



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, DIAGNÓSTICO Y
FILOGEOGRAFÍA DEL POTEXVIRUS CAUSANTE DE SÍNTOMAS DE
MOSAICO Y MANCHAS CLORÓTICAS EN PLANTACIONES DE
BABACO (*Vasconcellea × heilbornii. var. pentagona*)

AUTOR: MONCAYO PALACIO, EDUARDO ALEJANDRO

DIRECTOR: ING. FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER, Ph.D

SANGOLQUÍ

2018



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Caracterización molecular, diagnóstico y filogeografía del Potexvirus causante de síntomas de mosaico y manchas cloróticas en plantaciones de babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii*. var. *pentagona*)” fue realizado por El Sr. **Moncayo Palacio, Eduardo Alejandro** el mismo que ha sido revisado en su totalidad analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual permito acreditarlo y autorizar al Sr. **Eduardo Alejandro Moncayo Palacio** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 07 de noviembre de 2018

Flores Flor Francisco Javier, Ph.D

C.C: 1712443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Moncayo Palacio, Eduardo Alejandro**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**Caracterización molecular, diagnóstico y filogeografía del Potexvirus causante de síntomas de mosaico y manchas cloróticas en plantaciones de babaco (*Vasconcellea × heilbornii. var. pentagona*)**” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 07 de noviembre de 2018

.....
Eduardo Alejandro Moncayo Palacio

C.C. 0502462559



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Moncayo Palacio, Eduardo Alejandro** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE el trabajo de titulación “**Caracterización molecular, diagnóstico y filogeografía del Potexvirus causante de síntomas de mosaico y manchas cloróticas en plantaciones de babaco (*Vasconcellea × heilbornii. var. pentagona*)**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 07 de noviembre de 2017

.....
Eduardo Alejandro Moncayo Palacio

C.C. 0502462559

DEDICATORIA

A mis padres, que con su inmenso cariño y apoyo he podido alcanzar mis metas.

A mi abuelita Marlene, mi ángel guardián, quien siempre me ha ayudado
incondicionalmente.

AGRADECIMIENTO

Agradezco A mi director de tesis, el Dr. Francisco Flores por su guianza y ayuda para desarrollar mis habilidades académicas y científicas.

A la MSc. Alma Koch, por despertar mi interés en el mundo microscópico, por inculcarme ética y valores tanto en el ámbito profesional como personal, y por abrirme las puertas en el laboratorio de Microbiología molecular.

Al Dr. Andrés Izquierdo por el apoyo técnico durante la investigación.

Agradezco al Grupo de investigación en Microbiología y Ambiente (GIMA) de la ESPE, por los insumos, equipos, materiales y reactivos facilitados durante el transcurso esta investigación.

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias-INIAP, en especial al Ing. William Viera por la colaboración en la toma de muestras y apertura, y al proyecto “Biocontrol for Sustainable Farming Systems, Ecuador” del Ministerio de Asuntos Exteriores y Comercio (MFAT) de Nueva Zelanda por el apoyo.

Al Laboratorio de diagnóstico molecular IDgen por la apertura a sus instalaciones para llevar a cabo procedimientos relacionados con la presente investigación.

Finalmente, quiero agradecer a mis colegas, compañeras y amigas Fiama Guevara y Alejandra Oviedo, quienes me ayudaron técnica y anímicamente durante el arduo trabajo de laboratorio, por los buenos momentos, y por ayudarme en el desarrollo exitoso de este proyecto.

INDICE DE CONTENIDO

CERTIFICADO DEL DIRECTOR.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I.....	1
1. PROBLEMA	1
1.1 Formulación del Problema.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos	4
CAPÍTULO II.....	5
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Babaco (<i>Vasconcellea x heilbornii. var. pentagona</i>).....	5
2.2 Virus Fitopatógenos.....	11
2.3 Potexvirus	13
2.4 Detección y Diagnostico viral	15
2.4 Filogeografía.....	17
2.5 Hipótesis.....	18
CAPÍTULO III.....	19
3. METODOLOGÍA	19
3.1 Zona de estudio.....	19
3.2 Período de Tiempo de la Investigación	21
3.3 Procedimientos.....	21
CAPÍTULO IV	33
4. RESULTADOS.....	33

4.1	Detección de Potexvirus mediante RT-PCR.....	33
4.2	Caracterización del Genoma viral de BabMV	34
4.3	Diseño de prueba de diagnóstico para BabMV	39
4.4	Filogeografía de BabMV	42
CAPÍTULO V		50
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
CAPÍTULO VI		57
6.	CONCLUSIONES	57
CAPÍTULO VII		58
7.	RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		59

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento y distribución del Babaco en América del Sur.	5
<i>Figura 2.</i> Virión de Potexvirus.....	14
<i>Figura 3.</i> Expresión genómica del género Potexvirus	14
<i>Figura 4.</i> Hojas de babaco con sintomatología de virosis	19
<i>Figura 5.</i> Árbol filogenético de máxima verosimilitud para el género Potexvirus.	26
<i>Figura 6.</i> Detección de potexvirus mediante PCR con primers genéricos.	33
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos del genoma de BabMV .	35
<i>Figura 8.</i> Ensamblaje del genoma de BabMVa	36
<i>Figura 9.</i> Representación del genoma de BabMV.....	37
<i>Figura 10.</i> Estructura terciaria de la proteína de cubierta (CP) de BabMV	38
<i>Figura 11.</i> Electroforesis del ensayo de diagnóstico viral.....	40
<i>Figura 12.</i> Detección de Potexvirus en el control positivo	41
<i>Figura 13.</i> Sensibilidad de la prueba de diagnóstico para BabMV.	42
<i>Figura 14.</i> Árbol de máxima credibilidad.	45
<i>Figura 15.</i> Cálculo de la distancia genética entre cada aislado de BabMV	47
<i>Figura 16.</i> Ruta de dispersión de Babaco Mosaic Virus en Ecuador.....	48

