidas por las herramientas de trabajo o insectos, y se caracteriza por la formación de tumores arrosetados. La segunda es la pudrición radical cuyo agente causal es *Erwinia carotovora*, bacteria que provoca una pudrición de color negro en la base del tallo como consecuencia el follaje se torna flácido y amarillento, el efecto de la enfermedad es grave y llega a causar muerte rápida de la planta (Viteri, 1992).

#### 1.4.1.6.3. Enfermedades causadas por nematodos

Las enfermedades causadas por nematodos generalmente ocurren posteriormente a infecciones causadas por hongos o bacterias. Las principales especies de nematodos que atacan al babaco son *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica*, causan agallas en las raíces, lo que afecta el paso de agua y minerales a la planta, retardan su crecimiento y causan amarillamiento, flacidez y marchitamiento de los tallos (Quindi, 2004); (Robles, Herrera, & Torres, 2016).

#### 1.4.1.6.4. Enfermedades causadas por virus

Por otra parte, enfermedades causadas por virus no han sido ampliamente descritas para cultivos de babaco. Viteri (1992) menciona que en el Ecuador se han observado síntomas asociados a virosis, como mosaicos, enanismo en las plantas y deformaciones en las hojas, que se manifiestan desde los primeros meses de desarrollo del cultivo, más no se describe el agente causal. Se conoce que el Virus del Mosaico de la Papaya, *PapMV* por sus siglas en inglés, infecta al babaco, cuyo síntoma principal es la presencia de manchas de color verde claro en las hojas jóvenes (Marina & Giordano, 1988). Las hojas presentan atrofia en el tamaño y cuando la infección está en un estado más avanzado, adquieren un aspecto rugoso y aclaramiento en las venas. La transmisión de este virus es de forma mecánica y por propagación vegetativa (estacas o injertos) a partir de plantas infectadas (Robles, Herrera, & Torres, 2016).

Además Gonzales y Trujillo (2005), encontraron que *Vasconcellea cauliflora*, especie cercana al babaco, era susceptible al virus de la mancha anillada de la lechosa (*Papaya ringspot virus*, PRSV), lo que puede significar que especies del género *Vasconcellea* pueden ser hospederos de dicho virus, a pesar de la resistencia reportada en otros miembros del mismo género.

#### 1.4.1.7. Producción nacional de babaco

El babaco se cultiva en Ecuador desde la década de los 80's, en un inicio en huertos familiares y en la actualidad de forma comercial a cielo abierto o en invernaderos, para un mejor rendimiento y calidad (Soria, 1997); (Soria & Viteri, 1999). Las provincias donde se cultiva son Imbabura (Atuntaqui y Perucho), Pichincha (Tumbaco), Azuay (Gualceco y Santa Isabel), Loja (Vilcabamba y Catamayo) y Tungurahua (Patate y Baños), siendo esta última la que cuenta con mayor extensión de cultivo para comercialización (57% del total nacional). Se estima que existen entre 150 a 200 ha cultivadas de babaco, tanto a cielo abierto como en invernaderos (Espinoza, 2016).

Datos bibliográficos señalan que a finales de la década de 1990, las exportaciones de babaco sufrieron un incremento acelerado hacia el mercado internacional, a países como

Holanda y Alemania. Pero para el año 2000, la producción y comercialización de babaco decayó notablemente, por problemas relacionados con la escasez de plantas de buena calidad para iniciar los huertos, tomando en cuenta su forma de reproducción (propagación asexual), complejo de plagas que afectan su desarrollo y el escaso conocimiento en cuanto a prácticas de manejo para producción a gran escala (Quindi, 2004); (Tobar, 2008).

El fruto del babaco posee gran potencial de exportación, se considera un cultivo exótico y presenta características que le dan ventaja en el mercado internacional, como su cutícula delgada, la ausencia de semillas, agradable sabor de la pulpa y fuerte aroma frutal (Robles, Herrera, & Torres, 2016).

#### 1.4.2. Virus: Generalidades

Los virus son un conjunto de moléculas de uno o más ácidos nucleicos, encapsulados en una cubierta proteica protectora. Se consideran parásitos intracelulares obligados ya que requieren de la maquinaria celular de su hospedero para llevar a cabo su replicación. Son capaces de infectar organismos eucariontes, bacterias y arqueas (Hull, 2009).

En base a la composición molecular y genética del genoma viral empacado en las partículas víricas, y según la relación entre el genoma y el ARN mensajero, propuesto por David Baltimore en 1971, se puede agrupar los virus en siete clases: aquellos que poseen ADN de doble cadena, ADN de simple cadena, ARN de doble cadena, ARN de simple cadena, ARN de simple cadena de sentido negativo, ARN de simple cadena de sentido positivo y los de ADN con intermediarios de ARN (Cann, 2005); (Kumar, Manchev, Patil, & Ivanona, 2016).

El estudio de virus fitopatógenos comenzó a finales del siglo XIX con los descubrimientos del microbiólogo holandés Martinus Beijerinck y el investigador ruso Dmitrii Iwanowski, quienes investigaban la causa de una misteriosa enfermedad que atacaba plantas de tabaco. Estos investigadores describieron de forma independiente el agente causal de dicha enfermedad, el cual se distinguía por su diminuto tamaño, en comparación con otros microorganismos (Gergerich & Dolja, 2006). El agente fue denominado como *Tobacco Mosaic Virus (TMV)* y es considerado el primer virus descrito.

Los virus fitopatógenos se distribuyen ampliamente a nivel mundial, son causantes de enfermedades perjudiciales que provocan enormes pérdidas en la producción y calidad de los cultivos. Los síntomas causados por dichos virus pueden presentarse en las hojas, tallo, frutos y flores, como clorosis en forma de mosaicos, manchas, deformación, retraso en el crecimiento y en ciertos casos la muerte de la planta. La mayoría presenta un genoma de ARN de cadena simple (Agrios, 2005). Debido a su incapacidad para persistir en el ambiente, emplean diferentes estrategias de transmisión de un hospedero a otro, estas incluyen vectores como artrópodos, nematodos y hongos fitopatógenos; por propagación vegetativa a través de injertos, estacas, semillas o polen procedentes de plantas infectadas (Gergerich & Dolja, 2006). Se ha descrito también la transmisión a plantas sanas por contacto con plantas infectadas, a través de herramientas de cultivo sin desinfección o las manos de los agricultores, suelo y agua contaminada (Kumar, Manchev, Patil, & Ivanona, 2016).

#### 1.4.2.1. Virus en medios acuáticos

La detección de virus en matrices complejas como el agua, ha sido tema de estudio desde hace más de 70 años. El primer reporte demostró la transmisión del virus de la Influenza A, a través de agua contaminada con sedimentos de heces fecales de patos infectados en lagos de Canadá (Hinshaw, Webster, & Turner, 1979). A partir de esta fecha, la virología ambiental se estableció como una disciplina científica, ya que se concluyó que el origen de varios brotes de enfermedades virales era la contaminación del agua de consumo con aguas residuales provenientes de poblaciones infectadas, lo que significaba un gran problema de salud pública.

Con el tiempo, más reportes demostraron la importancia de detectar e identificar virus en diferentes medios acuáticos (ANEXO 1) como agua de mar, de ríos, lagos, aguas residuales y de consumo (Metcalf, Melnick, & Estes, 1995).

En cuanto a la transmisión de virus fitopatógenos a través del agua, el primer reporte menciona virus de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus*, detectados en agua de ríos y lagos de Alemania (Koenig & Lesemann, 1985). Ésta investigación se basó en la infección de plantas tipo con sedimentos resuspendidos de las muestras

tomadas. Ahora se sabe que los virus pueden ser liberados de las raíces de plantas enfermas y reabsorbidos en las partículas del suelo para diseminarse a través del agua, en el caso de cultivos que se mantienen en invernadero, donde el agua circula por toda el área; o en el caso de cultivos hidropónicos (Mehle & Ravnikar, 2012); (Kumar, Manchev, Patil, & Ivanona, 2016).

En los últimos diez años, se han reportado al menos siete diferentes géneros de virus fitopatógenos en medios acuáticos: *Carmovirus*, *Cucumovirus*, *Diathovirus*, *Tobamovirus*, *Necrovirus*, *Potexvirus* y *Tombusvirus*, de los cuales los que presentan mayor incidencia reportada son los pertenecientes a los géneros *Potexvirus* y *Tombusvirus* (Koenig & Lesemann, 1985); (Mehle & Ravnikar, 2012).

#### 1.4.2.1.1. Detección de virus en agua

El diagnóstico de los virus que afectan los cultivos es una de las principales herramientas para el manejo oportuno de enfermedades. Las prácticas de control incluyen la identificación del agente causal, control de vectores, aplicaciones fitosanitarias y el uso de cultivares resistentes a virus específicos (Chang, 2009).