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 <i>Localización y fechas de las hojas de babaco recolectadas infectadas con virus.</i>	20
Tabla 2 <i>Detalle de los primers utilizados en la detección de Potexvirus en hojas de babaco.</i>	23
Tabla 3 <i>Componentes y cantidades empleadas en la reacción de PCR de detección de potexvirus.</i>	24
Tabla 4 <i>Parámetros de amplificación de los primers para detección de Potexvirus.</i>	24
Tabla 5 <i>Componentes y cantidades empleadas en el diagnóstico de BabMV por PCR.</i>	29
Tabla 6 <i>Condiciones de PCR para el diagnóstico de BabMV.</i>	29
Tabla 7 <i>Detalle de los primers para la amplificación del gen de la proteína cp de BabMV.</i>	30
Tabla 8 <i>Condiciones de PCR para la amplificación del gen de la proteína cp de BabMV.</i>	31
Tabla 9 <i>Detalle de las combinaciones de relojes moleculares, modelos demográficos utilizados para el análisis filogeográfico.</i>	32
Tabla 10 <i>Detalle de los primers diseñados para la caracterización y secuenciación del genoma viral.</i>	34
Tabla 11 <i>Detalle de los primers diseñados para diagnóstico de BabMV.</i>	39
Tabla 12 <i>Fuerza de la evidencia de ajuste de los datos acorde al factor de bayes.</i>	43
Tabla 13 <i>Verosimilitudes marginales y soporte de ajuste del set de datos a un modelo de coalescencia con un reloj molecular estricto y modelo demográfico de crecimiento exponencial.</i>	44

RESUMEN

El babaco es un frutal nativo del Ecuador con creciente interés comercial. En cultivos a nivel de invernadero, se han presentado síntomas de clorosis y mosaico en hojas característicos de infecciones virales. El objetivo fue caracterizar al agente causal de la sintomatología de virosis, diseñar una prueba de diagnóstico y realizar un análisis de filogeografía. Se recolectaron muestras de hojas de babaco de las provincias de Loja, Azuay, Tungurahua, Pichincha Santo Domingo e Imbabura y se secuenció el genoma viral. La prueba de diagnóstico consistió en una RT-PCR y el análisis filogeográfico se realizó en base al gen de la proteína de cubierta. Se secuenció el gen de la proteína de la cápside, el bloque triple de genes y parte del gen de la replicasa viral. El ensayo de diagnóstico fue específico para Babaco mosaic virus con una sensibilidad de hasta 8 ng/ μ L de RNA viral y negativa para sus congéneres cercanos. Los resultados del análisis filogeográfico infieren que el virus muta a una tasa de sustitución de $4,8 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año. No se logró estimar con precisión la época de origen del virus ya que el análisis arroja un amplio intervalo de fechas entre 1790 y 1960. Se concluye que el agente causal de mosaico en plantas de babaco es el Potexvirus reportado como Babaco mosaic virus, cuyo centro de origen más probable es la provincia de Loja.

PALABRAS CLAVE:

- BABACO MOSAIC VIRUS
- SENSIBILIDAD
- CENTRO DE ORIGEN
- TASA DE SUSTITUCIÓN

ABSTRACT

Babaco is a native fruit from Ecuador with a growing commercial interest. In greenhouse crops, chlorosis and yellow mosaic symptoms characteristic of viral infections have appeared in leaves. The aim of this study was to characterize the causal agent of viral symptoms, design a diagnostic test, and perform a phylogeography analysis. The viral genome was sequenced, the diagnostic test consisted on a RT-PCR, and the viral phylogeographic analysis was carried out based on the coat protein gene. Coat protein gene, triple gene block and a part of the viral replicase gene were sequenced. The diagnostic test was specific for Babaco mosaic virus with a sensitivity of 8 ng / μ L of viral RNA and negative for its close congeners. The results of the phylogeographic analysis infer that the virus mutates at a substitution rate of 4.81×10^{-3} substitutions/site/year. It was not possible to accurately estimate the virus origin time due to analyzes show a too wide date interval between 1790 and 1960. In conclusion the causal agent of yellow mosaic and chlorotic spots in babaco plants is the potexvirus reported as Babaco mosaic virus, whose most probably origin center is the province of Loja.

KEY WORDS:

- BABACO MOSAIC VIRUS
- SENSITIVITY
- ORIGIN CENTER
- SUBSTITUTION RATE

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA

1.1 Formulación del Problema

El babaco es un frutal no tradicional que posee alto rendimiento en superficies pequeñas y gran potencial de exportación e industrialización (Soria, 1997). En los años 90, el babaco se comercializaba internacionalmente a países como Holanda y Alemania, pero durante el año 2000, la producción decayó debido a problemas fitosanitarios y al conocimiento limitado por parte de los agricultores del mantenimiento del cultivo (Tobar, 2008). Actualmente existe un creciente interés de producción, comercialización y exportación de esta fruta y sus derivados hacia el mercado europeo (Rodríguez, 2013); (Montes, 2017).