Los principales métodos usados en la detección de virus en matrices acuáticas incluyen Microscopía Electrónica, métodos basados en indicadores biológicos en los hospederos (Bioensayos), técnicas serológicas como ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) o TBIA (tissue blot immunosorbent assay) y técnicas de biología molecular como RT-PCR o PCR en tiempo real, complementadas con procesos de secuenciación (Jordan, Guaragna, Van Buren, & Putnam, 2008). Debido a la baja concentración de los virus en el agua, se han desarrollado también métodos para concentrar virus, como la precipitación, cromatografía en columnas monolíticas y ultrafiltración (Sevik, 2011).

#### 1.4.2.2. *Potexvirus*

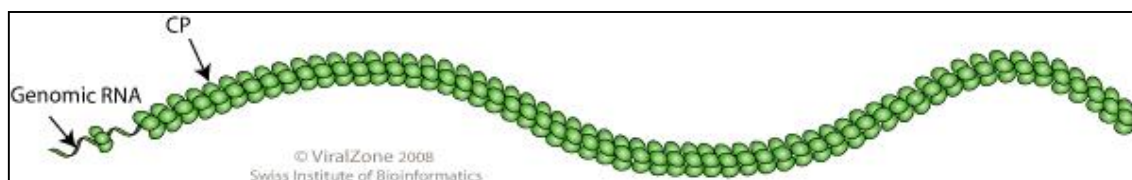
##### 1.4.2.2.1. Generalidades

El género *Potexvirus* pertenece a la familia Alphaflexiviridae del orden Tymovirales. Fue descrito por primera vez en 1971, con su miembro tipo, el Virus X de la Papa (*Potato Virus X*, PVX), por el que se le asignó el nombre en 1975 (Ryu & Hong, 2008); (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016).

Las plantas infectadas con este virus pueden presentar síntomas como mosaicos, manchas en forma de anillo, enanismo, y en ciertas ocasiones se presentan asintomáticos. En su mayoría, los *Potexvirus* no son transmitidos por vectores o semillas, sino por transmisión mecánica con savia infectada y equipo agrícola contaminado. Se conocen alrededor de 35 especies, entre ellas, virus patógenos que afectan a cultivos de bambú, cactus, flores de Hortensia, trébol, papaya, papa, entre otros (Ryu & Hong, 2008); (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016).

#### 1.4.2.2.2. Estructura y Replicación

Los virus de este género se caracterizan por la forma filamentosa, flexible y de simetría helicoidal que presentan los viriones, con 470 a 580 nm de longitud y 13 nm de diámetro (Fig 2). Están constituidos por subunidades de una proteína de cubierta simple (CP). El género posee un genoma de ARN de cadena simple y sentido positivo con un tamaño entre 5.8 a 7.5 Kpb. Su genoma codifica cinco marcos de lectura abiertos (Open Reading Frames, ORFs). El primero para la replicasa viral, los tres siguientes codifican un bloque de proteínas denominadas TGB (triple-gene block), que le permiten al virus transmitirse de una célula a otra, y el último ORF codifica la cubierta proteica (CP), como se aprecia en la Figura 3 (Verchot-Lubicz, Ye, & Bamunusingle, 2007); (Ryu & Hong, 2008).

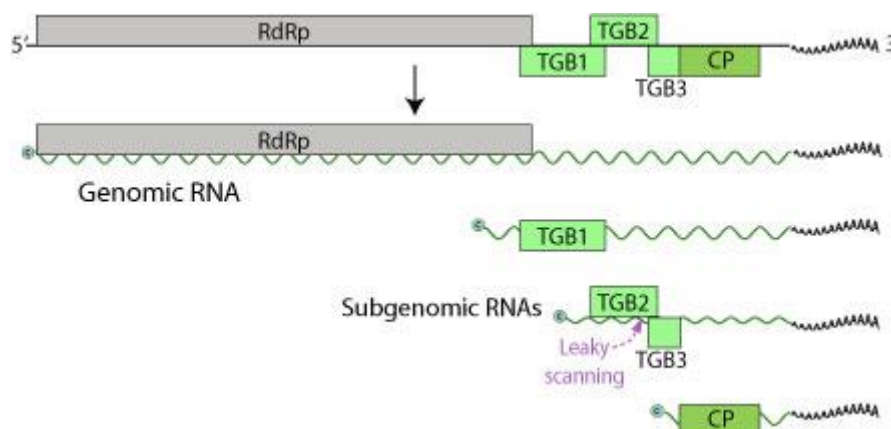


**Figura 2.** Virión de un *Potexvirus*, sin envoltura.

Fuente: (SIB, 2008).



La replicación ocurre una vez que el virus penetra en el hospedero. El ARN genómico se inserta en el citoplasma y se traduce en ARNm (ARN mensajero) para producir la replicasa dependiente de ARN (RdRp). La proteína TGB1 transforma la cadena simple de ARN (+) en una doble cadena de ARN con ayuda de factores virales, que finalmente se ensambla en una nueva partícula viral. Por otra parte, las proteínas TGBp (Triple gene block proteins) median la transferencia del virus a otras células y permiten el movimiento a través de largas distancias (SIB, 2008).



**Figura 3.** Expresión genómica del género *Potexvirus*. Genoma lineal ssRNA (+). Fuente: (SIB, 2008).

#### 1.4.2.3. *Tombusvirus*

##### 1.4.2.3.1. Generalidades

El primer informe que se tiene del género *Tombusvirus* data de 1971, año en el que se reportó su miembro tipo, el Virus del enanismo arbustivo del tomate, por sus siglas en inglés *Tomato bushy stunt virus* (TBSV); y a partir del cual, el grupo tomó su nombre en 1975. Pertenece a la familia Tombusviridae y hasta la actualidad no ha sido asignado a un orden (ICTV, 2016).

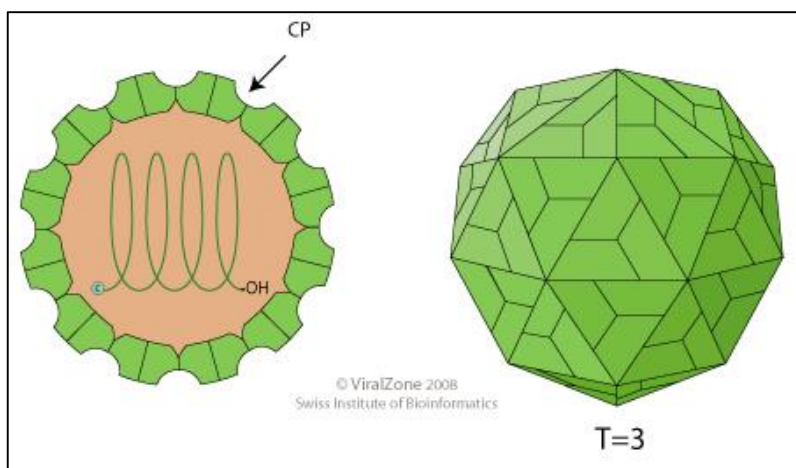
La mayoría de especies de este género se encuentran en regiones templadas ya que los viriones son muy estables a temperaturas menores a 90°C, y también a medios ácidos (pH=5 a 6.5). Están ampliamente distribuidas y presentan un rango de hospederos de cerca de 120 especies de plantas mono y dicotiledóneas. Se propagan fácilmente por

inoculación con savia infectada, por propagación vegetativa de plantas enfermas, a través de semillas y también es común la transmisión por suelo. Los síntomas que presentan las plantas infectadas incluyen manchas, malformación de hojas, enanismo y en algunos casos lesiones necróticas. Se transmiten a través de semillas y polen infectado, así como material de propagación infectado y transmisión mecánica (Martelli, Gallitelli, & Russo, 1988); (Lommel & Sit, 2008).

En este género se conocen alrededor de 17 especies de virus patógenos que afectan a cultivos como el pepinillo, uva, berenjena y ciertas especies de la familia *Pelargonium* (ICTV, 2016).