Los estudios relacionados con virus fitopatógenos en babaco son limitados. Así como como sucede en otros cultivos, los virus de babaco podrían estar causando cuantiosas pérdidas económicas y significativa reducción de productividad. En plantaciones de babaco a lo largo de la sierra ecuatoriana, en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Azuay y Loja, se han presentado síntomas como clorosis en forma de mosaico, ampollamiento y deformación en las hojas, característicos de infecciones virales. Anteriormente, estos síntomas se asociaron al virus del mosaico de la papaya (*Papaya mosaic virus*, PapMV) (Robles, et al., 2016) por su caracterización serológica y morfológica en aislados virales de hojas de babaco (Barba, 1989). Sin embargo, el agente causal fue caracterizado molecularmente recientemente por Quinto, et al. (2017), donde

lo describen como una nueva especie del género Potexvirus, y sugieren el nombre de este virus como Babaco mosaic virus, debido a su hospedero y síntomas que produce.

Mediante el estudio de este nuevo virus fitopatógeno, se podrán establecer controles de diseminación, previniendo que se desarrollen enfermedades víricas que resulten en la disminución o pérdida de productividad, mejorando la calidad de los cultivos y de los productos desarrollados en base a este frutal andino.

1.2 Justificación

El babaco es un fruto endémico del Ecuador cultivado en las provincias de Pichincha, Imbabura, Tungurahua, Azuay y Loja con un creciente interés para los agricultores debido a su alto rendimiento en superficies pequeñas, además ha ido tomando importancia en la agricultura por su gran potencial de exportación e industrialización (Espinoza, 2016).

En las últimas dos décadas, la demanda de babaco para el mercado local se ha incrementado considerablemente y su producción ha llegado a ser la principal fuente de ingreso de pequeños agricultores del Ecuador. Sin embargo, junto con la expansión del cultivo, han emergido varios agentes fitopatógenos que limitan su producción (Ochoa et al., 2000).

Dentro de los fitopatógenos que afectan al babaco se encuentran los virus, los cuales ocasionan pérdidas de producción y económicas a los agricultores. El virus causante de síntomas de mosaico en el babaco ha sido descrito y caracterizado recientemente por Quinto et al. (2017), y el nombre propuesto es Babaco Mosaic Virus (BabMV).

BabMV está distribuido a lo largo de todo el país, siendo un problema fitosanitario en las provincias donde se cultiva el babaco. Además, dada la reproducción asexual del babaco por brotes, estacas o injertos, la virosis en babaco se está propagando aceleradamente en las regiones donde es cultivada la planta.

La investigación busca caracterizar molecularmente al virus causante de síntomas de mosaico y manchas cloróticas en plantaciones de babaco (Babaco Mosaic Virus, BabMV) el cual es responsable de pérdidas a nivel de producción de este fruto endémico del Ecuador. Con la caracterización molecular se dará paso al desarrollo de una técnica de diagnóstico temprano para el control de propagación del virus, evitando futuras pérdidas a nivel económico y productivo. Además, el diagnóstico temprano permitirá seleccionar plantas madre sanas de babaco para su propagación, ya que es una planta híbrida que se reproduce exclusivamente de forma vegetativa.

Desde el punto de vista epidemiológico, el determinar el centro de origen más probable del virus permitirá conocer la región geográfica a partir de la cual se está propagando la enfermedad y así elaborar planes más controlados para evitar la diseminación, promoviendo el interés de retomar el cultivo y comercialización de este frutal.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar el virus causante de síntomas de mosaico y manchas cloróticas en plantaciones de babaco (*Vasconcellea x heilbornii*. var. *pentagona*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Secuenciar y ensamblar el genoma del virus del mosaico del babaco.
- Establecer una prueba de diagnóstico molecular para el virus del mosaico del babaco.
- Realizar un análisis filogeográfico del virus del mosaico de babaco con base en el gen codificante para la proteína de la cápside.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Babaco (*Vasconcellea x heilbornii. var. pentagona*)

2.1.1 Generalidades

El babaco es una planta híbrida natural producto del cruce de las especies *Vasconcellea stipulata* (toronche) y *Vasconcellea pubescens* (chamburo) originaria de las regiones andinas del sur del Ecuador en la Provincia de Loja (Escobar, 2012). También se puede encontrar distribuida al norte de Perú y al sur de Colombia (Figura 1) (Scheldeman, et al., 2011).



Figura 1. Crecimiento y Distribución del Babaco en América del Sur.

Fuente (Scheldeman, et al., 2011).

El Babaco presenta una adaptación intermedia a la de sus progenitores *V. stipulata* y *V. pubescens* dando como resultado una amplia adaptabilidad edafoclimática (Scheldeman, 2012). Este frutal se desarrolla a una altitud entre los 1500 y 3100 msnm, a temperaturas óptimas entre 14 y 20°C con una humedad relativa del 60 al 80% y luminosidad mínima de cinco horas al día, adaptándose a varios tipos de suelos sean arcillosos, arenosos o limosos con pH entre 5.8 y 8.2 siendo el ideal 7.1 (De Cañar, 2003).

2.1.2 Descripción

El babaco es una planta herbácea que alcanza alturas de 1.5 a 3 metros. Presenta un sistema radical con raíces tuberosas verticales, de las que se desprenden raíces absorbentes superficiales. El tallo es recto y cilíndrico con cicatrices foliares. Suele desarrollar brotes laterales que deben ser eliminados. Las hojas están insertadas al tronco de manera alternada con diferentes tonalidades de verde según su etapa de desarrollo, presenta un limbo lobulado de cinco a siete lóbulos, peciolo largo, así como nervaduras y venas laterales pronunciadas. Las flores, únicamente femeninas, surgen de las axilas de las hojas, son de forma acampanada, solitarias, con pétalos de color blanco amarillento y sépalos verdes. El fruto es una baya partenocárpica (sin semillas) alargada de 20 a 30 cm de longitud y de 12 a 18 cm de ancho, de forma pentagonal con una coloración amarilla en su completa madurez (Jácome, 2012; Lim, 2012).