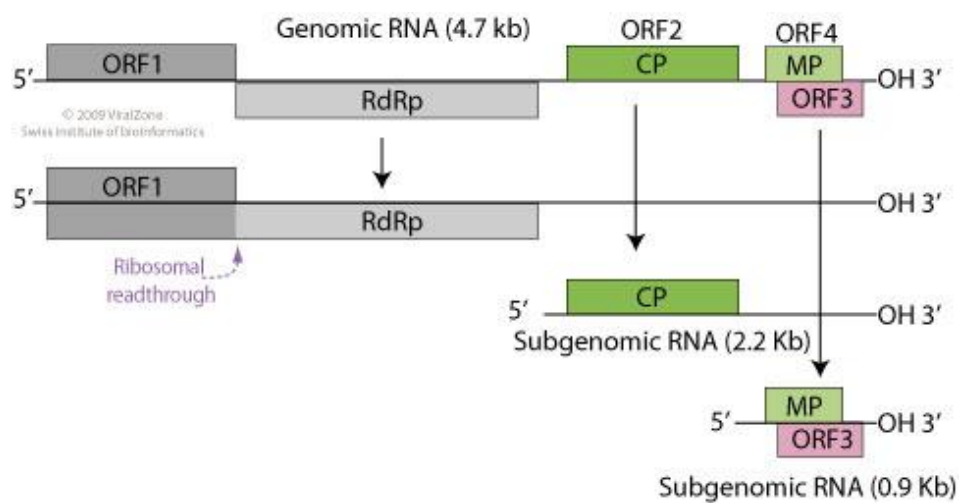
#### 1.4.2.3.2. Estructura y Replicación

Los miembros del género *Tombusvirus* presentan partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diámetro, no tienen envoltura y contienen 180 subunidades idénticas de cubierta protéica (CP) de 387 aminoácidos de longitud. Su genoma consiste de una cadena simple de ARN de sentido positivo de 4.7 Kpb (Fig. 4), o dos segmentos lineales que pueden ser monopartidos o bipartidos (Lommel & Sit, 2008).



**Figura 4.** Cápside icosaédrica de Tombusviridae, T=3 está compuesta por 12 pentámeros y 20 capsómeros. Fuente: (SIB, 2008).

El ARN del virión es infeccioso y sirve al mismo tiempo como genoma y ARN mensajero. Posee cinco ORFs que codifican para el complejo de replicación, la proteína de cubierta y los genes para el movimiento de las proteínas, como se observa en la Figura 5. El proceso de replicación tiene lugar en el citoplasma del hospedero. Tras la generación de ARN de doble cadena se produce nuevo ARNm y ARN de simple cadena. Los promotores sub genómicos internos en el ARN de sentido negativo son reconocidos por la RdRp reconoce y posteriormente transcritos para formar la cápside y las proteínas de movimiento (SIB, 2008).



**Figura 5.** Genoma de Tombusviridae, monopartido lineal.

Fuente: (SIB, 2008).

#### 1.4.2.4. *Tobamovirus*

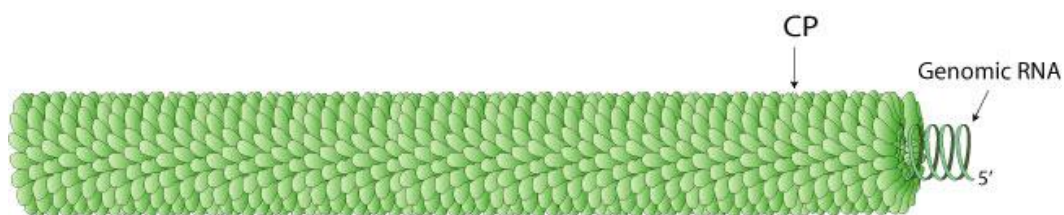
##### 1.4.2.4.1. Generalidades

El género *Tobamovirus* es uno de los grupos de virus más estudiados. Tienen un amplio rango de hospederos, principalmente angiospermas como tabaco, tomate, pimienta, orquídeas y pepinos (Taylor & Foster, 1998). Se reportó como grupo por primera vez en 1975, pero el Virus del mosaico del Tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV), perteneciente a este género, fue el primer virus fitopatógeno descrito, gracias al cual el grupo lleva el nombre. Perteneció a la familia Virgaviridae, orden no asignado hasta la actualidad y

abarca alrededor de 35 especies reportadas (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016).

#### 1.4.2.4.2. Estructura y Replicación

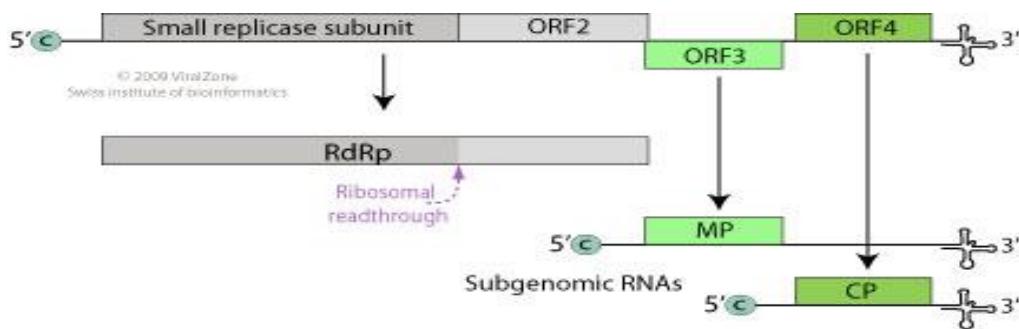
El genoma de *Tobamovirus* está compuesto por ARN de cadena simple y sentido positivo, con una extensión de entre 6300 a 6800 nucleótidos. Las partículas víricas son rígidas y de forma tubular con dimensiones aproximadas de 300 x 18 nm<sup>2</sup> con un núcleo central hueco de 4 nm de diámetro. Cada partícula está constituida por aproximadamente 2100 subunidades proteicas ordenadas en forma de hélice que encierran al genoma (Figura 6). Estos virus son capaces de subsistir en savia infectada por varios años, y provocan síntomas como manchas y mosaicos en la planta huésped. Se transmiten por contacto con savia o suelo contaminado y muchas veces por semillas, no se conocen vectores específicos (Taylor & Foster, 1998); (Lewandowski, 2008).



**Figura 6.** Virión de *Tobamovirus*, sin envoltura con simetría helicoidal.

Fuente: (SIB, 2010).

Contiene cuatro ORFs, los dos cercanos al extremo 5' están superpuestos y se encargan de codificar la replicasa (Figura 7), el ORF del lado 3' se encarga de codificar para la cubierta proteica y la proteína de movimiento. En cuanto al mecanismo de replicación, tanto los viriones como el ARN viral son capaces de infectar plantas y protoplastos. Inicialmente se da la traducción de la proteína de cubierta (CP) a partir de un RNA mensajero específico y se forma un complejo de replicación. Posteriormente una cadena de ARN complementaria de sentido negativo es sintetizada a partir del genoma, que sirve como molde para la síntesis de ARN mensajero; este proceso tiene lugar en los ribosomas (Lewandowski, 2008) ; (SIB, 2010).



**Figura 7.** Genoma monopartido de *Tobamovirus*. Fuente: (SIB, 2010).

#### 1.4.3. Transcripción inversa seguida por la Reacción en cadena de la Polimerasa RT-PCR, (Reverse transcription polymerase chain reaction)

Los métodos de identificación y detección basados en el análisis de ácidos nucleicos han sido usados extensamente desde la invención de la reacción de la PCR (Polymerase Chain Reaction). La Transcripción inversa acoplada con la Reacción en cadena de la Polimerasa conocida como RT-PCR, por sus siglas en inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, es una técnica de biología molecular empleada desde los 80's, para la transcripción de ARN genómico de virus a ADN complementario (ADNc), utilizando transcriptasa reversa. Entonces el ADNc sirve como modelo para la amplificación por PCR (Chang, 2009).

Forma parte de los métodos directos para la detección de enfermedades fitopatógenas, de mayor uso por su alta sensibilidad. En sí la técnica de PCR provee alta sensibilidad y especificidad en los resultados, debido a la fidelidad de la amplificación de ADN. La reacción de PCR depende de la eficacia en la extracción de los ácidos nucleicos y la ausencia de inhibidores (Fang & Ramasamy, 2015)

### 1.5. Hipótesis

El agua empleada para el riego de cultivos de babaco contiene virus fitopatógenos, por lo que podría ser una fuente transmisión de dichas partículas para este cultivo.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Zona de estudio**

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, que se encuentra ubicado en la Av. General Rumiñahui S/N y Sector La Colina (coordenadas: 0°18'53"Sur 78°26'36"Oeste).

La obtención de las muestras se realizó en los afluentes y efluentes de aguas de riego usadas en los cultivos de babaco de la Granja experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la Provincia de Pichincha, ubicado en la Av. Interoceánica km 15 y Eloy Alfaro, sector Tumbaco (coordenadas: 00°12'56''Sur 78°24'44'' Oeste), denominado Reservorio 1 y en la Granja Experimental Tumbaco de la Universidad Central del Ecuador (GET-UCE), ubicada en la Av. Universitaria, sector La Morita, denominado Reservorio 2.

### **2.2. Duración de la investigación**

La investigación inició el 17 de agosto del 2016 y finalizó el 25 de abril del 2017.