2.1.3 Beneficios y Usos

El fruto del babaco contiene elevadas cantidades de potasio, vitamina C, vitamina B2, B3 y vitamina A, por lo que es considerado de alto valor nutricional (Lim, 2012).

El babaco posee características atractivas para la industrialización, ya que, al ser un fruto sin semillas con cáscara delgada, su procesamiento resulta relativamente sencillo. El proceso que más se aprovecha es la obtención de pulpa deshidratada para uso en la industria alimenticia. Además, el fruto presenta un alto contenido de enzimas proteolíticas, y es potencialmente rico en pectina, productos de gran interés y demanda industrial (Lim, 2012).

2.1.4 Propagación

El babaco es un fruto partenocárpico, es decir, que no posee semillas, por lo que únicamente se puede reproducir de forma asexual o vegetativa. La propagación del babaco se realiza por estacas, por brotes tiernos o por injertos. Las estacas se deben obtener de plantas maduras de al menos dos años de producción que no presenten problemas sanitarios. En el sistema de injertos se emplean patrones de chamburo y jigacho, los cuales evidencian resistencia a enfermedades y poseen una mayor longevidad (Montenegro, 2009).

2.1.5 Cultivo y producción de babaco en el Ecuador

En Ecuador, el babaco es cultivado en las provincias de Imbabura en la región de Atuntaqui, en Pichincha en las regiones de Tumbaco y Perucho, en Azuay en las regiones de Gualaceo y Santa Isabel, en Loja en las regiones de Vilcabamba y Catamayo, y en Tungurahua en Patate y Baños, siendo Tungurahua la provincia con mayor extensión de cultivos para la distribución, representando el 57% de la producción nacional de un estimado entre 150 a 200 ha cultivadas en el país (Espinoza, 2016).

La planta de babaco produce de 25 a 45 frutos por año, representando anualmente una producción entre 50 y 80 toneladas para un promedio de 2500 plantas por hectárea en cultivos al aire libre mientras que en invernadero se genera un rendimiento de 320 toneladas para un total de 8,000 plantas por hectárea. El babaco como producto de exportación ha ido ganando una excelente aceptabilidad hacia países como Holanda, Alemania, Colombia, Italia y Suecia, figurando el Ecuador como uno de los principales proveedores (Jácome, 2012).

2.1.6 Plagas y enfermedades del babaco

2.1.6.1 Plagas

Dentro de las plagas que le afectan al babaco se encuentran los nematodos y el ácaro rojo.

Entre las especies de nematodos que afectan al babaco están *Meloidogyne* sp., *M. incognita* y *M. javanica* (Coyago et al., 2010), causando las agallas de las raíces del babaco (Montenegro, 2009). Los nematodos causan retraso en el crecimiento de la planta ya que impiden el paso de nutrientes. Causan síntomas de flacidez en los tallos, amarillez y marchitamiento general afectando directamente a la producción (Montenegro, 2009).

El ácaro rojo (*Tetranychus urticae*) ataca directamente al follaje, principalmente a hojas jóvenes tornándolas amarillas. Cuando el ataque es masivo causa una defoliación completa. Los ácaros forman colonias en el envés de la hoja o una telaraña blanca. Producen coloración rojiza en la hoja y cuando ataca a los frutos una coloración castaña

que en casos extremos se torna muy oscura. Se presentan con frecuencia en invernaderos cuando la humedad relativa desciende del 60%.

2.1.6.2 Enfermedades

En el babaco se han reportado diversas enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos, sean hongos, bacterias o virus.

2.1.6.2.1 Enfermedades causadas por Hongos

Dentro de las enfermedades fúngicas están las causadas por *Oidium* sp. que provoca la Cenilla, en esta enfermedad aparece un polvillo blanquecino y manchas irregulares en las hojas. Los órganos atacados por *Oidium* se abarquillan y deforman, cuando el ataque llega a las flores provoca su caída (Montenegro, 2009).

Alternaria sp. causa la Lancha temprana, esta se desarrolla en tejido foliar maduro, observándose manchas de color café claro amarillento, que posteriormente se vuelven oscuras, formándose anillos concéntricos en el área afectada (De Cañar, 2003).

Mycosphaerella sp. causa Antracnosis, enfermedad que presenta síntomas como manchas marrones irregulares de hasta máximo 3 cm de diámetro tanto en el haz como en el envés de la hoja, las manchas presentan puntos negros correspondientes a los peritecios del agente causal. Además, se observan los bordes foliares amarillos por el necrosamiento del tejido (Montenegro, 2009).

Fusarium oxysporum causa la enfermedad Fusariosis, la cual provoca la Marchitez Vascular del Babaco (MVB). A nivel de la corona el tejido se torna de un color café, las

hojas se vuelven cloróticas, se marchitan y se caen al igual que los frutos. Finalmente, la planta muere (Montenegro, 2009).

Otros hongos fitopatógenos que atacan al babaco son *Collectotrichum* sp. que causa la pudrición del fruto y *Phytophthora* sp. la Pudrición del cuello de la planta de babaco (Coyago et al., 2010).

2.1.6.2.2 Enfermedades causadas por bacterias

Dentro de las enfermedades asociadas a bacterias se encuentra el tumor del cuello causada por *Agrobacterium* sp. y la pudrición radical por *Pectobacterium*. *Pectobacterium* ataca principalmente en los primeros estadíos, provoca una pudrición suave de color pardo oscuro o negro en la base del tallo, las hojas se tornan flácidas, amarillentas, y finalmente ocasiona la muerte de la planta (Robles, et al., 2016).