### **2.3. Procedimientos**

#### **2.3.1. Toma de muestras de las aguas de riego y plantas**

Para cada muestra se recolectaron entre 10 y 60 litros de agua de riego de los dos reservorios antes mencionados, utilizando contenedores plásticos estériles de 10 L de volumen y procurando tomar el agua de las profundidades. Se realizó una filtración previa, con el fin de eliminar residuos vegetales y tierra que pudiera afectar los procedimientos posteriores. Para ello se utilizó un filtro casero de diámetro de 50µm, conectado a una bomba de agua periférica de 0,6 HP. Se midieron las condiciones de temperatura y pH del agua después de la filtración.

Además se recolectaron hojas, frutos y raíces de plantas de babaco con síntomas de virosis y se almacenaron en tubos plásticos de 15 mL con papel absorbente y sílica gel a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### 2.3.2. Acondicionamiento de muestras de agua para la obtención de concentrado viral

El concentrado viral se realizó siguiendo la metodología descrita por Calgua *et al.* (2008), la cual consiste en una floculación orgánica usando leche descremada. Inicialmente se ajustó el pH de 10 L de muestra de agua de riego hasta 3,5, adicionando HCl 1N, en agitación.

Se preparó una solución de leche descremada al 1% (w/v) en agua de mar artificial (33,33 g de sal marina por litro de agua destilada), con un pH de 3,5. Se agregó 100 mL de esta solución por cada 10 L de muestra, previamente acidificada. Las muestras se dejaron en agitación durante 8 h a temperatura ambiente, para permitir la adsorción de los virus en los flóculos de leche. Posteriormente se aplicó un período de decantación de los sedimentos de 8 h adicionales. El sobrenadante fue removido, procurando no agitar el sedimento, recolectándolo en tubos de plástico de 50mL. Se centrifugó a  $4000\times g$  por 90 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet fue resuspendido en buffer fosfato 0,2 M (1:2 v/v de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 7,5, hasta un volumen final de 10 mL. El concentrado se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

Por otra parte, se aplicó un segundo método, desarrollado en Oklahoma State University en base a una fusión de las metodologías descritas por Li *et al.* (1998) y Vilagines *et al.* (1993), donde se utilizó lana de vidrio previamente humedecida, durante 24 horas, con buffer fosfato salino (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,45 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0,24 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ) a pH entre 6,5 a 7, adaptada en un filtro casero, para la adsorción de los virus. Se filtraron 60 L de agua a través de este material. Posteriormente se realizó una elución de los virus usando una solución de 300 mL de buffer fosfato salino a pH de 10 y Polietilenglicol (PEG) al 7% (v/v), que previamente se dejó agitar por 2 h; se colocó la lana de vidrio en esta mezcla y se dejó reposar por 30 min. Se colectó el concentrado en tubos plásticos de 50 mL y se centrifugó a  $4000\times g$  por 90 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet fue resuspendido en buffer fosfato salino a pH de 10, hasta alcanzar un volumen

final de 10 mL. Los concentrados virales fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso (Ochoa-Corona, comunicación personal, 29 de septiembre, 2016).

Las muestras vegetales fueron desinfectadas superficialmente, utilizando una mezcla 1:2:7 (v/v) de hipoclorito de sodio 1%, etanol 20% y agua estéril durante 2 min. Se realizaron tres lavados con agua estéril para eliminar residuos y se almacenaron en tubos plásticos de 15 mL con papel absorbente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

### 2.3.3. Extracción de ARN total de los concentrados virales y de plantas infectadas

El ARN se obtuvo a partir de 600 $\mu\text{L}$  de concentrado viral (muestras de agua de riego) o 50 mg de material vegetal infectado, utilizando el Kit de extracción Plant Total RNA Extraction Miniprep System (DNALand Scientific, Green Bioserch), siguiendo las instrucciones del fabricante (ANEXO 2). Se seleccionó el buffer de lisis PRX y se maceró la muestra manualmente con ayuda de un micropistilo estéril. Una vez extraído el ARN total, se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para uso a largo plazo.

Para evitar la degradación de ARN al momento de su extracción, se utilizó RNaseZap (Ambion The RNA Company, USA), inhibidor de RNasas y se mantuvo a las muestras siempre en frío en contenedores con hielo.

### 2.3.4. Transcripción inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV Reverse Transcriptase) (Invitrogen, USA), con 5  $\mu\text{L}$  de ARN en un volumen total de reacción de 20  $\mu\text{L}$ , según las especificaciones del fabricante (ANEXO 2). Se preparó el mix A en un tubo de 0,2 mL, donde se añadió 0,5  $\mu\text{L}$  de Random Primers (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10mM), 5,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 5  $\mu\text{L}$  de ARN previamente extraído, dando un volumen total de 12  $\mu\text{L}$ . Seguidamente se calentó la mezcla a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 min en un termobloque con agitación (ESCO, PROVOCELL), inmediatamente se enfrió en hielo por 3 min. Después se agregó el mix B, el cual fue preparado, añadiendo 4  $\mu\text{L}$  de First



Strand Buffer (5X), 2  $\mu$ L de DTT (0,1 M) y 1  $\mu$ L de inhibidor de ribonucleasas RNaseOUT (40 U/  $\mu$ L). Se mezcló todo el contenido y se incubó a 37°C por 2 min. Posteriormente se agregó 1  $\mu$ L de M-MLV RT (200unidades) y se incubó a 25°C por 10 min, seguido de una incubación a 37°C por 50 min y finalmente la inactivación por calentamiento a 70°C por 15 min.

Se midió la concentración y pureza del ADNc obtenido usando el espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras se almacenaron a -20°C. A continuación el ADNc fue amplificado mediante PCR convencional, usando primers diseñados a partir de secuencias de la Polimerasa dependiente de ARN, para virus de los géneros: *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* (Tabla 1).

**Tabla 1.**

Detalle de los primers usados para detección de *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus*.

Género	Nombre	Secuencia	Longitud (nt)	T <sup>°</sup> m	Tamaño (pb)
<i>Potexvirus</i>	POTEX-F1	GAYGGIGCIATGCTICA ITT	20	68,4	169
	POTEX-R1	TCIGTRTTIGCRTCRAA IGT	20	65	
	<i>Tombusvirus</i>	TOMBUS-F3	TGGATATTIATGGTTGC IGGTT	22	64,5
TOMBUS-R2		GTAGGTTGTGGAGTGC GAG	19	61,4	70
<i>Tobamovirus</i>		TOBAMO-F2	GGWGAYGTNACIACIT TIAT	20	61,9
	TOBAMO-R2	ARYTTIGCYTCIAARTT CCA	20	62,2	

Fuente: (Ochoa Corona, Fletcher, & Olson, 2014).

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los componentes y las proporciones indicadas en la Tabla 2. Se aplicó un programa de amplificación para cada par de primers en base a la temperatura de melting ( $T^{\circ}m$ ) específica para cada uno (Olmedo Velarde & Ochoa Corona, 2016).

**Tabla 2.**

Componentes y cantidades empleadas en la reacción de PCR.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Agua libre de ARNasas</b>	-	7
<b>Go Taq Green Master Mix</b>	2X	12,5
<b>Primer Forward</b>	10 $\mu$ M	1,5
<b>Primer Reverse</b>	10 $\mu$ M	1,5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,5
<b>ADNc</b>	400 a 600 (ng/ $\mu$ L)	1
<b>Volumen Total</b>		<b>25</b>

La amplificación se realizó en el termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems), según los parámetros descritos en la Tabla 3, en función de cada par de primers (Olmedo Velarde & Ochoa Corona, 2016), con un total de 35 ciclos para cada uno.

**Tabla 3.**

Parámetros para amplificación usando primers genéricos.

<b>Etapas</b>	<b>Primers</b>	<b>Primers</b>	<b>Primers</b>
	<b>Potexvirus</b>	<b>Tombusvirus</b>	<b>Tobamovirus</b>
<b>Denaturación inicial</b>	97°C por 2 min	95°C por 3 min	95°C por 3 min
<b>Denaturación</b>	95°C por 20 s	95°C por 30 s	95°C por 30 s
<b>Annealing</b>	47°C por 30 s	50°C por 30 s	50°C por 30 s
<b>Elongación</b>	72°C por 30 s	72°C por 1 min	72°C por 1 min
<b>Elongación final</b>	72°C por 3 min	72°C por 2 min	72°C por 2 min
<b>Espera</b>	18°C por 5 min	18°C por 5 min	18°C por 5 min

#### 2.3.5. Electroforesis

La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando 40 mL de gel de agarosa al 2% con Buffer SB 1X (ANEXO 3), y 10 µL de visualizador SYBR GOLD 1000X (Invitrogen, USA).

Se corrieron 2 µL de cada muestra; como marcador molecular se usó 2 µL de Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA) o 3µL de marcador 1kb (PROMEGA) y 1 µL de buffer de carga Blue Juice. Se aplicó un voltaje de 200V por 25 min. Los geles fueron observados en un transiluminador (W/TFM-20, UVP).

#### **2.4. Determinación de virus fitopatógenos mediante Secuenciación de ADN complementario y búsqueda de homólogos mediante BLAST**

Los productos de PCR de los virus detectados en las muestras de agua y de tejido vegetal, fueron enviados a secuenciar con la empresa ©Macrogen Inc., mediante el método Sanger. Los resultados de secuenciación se analizaron con el programa bioinformático Geneious 6.0.6 (<http://www.geneious.com>). Además se realizó análisis de similitud de secuencias con organismos ya descritos en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), mediante su herramienta BLAST

(Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y así determinar los porcentajes de identidad de los virus detectados con dichas secuencias.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1.Recolección y acondicionamiento de muestras plantas de babaco y agua de riego.

Se realizaron seis muestreos de agua de riego y tres de plantas de babaco. Se observó que las condiciones de los reservorios (Figura 8) variaron entre cada toma de muestras, donde la temperatura osciló entre los 18 a 20°C y el pH entre 7 a 9 para el Reservorio 1 y para el Reservorio 2 una temperatura entre 19 a 20°C y pH de 7 a 8.



**Figura 8.** Reservorios de agua de riego, zona de toma de muestras. A) Granja Experimental INIAP Tumbaco. B) Granja La Morita UCE.

Las muestras de babaco (Figura 9) fueron recolectadas de forma aleatoria de plantas con síntomas de virosis como clorosis en forma de mosaico, deformación y ampollamiento.



**Figura 9.** Muestras de plantas de babaco. A) Hojas con deformación. B) Hoja con clorosis. C) Hoja con ampollamiento. D) Raíces de plantas enfermas. E) Fruto de babaco.

### 3.2. Concentración de partículas virales del agua de riego

Los dos métodos empleados para la concentración de virus en agua permitieron la obtención de un pellet a partir del cual se realizó la extracción de ARN total. En el caso del método de Leche descremada se obtuvo en promedio un volumen de 500 mL precipitado (Figura 10) y para el método de Precipitación con Polietilenglicol un volumen de 380 mL.



**Figura 10.** Concentración viral con el método de Leche Descremada (Skimmed Milk)  
A) Muestras en agitación. B) Flóculo formado después de decantación.

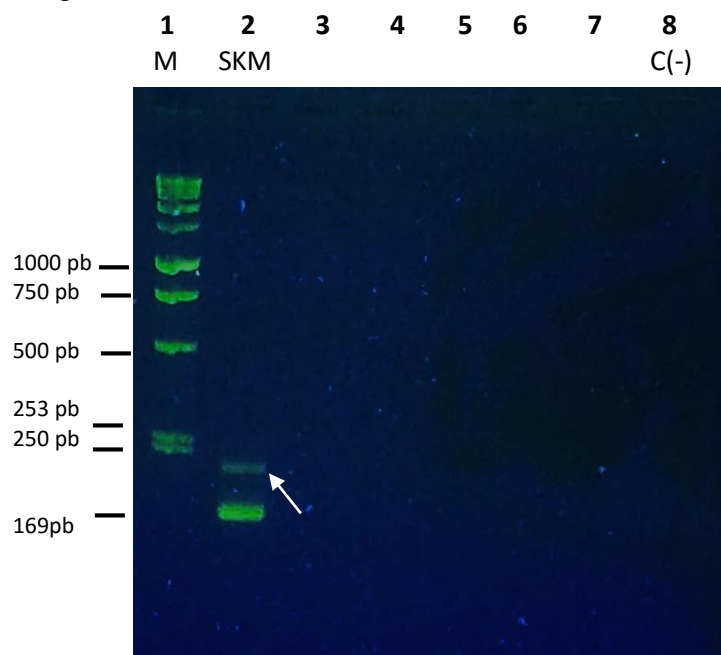
### 3.3. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Una vez extraído el ARN total, se realizó la síntesis de ADN complementario y se evaluó la calidad mediante espectrofotometría, se utilizaron las muestras con valores de 1,8 a 2 de acuerdo a los radios 260/280 y 260/230. En cuanto a cantidad, las concentraciones que se obtuvieron fueron en el rango de los 600 a 900 ng/ $\mu$ L.

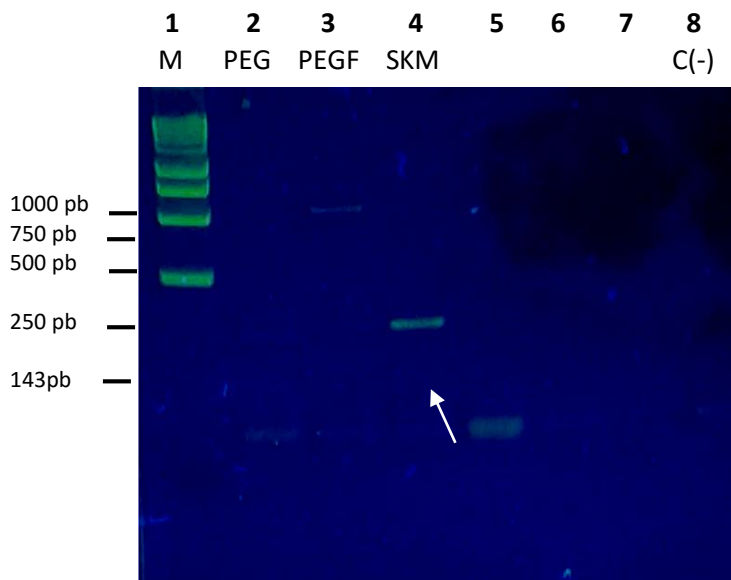
### 3.4. Amplificación de muestras mediante PCR convencional

La amplificación de cada muestra, tanto de agua como de planta, se realizó con cada par de primers antes mencionados. Una vez revelados los productos de PCR, se detectaron virus de los géneros *Potexvirus* y *Tombusvirus* en muestras de agua del Reservorio 1, con amplicones de tamaños de 169 pb y 143 pb respectivamente (Figura 11 y Figura 12), que coinciden con los tamaños esperados según el diseño de primers (Ochoa Corona, Fletcher, & Olson, 2014) . En tanto que en el Reservorio 2, se detectó una muestra positiva

solamente para el género *Potexvirus*. El género *Tobamovirus* no fue detectado en muestras de agua de riego.

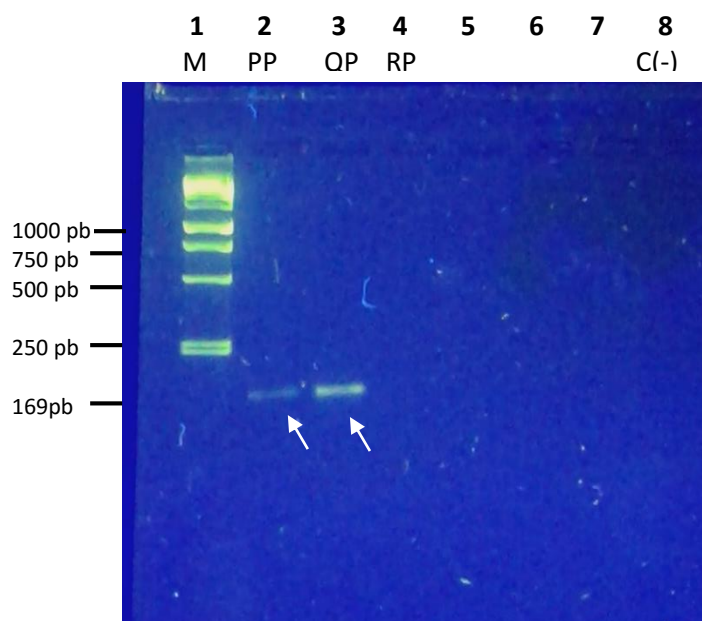


**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan productos de PCR de muestras de agua amplificadas con primers para Potexvirus. Pocillo 1: marcador 1kb (PROMEGA), Pocillo 2: muestra de agua concentrada por el método de Leche Descremada (SKM) y Pocillo 8: control negativo.