2.1.6.2.3 Enfermedades causadas por virus

Dentro de las enfermedades asociadas a virus, se han reportado plantas con moteado verde claro en sus hojas, mosaico, manchas cloróticas, arrugamiento y enanismo. Anteriormente, el agente causal de la enfermedad se determinó mediante pruebas serológicas como el virus del mosaico de la papaya (*Papaya mosaic virus*) (Robles et al., 2016), sin embargo, Quinto et al. (2017), caracterizó recientemente al virus causante de esta sintomatología en plantaciones de babaco, describiéndolo como un nuevo Potexvirus cuyo nombre sugerido es Babaco Mosaic virus.

Este virus se transmite mecánicamente y por propagación vegetativa (estacas o injertos) de las plantas infectadas (Robles et al., 2016).

2.2 Virus Fitopatógenos

2.2.1 Generalidades

Los virus son agentes infecciosos que se replican dentro de la célula del hospedero. La partícula viral está compuesta de una o varias moléculas de ácidos nucleicos, sea ADN o ARN pero nunca ambos. El ácido nucleico está rodeado de una cubierta proteica denominada cápside. Son parásitos obligados ya que requieren de la maquinaria celular para replicarse, y trascienden como patógenos a todos los seres vivos siendo capaces de infectar a eucariotas, bacterias y arqueas (Rivera, 1999; Hull 2009).

La mayoría de virus fitopatógenos contienen en su genoma ARN de cadena simple, presentan una distribución cosmopolita y son causantes de grandes pérdidas a nivel de producción siendo el segundo grupo más numeroso de enfermedades de plantas únicamente por debajo de las de naturaleza fúngica (Arauz L, 1998). Los principales síntomas causados por virus en plantas son cambios en el crecimiento, crecimiento en roseta por alteraciones de los entrenudos, manchas cloróticas en las hojas a manera de mosaico, amarillamiento completo o manchas anulares, deformación, e inclusive la muerte de la planta (Agrios, 2005).

2.2.2 Mecanismos de transmisión

Los principales mecanismos de los virus para infectar nuevas plantas son de manera mecánica, vertical, o por vectores (Agrios, 2005).

La transmisión mecánica es un mecanismo en el cual el virus no es capaz de penetrar la cutícula de la planta y requiere de algún tipo de herida para infectar, este tipo de infección es llamado también transmisión por sabia.

En la transmisión vertical o por semilla y polen, la semilla de la planta porta el virus en el tegumento o embrión, y lo disemina a las siguientes generaciones (Kumar et al., 2016)

La transmisión por vectores se da cuando un organismo (vector) lleva en su interior el virus de una planta a otra, pero este no se ve afectado por el virus (Arauz, 1998).

Otro mecanismo que se ha observado es la diseminación por medios acuáticos, en la que los virus se dispersan a través del agua de drenaje o agua de riego en el caso de los invernaderos, y son reabsorbidos por plantas sanas junto a las partículas del suelo (Mehle & Ravnkar, 2012). A los agricultores también se los considera un mecanismo de transmisión cuando a través de herramientas infectadas, pasan el virus de plantas enfermas a plantas sanas (Kumar et al., 2016). Dentro de la agricultura, la propagación vegetativa de plantas infectadas disemina rápidamente los virus, ya que al ser de manera sistémica en la planta, afecta a los órganos empleados en la propagación, causando serios problemas de dispersión al momento de cultivar brotes o estacas durante la siembra de nuevos cultivos (Agrios, 2005).

2.3 Potexvirus

Potexvirus es un género de la familia Alphaflexiviridae perteneciente al orden Tymovirales (Verchot-Lubicz J & Baulcombe D.C, 2011). El nombre de potexvirus se debe a que el género fue descrito por primera vez en *Potato virus X* (Koenig, 2012). Actualmente existen descritas 37 especies, todos patógenos vegetales, causando síntomas como mosaico, manchas cloróticas, manchas en forma de anillo, arrugamiento, enanismo y en algunos se presentan asintomáticos. Se transmiten mecánicamente por savia contaminada mas no por vectores y semillas (ICTV, 2016).

2.2.2.1 Estructura del virión

Los viriones del género Potexvirus presentan forma de varilla filamentosa, ligeramente flexible con simetría helicoidal. Tienen un tamaño entre 470 a 1000 nm y de 12 a 13 nm de diámetro. No presentan envoltura y están constituidos de una proteína de cubierta simple (CP) (Figura 2). El genoma de este género es de ARN de cadena simple y sentido positivo (ssRNA(+)) ubicándose en el grupo IV de la clasificación de Baltimore, tiene un tamaño entre 5.8 y 7.5 Kpb que codifican para cinco Marcos de lectura abiertos (ORFs): la replicasa viral (RdRp) que copia el RNA sin pasar por una molécula intermedia de ADN, el triplete de proteínas TGB (triple-gene block) involucradas en el movimiento del virus de una célula a otra, y la cubierta proteica (CP) la cual recubre al virus (Figura 2).

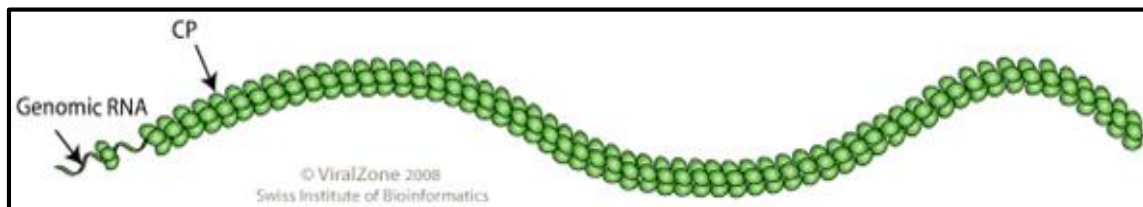


Figura 2. Virión de Potexvirus, sin envoltura flexible y filamentoso.
Fuente: (SIB, 2008)

2.2.2.2 Replicación del genoma viral de Potexvirus

La replicación se da en el citoplasma del hospedero cuando el virus ingresa a la célula. El proceso comienza con la traducción del ARN genómico que actúa como ARN mensajero, produciendo en primera instancia a la Replicasa dependiente de ARN (RdRp). Posteriormente la cadena de ssARN (+) es transformada en una doble cadena de ARN (dsARN) por los factores virales de la proteína TGB1. La cadena de dsARN es transcrita por la replicasa viral en varios RNA subgenómicos que posteriormente se ensamblan en nuevas partículas virales. El triplete de proteínas TgBp permite el movimiento de la partícula viral a otras células (SIB, 2008).