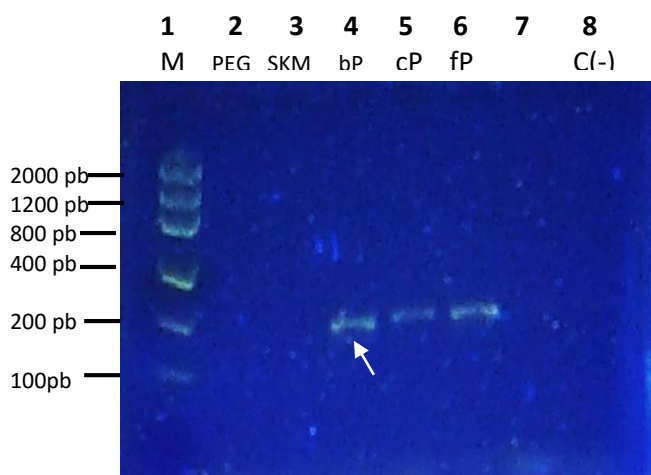


**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan productos de PCR de muestras de agua amplificadas con primers para Tombusvirus. Pocillo 1: marcador 1kb (PROMEGA), Pocillo 2 y 3: muestras de agua concentradas por el método de Precipitación con Polietilenglicol (PEG), Pocillo 4: muestra de agua concentrada por el método de Leche Descremada (SKM) y Pocillo 8: control negativo.

En muestras de babaco, se obtuvieron amplicones que corresponden a los géneros *Potexvirus* y *Tombusvirus*, según los tamaños esperados (Figuras 13, 14 y 15). Además se observó la amplificación positiva de muestras de raíces para el género *Potexvirus* (Figura 16).

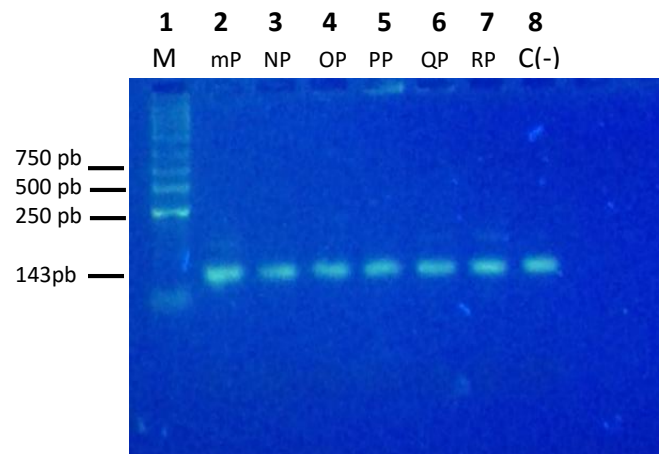


**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan productos de PCR usando primers para Potexvirus. Pocillo 1: marcador 1kb (PROMEGA), Pocillo 2, 3 y 4: muestras de hojas de babaco y Pocillo 8: control negativo.



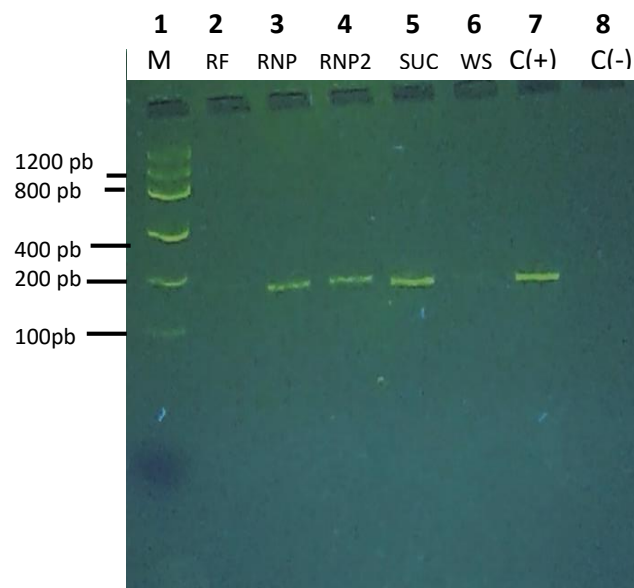
**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan productos de PCR usando primers para Potexvirus. Pocillo 1: marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), Pocillo 2 y 3: muestras de agua, Pocillo 4, 5, 6: muestras de hoja de babaco y Pocillo 8: control negativo.





**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan productos de PCR de muestras de babaco amplificadas con primers para Tombusvirus. Pocillo 1: marcador 1kb (PROMEGA). Pocillo 8: control negativo.

El ADNc de las primeras muestras secuenciadas sirvió como control positivo para las reacciones posteriores.



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan productos de PCR usando primers para Potexvirus. Pocillo 1: marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), Pocillo 2, 3 y 4: muestras de raíz de babaco, Pocillo 5: muestra de hoja de babaco, Pocillo 6: muestra de agua, Pocillo 7: control positivo y Pocillo 8: control negativo.

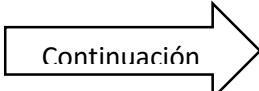
### 3.5. Resultados de secuenciación y búsqueda de homólogos mediante BLAST

Las muestras que resultaron positivas fueron enviadas a secuenciar mediante el método Sanger en la empresa ©Macrogen Inc. En la Tabla 4 se detallan los resultados obtenidos una vez que se limpiaron y ensamblaron las secuencias usando el programa bioinformático Geneious 6.0.6. Varias muestras no pudieron ser secuenciadas debido a la mala calidad de los amplicones. La búsqueda de homólogos mediante BLAST en la base de datos de GenBank del NCBI, dio como resultado la identificación de cuatro géneros diferentes de virus. Se analizó el porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos y aminoácidos.

**Tabla 4.**

Resultados de secuenciación de los productos de PCR positivos.

Muestra	Género	Especie	Porcentaje de Identidad a nivel de nucleótidos	Porcentaje de Identidad a nivel de aminoácidos
Hojas de babaco	<i>Potexvirus</i>	<i>Alternanthera Mosaic Virus</i>	71%	97%
		<i>Lagenaria Mild Mosaic Virus</i>	78%	92%
Hojas de babaco	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato Bushy Stunt Virus</i>	100%	100%
Raíces de babaco	<i>Potexvirus</i>	<i>Lagenaria Mild Mosaic Virus</i>	78%	93%
Agua Reservorio 1 método PEG	<i>Potexvirus</i>	<i>Lagenaria Mild Mosaic Virus</i>	76%	82%
Agua Reservorio 1 método PEG	<i>Tombusvirus</i>	<i>Neckar River Virus</i>	97%	93%
Agua Reservorio 1 método SKM	<i>Mandarivirus</i>	<i>Indian Citrus Ringspot Virus</i>	66%	81%



<b>Muestra</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Porcentaje de Identidad a nivel de nucleótidos</b>	<b>Porcentaje de Identidad a nivel de aminoácidos</b>
Agua Reservorio 1 método SKM	<i>Tombusvirus</i>	<i>Neckar River Virus</i>	99%	98%

PEG: Método de precipitación con Polietilenglicol; SKM: Método de floculación con Leche descremada.

Se realizó además un alineamiento entre las secuencias identificadas como *Potexvirus* y se observó un porcentaje de identidad del 97,3% en pares a nivel de nucleótidos y 100% a nivel de aminoácidos entre ellas. Se comparó también su secuencia consenso con especies relacionadas obteniéndose una identidad mínima en pares de 72.3% a nivel de nucleótidos y 81.4% a nivel de aminoácidos.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Hoy en día la dispersión de virus fitopatógenos a través del agua es uno de los aspectos más importantes dentro de la agricultura y horticultura, donde se emplean técnicas de irrigación y cultivos hidropónicos. Las enfermedades virales pueden ocasionar grandes pérdidas debido a que no pueden ser controladas con tratamientos químicos; las formas de proteger los cultivos radican en el desarrollo de plantas genéticamente resistentes o el control de los medios de propagación, como las fuentes de agua de riego (Mehle & Ravnikar, 2012).

La concentración de virus en aguas puede ser demasiado baja, por tanto, un paso previo de concentración es requerido para detectar los virus. Varios métodos han sido usados para concentrar virus fitopatógenos en muestras de agua, los cuales incluyen filtración, adsorción, precipitación, ultracentrifugación y cromatografía (Sevik, 2011). En esta investigación se probaron dos métodos de concentración viral, como se recomienda, para confirmar la presencia de virus de forma confiable.

Se aplicó el método de filtración con lana de vidrio y precipitación con polietilenglicol desarrollado en Oklahoma State University basado en las metodologías descritas por Li *et al.* (1998) y Vilagines *et al.* (1993) para virus entéricos y Poliovirus respectivamente, y que ha sido empleado con éxito en estudios previos para detectar virus fitopatógenos en agua (Gosalvez, y otros, 2003); (Hamza, Jurzik, Uberla, & Wilhelm, 2011), pero con la particularidad de la adsorción electrostática en lana de vidrio (Millen, y otros, 2012). Este método permitió la detección eficaz de dos géneros de virus fitopatógenos: *Potexvirus* y *Tombusvirus* en agua del Reservorio 1.