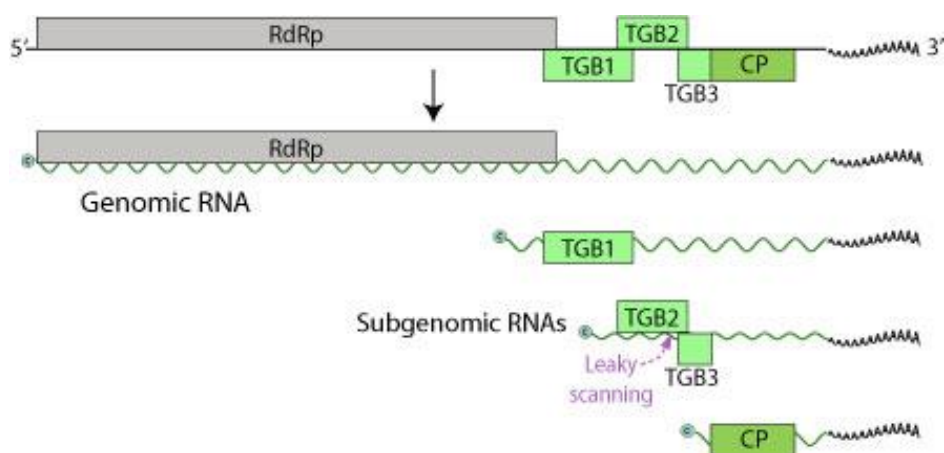


Figura 3. Expresión genómica del género Potexvirus.
Fuente: (SIB, 2008)

2.4 Detección y Diagnóstico viral

La detección y caracterización molecular de los virus, al igual que la de otros microorganismos, ha sido posible con el desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN, siendo el primer virus secuenciado y caracterizado el bacteriófago MS2 en 1976 por Walter Fiers y su equipo de laboratorio (Munevar, 2016). La caracterización molecular ha facilitado el diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos, logrando diferenciarlos entre cepas. Además ha permitido realizar estudios de distribución y epidemiología, y conocer características como virulencia, resistencia y funciones de microorganismos por medio de sus genes (VISAVET, 2013). En la actualidad están secuenciados 7477 genomas completos virales, de los cuales 1544 son fitopatógenos según la base de datos del NCBI.

Los métodos de identificación de virus fitopatógenos datan del siglo pasado siendo la detección por sintomatología la primera forma de diagnóstico, asociando a los virus con los síntomas característicos. Sin embargo, virus de la misma especie pueden producir síntomas diferentes en plantas, y virus diferentes pueden producir síntomas similares, por lo que se requería de vasta experiencia en campo para poder diagnosticar enfermedades causadas por virus con base en sintomatología (Naidú & Hughes, 2001). Entre las décadas de 1960 y 1970, se desarrollaron técnicas serológicas con antisueros específicos para cada virus. Cuando los anticuerpos reaccionan con el antígeno viral en medio líquido, se forman precipitados que pueden ser observados a simple vista. Estos métodos de detección serológica de precipitación fueron reemplazados por los métodos de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Clark y Adams en 1977

demonstraron que los ensayos de ELISA en placa son efectivos para la detección de virus vegetales (González 2017).

Las técnicas de diagnóstico molecular emergieron junto con los avances en secuenciación del ADN y pueden ser usadas cuando se conoce al menos parte de la secuencia del virus. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en la más adecuada para el diagnóstico de enfermedades virales gracias a su versatilidad, especificidad y velocidad.

La mayoría de virus de plantas tienen un genoma de ARN de cadena simple positiva, por lo que antes de realizar una PCR es necesario un proceso de retrotranscripción (RT) por la enzima transcriptasa inversa que permite obtener ADN complementario (Thomson & Dietzgen, 1995). Diferentes variantes de la PCR se han empleado comúnmente en la detección de virus fitopatógenos, como la PCR anidada para aumentar la sensibilidad o la PCR cuantitativa (qPCR) que permite conocer la carga viral (Ruiz et al., 2007). En los últimos años, se ha desarrollado la tecnología de secuenciación de segunda generación, la cual no solo ha permitido la detección de virus fitopatógenos, si no la de todo el microbioma de la planta (González 2017).

La detección y diagnóstico temprano de los virus causantes de enfermedades en los cultivos es primordial para evitar pérdidas de producción y económicas en la agricultura. Las buenas prácticas de control de enfermedades virales incluyen la identificación del agente causal, control de vectores y mecanismos de transmisión, así como el uso de variedades resistentes a enfermedades virales (Bello et al., 2015).

2.4 Filogeografía

La filogeografía estudia la distribución geográfica de los linajes genealógicos. Generalmente usa información genética para examinar la historia genealógica y la utiliza para inferir relaciones de áreas biogeográficas e historias de especies. Las relaciones espaciales de tales genealogías pueden mostrarse geográficamente y analizarse para deducir la historia evolutiva de poblaciones, subespecies y especies (Emerson & Hewitt, 2005).

En virus, la principal premisa es que los procesos epidémicos dejan una impronta cuantificable en los genomas través del tiempo. En los virus que mutan rápidamente como los de ARN, la evolución de su genoma ocurre a la par con la dispersión geográfica, este proceso filodinámico puede ser modelado con los datos genómicos utilizando análisis filogeográficos (Faria et al., 2011).

Cuando se estudia a la filogenia como un modelo retrospectivo, nacen los modelos y teoría de coalescencia, la cual establece que dos o más muestras de individuos tomadas en un tiempo (t) convergen en un ancestro en común. Al combinar esta teoría con técnicas computacionales como las cadenas de simulación de Markov-Montecarlo (MCMC), junto con métodos estadísticos de inferencia, especialmente bayesiana, hizo posible utilizar los complejos modelos matemáticos de la teoría de coalescencia para describir procesos evolutivos (Vaghi, 2015).

Con las cadenas de Markov-Montecarlo, se puede trabajar sobre procesos de migración y filogenias desconocidas, utilizando como datos previos varios modelos demográficos,

así como calibrar el reloj molecular considerando que la evolución de los taxones sigue relojes moleculares estrictos o relajados, y determinar cuál de estas combinaciones se ajusta mejor a las secuencias genéticas de estudio por medio de la comparación de la verosimilitud marginal de los modelos propuestos.

2.5 Hipótesis

La sintomatología de mosaico en hojas de plantas de babaco es causada por un Potexvirus, cuyo centro de origen es la región geográfica donde la variabilidad genética del virus es mayor.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Zona de estudio

3.1.1 Obtención de muestras

Se recolectaron muestras de hojas de plantas de babaco con sintomatología de virosis: manchas cloróticas, arrugamiento, deformación y mosaico (Figura 4) en zonas de cultivo de las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Azuay y Loja cuya localización y coordenadas geográficas se muestran en la tabla 1.



Figura 4. Hojas de babaco con sintomatología de virosis: mosaico, manchas cloróticas, deformación y arrugamiento en hojas.

Tabla 1

Localización y fechas de las muestras recolectadas de hojas de babaco infectadas con virus.

Coordenadas GMS					
Provincia	Muestra	Latitud	Longitud	Fechas de muestreo	Hospedero
Tungurahua	p1m1	S 01°10'32"	78°33'33"O	17/09/2017	Babaco
	p2m1	S 01°9'33"	78°32'57"O	17/09/2017	Babaco
	p3m1	S 01°12'20"	78°32'00"O	17/09/2017	Babaco
	p4m1	S 01°17'41"	78°29'15"O	17/09/2017	Babaco
	p5m1	S 01°17'42"	78°29'14"O	17/09/2017	Babaco
	M1	S 01°25'05"	78°24'18"O	24/01/2018	Babaco
	M2	S 01°24'52"	78°25'45"O	24/01/2018	Babaco
	M3	S 01°24'14"	78°24'20"O	24/01/2018	Babaco
	M4	S 01°24'16"	78°23'58"O	24/01/2018	Babaco
	M5	S 01°23'58"	78°24'22"O	24/01/2018	Babaco
Imbabura	IA	N 0°21'25"	78°14'27"O	12/08/2017	Babaco
	I2A	N 0°22'19"	78°14'27"O	12/08/2017	Babaco
	QM	N 0°21'34"	78°13'01"O	12/08/2017	Babaco
	AO	N 0°20'01"	78°14'19"O	12/08/2017	Babaco
Azuay	14.	S 02°43,1'31"	78°46,3'27"O	20/11/2017	Babaco
	15.	S 02°43,3'95"	78°46,3'06"O	20/11/2017	Babaco
	CH1	S 02°47'45"	78°46'03"O	15/06/2016	Chamburo
	CH2	S 02°47'45"	78°46'03"O	15/06/2016	Chamburo
	Chamburo	S 02°47'45"	78°46'03"O	15/06/2016	Chamburo
Loja	1.	S 03°36'52"	79°15'39"O	20/11/2017	Babaco
	2.	S 03°36,4'12"	79°15'56"O	20/11/2017	Babaco
	3.	S 03°35,8'03"	79°17,1'96"O	20/11/2017	Babaco
	5.	S 03°35,9'49"	79°17,1'19"O	20/11/2017	Babaco
	12.	S 03°34,8'49"	79°16,2'13"O	20/11/2017	Babaco
	13.	S 03°34,2'49"	79°16,1'36"O	20/11/2017	Babaco
Pichincha	Bn	S 00°04'11"	78°34'20"O	12/08/2017	Babaco
	NP	S 00°12'56"	78°24'44"O	9/03/2017	Babaco
Sto Domingo	BMV	S 00°24'52"	78°47'57.6" O	01/03/2016	Babaco

Las hojas se colectaron en sobres de papel, se recortaron con un saca bocados y se almacenaron en tubos tapa rosca de 2mL con sílica gel indicador naranja (para evitar humedad) a -80°C .

3.1.2 Trabajo de laboratorio

La investigación se realizó en el laboratorio de investigación de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE campus Sangolquí ubicado en la Av. General Rumiñahui S/N y Sector La Colina (coordenadas: $0^{\circ}18'53''$ Sur $78^{\circ}26'36''$ Oeste).

3.2 Período de Tiempo de la Investigación

La investigación inició el 25 de septiembre del 2017 y finalizó el 29 de junio del 2018.

3.3 Procedimientos

3.3.1 Detección de Potexvirus mediante RT-PCR

El Potexvirus previamente reportado en plantas de babaco se detectó mediante RT-PCR utilizando los primers descritos por Ochoa et al. (2014) diseñados a partir de secuencias de la Polimerasa dependiente de ARN de Potexvirus. Para ello, se extrajo ARN total de muestras de hoja con síntomas de virosis, posteriormente se realizó la síntesis de ADN complementario a partir del ARN total, continuando con una reacción de PCR con los primers de Potexvirus, y se visualizaron los resultados en un gel de agarosa.