El segundo método aplicado fue el de floculación con leche descremada (SKM), propuesto por (Calgua, y otros, 2008) para la concentración de Adenovirus y Enterovirus; cuya efectividad fue demostrada en la presente investigación, en la detección de virus fitopatógenos de los géneros *Mandarivirus* y *Tombusvirus*, en agua del Reservorio 1. Los dos métodos mencionados proveyeron resultados positivos; sin embargo, la técnica de aplicación más sencilla, económica y con mayor número de resultados positivos fue el método SKM. La adsorción en lana de vidrio-precipitación con polietilenglicol resulta ser

complicada en condiciones de campo cuando se trata de fuentes de agua con sedimento que puede atascar el filtro, o en sitios de muestreo remotos, ya que se requiere bombas de succión, prefiltrado y ajuste previo de pH del agua (Millen, y otros, 2012). Además la diferencia de la eficacia entre métodos podría deberse a problemas en la adsorción de las partículas virales a la lana de vidrio; esto se da naturalmente por interacciones electrostáticas que pueden verse afectadas por una elevada fuerza iónica causada por la presencia de ciertas sales en el agua (Lukasik, Scott, Andryshak, & Farrah, 2000). Incluso Calgua *et al.* (2008) observaron menor porcentaje de recuperación de virus a partir de muestras de agua aplicando un método de adsorción en lana de vidrio y elución. De igual forma la determinación de parámetros iniciales del agua, como temperatura y pH, son importantes antes de concentrar virus de medios acuáticos ya que en base a estas condiciones es posible establecer una tasa mayor o menor de supervivencia de los virus y por ende una mayor recuperación de los mismos. Bajas temperaturas, pH cercanos al neutro y la presencia de materia orgánica y sólidos suspendidos puede aumentar la supervivencia de los virus en el agua (Gerba, 2007).

Mediante PCR convencional y primers degenerados diseñados para los géneros propuestos, se identificaron *Mandarivirus*, *Tombusvirus* y *Potexvirus* en muestras de agua de riego y *Tombusvirus* y *Potexvirus* en muestras de plantas de babaco. Los virus encontrados en agua, pertenecientes al género *Tombusvirus*, fueron identificados como *Neckar River Virus (NRV)* con porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos de 99% y 97% según análisis de similitud con la base de datos del NCBI. *NRV* fue aislado por primera vez a partir de muestras de agua del río Neckar en Alemania e infectado en *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana clevelandii*, para determinar su patogenicidad (Koenig & Lesemann, 1985). Cabe mencionar que los primers utilizados amplifican la secuencia de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y según los criterios de demarcación establecidos en el IX Reporte del ICTV, se analiza la identidad de la secuencia de la cápside, cuyo porcentaje debe ser menor al 85% para definir una nueva especie (ICTV, 2011); esto sugiere que el virus obtenido debe considerarse como una cepa de *NRV*. Mientras que para el género *Mandarivirus* no existen criterios de demarcación, la razón por la que se detectó este género posiblemente se debe a su alta similitud con el género *Potexvirus*, con el cual a nivel de genoma, solo presenta un ORF de diferencia (ICTV, 2011); *Indian Citrus Ringspot Virus*, la especie tipo de este género

antes de 2004 estaba considerada dentro del género *Potexvirus* (Adams, y otros, 2004), por lo que deberían re diseñarse los primers para ser más específicos.

En muestras de agua del Reservorio 1 y en hojas y raíces de babaco se detectaron cepas de un mismo *Potexvirus*. La secuencia consenso de estas cepas tiene 74% de identidad a nivel de nucleótidos con *Lagenaria Mild Mosaic Virus (LaMMoV)* y 85% de identidad con *Alternanthera Mosaic Virus (AltMV)*, virus que presentan como hospederos a cucurbitáceas y plantas ornamentales respectivamente. *AltMV* fue reportado por primera vez en Australia en 1999, infectando una Amarantacea denominada *Alternanthera pungens* (Geering & Thomas, 1999), mientras que *LaMMoV* fue detectado en 2007 infectado a una calabaza (*Lagenaria siceraria*) en Myanmar, Asia (Kim, Mizutani, Soe, Lee, & Natsuaki, 2010). Se puede observar que el rango de hospederos del género *Potexvirus* es muy extenso y según (Adams, y otros, 2004) el criterio de demarcación de especies indica que con un porcentaje de identidad menor al 72% a nivel de nucleótidos o 80% a nivel de aminoácidos entre secuencias de la cápside o secuencias de la RdRp, se puede asumir que cierta especie es distinta. Por tanto podemos concluir que las cepas del *Potexvirus* hallado en babaco representan una especie nueva debido a que al alinear su secuencia consenso con especies cercanamente relacionadas, se obtiene una identidad mínima en pares de 72.3% a nivel de nucleótidos y 81.4% a nivel de aminoácidos, y entre ellas muestran una identidad a nivel de nucleótidos del 97.3% y a nivel de aminoácidos del 100%.

Los virus encontrados en plantas de babaco no coinciden con los mencionados en estudios anteriores, aunque cabe resaltar que son escasos los reportes de virus en este frutal. Robles *et al.* (2016) menciona que uno de los virus encontrados en babaco es *Papaya Mosaic Virus, PapMV*. Este *Potexvirus* causa manchas de color verde claro en las hojas jóvenes, atrofia en el tamaño y, cuando la infección está en un estado más avanzado, las hojas adquieren un aspecto rugoso y aclaramiento en las venas; síntomas que no se corresponden totalmente a los observados en campo. Se han realizado pruebas serológicas que muestran que las partículas virales halladas en plantas de babaco son muy similares a *PapMV* (Marina & Giordano, 1988); (Pisi & Vicchi, 1989), pero no hay evidencia de ensayos moleculares de *PapMV* en babaco, por lo que es posible que este virus no haya sido identificado correctamente y se trate del mismo virus que se describe en esta investigación.

Finalmente, al haber encontrado la misma cepa de virus tanto en agua como en plantas de babaco, podríamos concluir que la hipótesis planteada es correcta y que es posible que el agua actúe como un mecanismo de transmisión de dicho virus.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Mediante transcripción inversa y PCR convencional con primers degenerados y secuenciación se detectó virus de los géneros *Potexvirus* y *Tombusvirus* en muestras de agua de riego y plantas de babaco.
- Dentro de los géneros detectados, se identificaron las especies *Alternanthera Mosaic Virus*, *Lagenaria Mild Mosaic Virus*, *Neckar River Virus* e *Indian Citrus Ringspot Virus* en agua del Reservorio 1, mientras que para el Reservorio 2 no se pudo identificar virus.
- Los dos métodos de concentración viral empleados fueron efectivos al momento de detectar virus de los géneros propuestos. Con el método de Leche descremada se detectaron los géneros *Mandarivirus* y *Tombusvirus*, mientras que con el método de precipitación con polietilenglicol, los géneros *Potexvirus* y *Tombusvirus*.
- Tanto en plantas de babaco como en agua de riego se identificó un *Potexvirus* aún no descrito, similar a *Alternanthera Mosaic Virus* y *Lagenaria Mild Mosaic Virus* indicando que el agua podría ser un mecanismo de transmisión de virus en babaco.



## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Secuenciar el genoma completo del *Potexvirus* encontrado.
- Infectar plantas modelo para determinar el rango de hospederos del *Potexvirus* encontrado.
- Analizar el suelo de la rizosfera de los cultivos de babaco infectados y determinar el ciclo de vida del *Potexvirus* encontrado.
- Diseñar nuevos primers basados en la secuencia de la cápside para corroborar los resultados de los *Tombusvirus* encontrados.
- Probar primers para otros géneros de virus fitopatógenos o utilizar técnicas de Secuenciación de siguiente generación (NGS) para identificar más virus presentes en agua de riego y plantas de babaco.
- Ampliar la zona de investigación y tomar muestras de más provincias alrededor del país para determinar la incidencia de virus en cultivos de babaco y/o aguas de riego.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. J., Antoniow, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candesse, T., Foster, G. D., . . . Fauquet, C. M. (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. (V. D. News, Ed.) *Archives of Virology*, 149, 1045-1060. doi:10.1007/s00705-004-0304-0
- Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by viruses. In *Plant Pathology*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., . . . Girones, R. (2008). Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*, 167-178.
- Cann, A. J. (2005). Principios de Virología Molecular. Zaragoza, España: Elsevier Inc.
- Chang, P. (2009). Plant Virus Diagnostics: Comparison of classical and membrane-based techniques for immunoassay and coat protein sequence characterization for Cucumber mosaic virus and three potyviruses. Virginia, USA: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg.
- Espinoza, R. R. (2016). *Biocontrol de la Marchitez Vascular del Babaco (Vasconcellea heilbornii. var. pentágona) empleando microorganismos anatagonistas (Tesis de pregrado)*. Retrieved Diciembre 2016, from Universidad Nacional de Loja: <https://dspace.unl.edu.ec>
- Fang, Y., & Ramasamy, R. P. (2015). Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. 5(3).
- Geering, A. D., & Thomas, J. E. (1999). Characterization of a virus from Australia that is closely related to papaya mosaic potexvirus. (Springer-Verlag, Ed.) *Archives of Virology*, 144, 577-592.
- Gerba, C. P. (2007). Virus Occurrence and Survival in the Environmental Waters. En A. Bosch (Ed.), *Human Viruses in Water* (págs. 91-108). Elsevier. doi:10.1016/S0168-7069(07)17005-1
- Gergerich , R., & Dolja, V. (2006). *Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor*. The American Phytopathological Society.
- Gibbs, A. J. (1977). *Tobamovirus group*. Retrieved Diciembre 2016, from Association of Applied Biologists: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=184>
- Gonzales, A., & Trujillo, G. (2005). Susceptibilidad de *Vasconcellea cauliflora* al virus de la mancha anillada de la lechosa. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22(3).

- Gosalvez, B., Navarro, J. A., Lorca, A., Botella, F., Sánchez-Pina, M. A., & Pallas, V. (2003). Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*(113), 87-93.
- Hamza, I. A., Jurzik, L., Uberla, K., & Wilhelm, M. (2011). Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Research*(45), 1358-1368. Retrieved from [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)
- Hinshaw, V., Webster, R., & Turner, B. (1979). Water-Borne Transmission of Influenza A viruses?. *Intervirology*.
- Hull, R. (2009). *Comparative plant virology*. Elsevier, Academic.
- ICTV. (2011). *ICTV Reports*. Obtenido de ICTV 9th Report: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/277/tombusviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/277/tombusviridae)
- ICTV. (2016). *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Retrieved from Taxonomy History: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Jordan, R., Guaragna, M., Van Buren, T., & Putnam, M. (2008). *First Report of a new Potyvirus, Trycyrtis virus Y, and Lily virus X, a Potexvirus, in Trycyrtis formosana in the United States*. Plant Disease.
- Kim, O., Mizutani, T., Soe, K., Lee, K., & Natsuaki, K. (2010). Characterization of Lagenaria mild mosaic virus, a New Potexvirus from Bottle Gourd in Myanmar. *Plant Disease*, 94, 1225-1230. doi:10.1094/ PDIS-02-10-0159
- King, A., Adams, M., Carstens, E., & Lefkowitz, E. (2012). Virus Taxonomy, Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Koenig, R., & Lesemann, D. (1985). *Plant Viruses in German Rivers and Lakes. I. Tombusviruses, a Potexvirus and Carnation Mottle Virus* (Vol. 112). Berlin: Phytopathology. doi:ISSN 0031-9481
- Kumar, R., Manchev, N., Patil, B., & Ivanona, M. (2016). *Plant Viruses: Evolution and Management*. Singapore: Springer Nature.
- Lewandowski, D. J. (2008). Tobamovirus. In B. W. Mahy, & M. H. van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of virology* (3 ed., Vol. 3, pp. 68-72). Elsevier.
- Li, J. W., Wang, X. W., Rui, Q. Y., Song, N., Zhang, F. G., Ou, Y. C., & Chao, F. H. (1998). A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *Journal of Virological Methods*, 74, 99-108.
- Lim, T. K. (2012). *Vasconcellea x heilbornii*. En T. K. Lim (Ed.), *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (Vol. 1, págs. 718-721). New York: Springer.

- Lommel, S. A., & Sit, T. L. (2008). Tombusviruses. In B. W. Mahy, & M. H. van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of virology* (3 ed., Vol. 3, pp. 145-151). Elsevier.
- Lukasik, J., Scott, T. M., Andryshak, D., & Farrah, S. R. (2000). Influence of Salts on Virus Adsorption to Microporous Filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2914-2920.
- Marina, B., & Giordano, P. (1988). An Elongated Virus Associated with Yellow Mosaic of Babaco. *Acta Horticulturae*(235), 149-156. doi: 10.17660/ActaHortic.1989.235.21
- Martelli, G. P., Gallitelli, D., & Russo, M. (1988). Tombusviruses. In R. Koenig (Ed.), *The Plant Viruses-Polyhedral Virions with Monopartite RNA Genomes* (Vol. 3, pp. 13-25). New York: Plenum Press.
- Mehle, N., & Ravnikar, M. (2012). *Plant Viruses in aqueous environment-Survival, mediated transmission and detection*. ELSEVIER Review.
- Metcalf, T. G., Melnick, J. L., & Estes, M. K. (1995). ENVIRONMENTAL VIROLOGY: From Detection of Virus in Sewage and Water by Isolation to Identification by Molecular Biology-A Trip of Over 50 Years. *Annual Reviews Microbiology*, 49, 461-487. Retrieved from [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Millen, H. T., Gonnering, J. C., Berg, R. K., Spencer, S. K., Jokela, W. E., Pearce, J. M., . . . Borchardt, M. A. (2012). Glass Wool Filters for Concentrating Waterborne Viruses and Agricultural Zoonotic Pathogens. *Journal of Visualized Experiments*, 61. doi:10.3791/3930
- NCBI. (2016). *National Center for Biotechnology Information*. Retrieved from Taxonomy Database: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Ochoa Corona, F. M., Fletcher, J., & Olson, J. (2014). Final Report Research Suggestions for USDA-APHIS FY12 Farm Bill section 10201. *Unpublished*, 18.
- Olmedo Velarde, A., & Ochoa Corona, F. (2016). Discriminating Potexvirus species by RT-PCR coupled to High Resolution Melting.
- Pisi, A., & Vicchi, V. (1989). Virus-ike particles found in babaco plants (*Carica pentagona* H.) in Italy. *Advances in Horticultural Science*, 3(2), 73-77. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/42883001>
- PRO ECUADOR-Inversiones, D. d. (2012). *Análisis Sectorial de Frutas No Tradicionales*.
- Quindi, B. (Ed.). (2004). *Cartilla de Cultivo de Babaco en Invernadero*. Quito: AAIC (Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar).
- Robles, A., Herrera, L., & Torres, R. (2016). *El Babaco (Vasconcellea heilbornii var pentagona Badillo)*. *Principales agentes fitopatógenos y estrategias de control*

- (Vol. 43). Centro Agrícola. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852016000200011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852016000200011)
- Ryu, K. H., & Hong, J. S. (2008). Potexvirus. En B. M. Mahy, & M. H. van Regenmortel (Edits.), *Encyclopedia of Virology* (3 ed., Vol. 3, págs. 310-313). Elsevier.
- Scheldeman, X., Kyndt, T., Coppens d' Eeckenbrugge, G., Ming, R., Drew, R., Van Droogenbroeck, B., . . . Moore, P. (2011). *Vasconcellea*. En C. Kole (Ed.). New York: Springer.
- Sevik, M. A. (2011). *Water Pollution: Water-Borne Plant Viruses*. Turkey: University of Ondokuz Mayıs.
- SIB. (2008). *Swiss Institute of Bioinformatics-Resource Portal*. Retrieved from Potexvirus Virion & Genome: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/272.html#tab6](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/272.html#tab6)
- SIB. (2008). *Tombusvirus*. (S. I. Bioinformatics, Editor) Retrieved junio 2017, from Swiss Institute of Bioinformatics-Resource Portal: <http://viralzone.expasy.org/637#header>
- SIB. (2010). *Tobamovirus*. Retrieved from Swiss Institute of Bioinformatics-Resource Portal: <http://viralzone.expasy.org/51>
- Soria, N. (1997). Babaco, fruto con potencial en el Ecuador y el mundo. 9, 35-38.
- Soria, N., & Viteri, P. (1999). *Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador*. Quito, Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Taylor, G., & Foster, S. (1998). Plant Virology Protocols, from Virus Isolation to Transgenic Resistance.
- Tobar, M. (2008). *Análisis de competitividad de los productores de babaco de San Pablo de Tenta (Saraguro, Loja) con enfoque de agrocadena. (Tesis de maestría)*. Programa de Estudios Latinoamericanos. Universidad Andina Simón Bolívar.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C., & Bamunusingle, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of general Virology*, 88, 1643-1655.
- Vilagines, P., Sarrette, B., Husson, G., & Vilagines, R. (1993). Glass Wool for Virus Concentration at Ambient Water pH Level. *Water Science Technology*, 27(3-4), 299-306.
- Viteri, P. (1992). El Cultivo del Babaco en el Ecuador. In P. Viteri, *El Cultivo del Babaco en el Ecuador: Programa de Frutales* (Vol. 19, pp. 1,2,5-9). Ecuador: Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