3.3.1.1 Extracción de ARN total

En la extracción de ARN total de hojas de babaco se realizó a partir de 50 mg de material vegetal con síntomas de virosis utilizando el Kit de extracción comercial “SV Total RNA Isolation System” de Promega acorde a las instrucciones del fabricante (ver ANEXO 1). Para la lisis celular se utilizó un micropistilo estéril y el buffer PRX del Kit de extracción. Se aplicó RNaseZap (Ambion The RNA Company, USA), inhibidor de RNasas en el área de trabajo.

El ARN total se almacenó a -80°C para su conservación a largo plazo.

3.3.1.2 Síntesis de ADN complementario: Transcripción inversa

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen. Se utilizó hasta 5 μg del ARN total extraído previamente para un volumen final de reacción de 20 μL acorde a las especificaciones del fabricante (ver ANEXO 1).

En un tubo de 0.2 mL se preparó el mix A añadiendo 0.5 μL de Random primers (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1 μL de dNTPs (10mM) y 5,5 μL de agua esteril por reacción. Se añadió 5 μL de ARN completando un volumen de 12 μL por reacción. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 min en un termobloque con agitación (ESCO, PROVOCELL) y se enfrió en hielo por 3 min. Inmediatamente se agregó el mix B el cual se preparó con 4 μL de First 21 Strand Buffer (5x), 2 μL de DTT (0,1 M) y 1 μL de inhibidor de ribonucleasas RNase OUT (40 U/ μL) por reacción. Se mezcló el contenido por pipeteo y se incubó a 37°C por 2 min. Posteriormente se añadió 1 μL de la enzima M-MLV RT (200 unidades) y se incubó

durante 10 min a 25°C, seguido de una incubación a 37°C por 55 minutos. La reacción se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 min.

La concentración y pureza del ADNc obtenido se cuantificó por espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C.

3.3.1.3 Amplificación mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Potexvirus se basó en el protocolo descrito por Olmedo-Velarde & Ochoa-Corona (2016), el cual utiliza primers genéricos, que amplifican para una región de la ARN Polimerasa dependiente de ARN de Potexvirus (Replicasa viral). La secuencia y condiciones de los primers se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Detalle de los primers utilizados en la detección de Potexvirus en hojas de babaco.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Longitud (nt)	Temperatura de melting (T _m , °C)	Tamaño esperado
Potex-F1	GAYGGIGCIATGCTICA ITT	20	60°C	169
Potex-R1	TCIGTRTTIGCRTCAA IGT	20	54°C	

Las reacciones de PCR se ensamblaron acorde a los componentes y cantidades indicados en la Tabla 3. Con los parámetros de amplificación descritos por Olmedo Velarde & Ochoa Corona (2016), Tabla 4.

Tabla 3

Componentes y cantidades empleadas en la reacción de PCR de detección de potexvirus.

Componente	Concentración	Cantidad 1Rx (µl)
H ₂ O ultra pura	-	8.5
GoTaq® Green Master Mix	2X	12.5
Primer Forward	10 µM	1.5
Primer Reverse	10 µM	1.5
cDNA	400-600 ng/ µL	1
Volumen Total		25

Tabla 4

Parámetros de amplificación de los primers para detección de Potexvirus.

	1 ciclo		35 ciclos			1 ciclo
	Di	D	A	S	Sf	Espera
<i>Temperatura</i>	97°C	95°C	47°C	72°C	72°C	18°C
<i>Tiempo</i>	2 min	20 s	30 s	30 s	3 min	inf

3.3.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (m/v) con buffer SB 1x (ANEXO 2), utilizando como visualizador SYBER GOLD (Invitrogen, USA) o bromuro de etidio. Se cargó 3 µL de cada muestra. Como marcador de peso molecular se utilizó 3 µL de Low Mass Ladder (Invitrogen, USA) o 3 µL del marcador molecular 1 kb de PROMEGA mezclados con 1 µL de buffer de carga Blue Juice. Las muestras se corrieron a un voltaje de 200V durante 25 min. Los geles se observaron en un transiluminador (W/TFM-20, UVP).

3.3.2 Caracterización molecular del Potexvirus causante de síntomas de mosaico y manchas cloróticas en plantas de babaco (Babaco Mosaic Virus, BabMV).

La caracterización molecular del virus del mosaico del babaco (BabMV) se realizó mediante secuenciación Sanger por medio de la empresa ©Macrogen Inc. Para lo cual se diseñaron primers para el genoma viral. Se amplificó por PCR los segmentos del genoma, se secuenciaron los productos de PCR y se ensambló parte del genoma del virus.

3.3.2.1 Diseño de primers

Para el diseño de primers alrededor del genoma desconocido de BabMV, se realizó un alineamiento múltiple en el programa bioinformático MEGA 7.0 de las secuencias de 35 especies del género Potexvirus reportadas en el GenBank (N° de accesión en Anexo 3), en busca de regiones altamente conservadas para el género. Debido a la alta variabilidad a nivel de nucleótidos de los virus de ARN, no fue posible encontrar una región conservada en las 35 especies, por lo que se procedió a realizar un análisis filogenético a nivel de género en el programa MEGA 7.0. El modelo utilizado para el análisis filogenético fue GTR + G + I y se construyó un árbol de máxima verosimilitud. A partir del árbol filogenético, se escogieron como secuencias de referencia para el diseño de primers al clado de los virus más cercanos filogenéticamente con la secuencia del virus del mosaico del babaco (Figura 5).

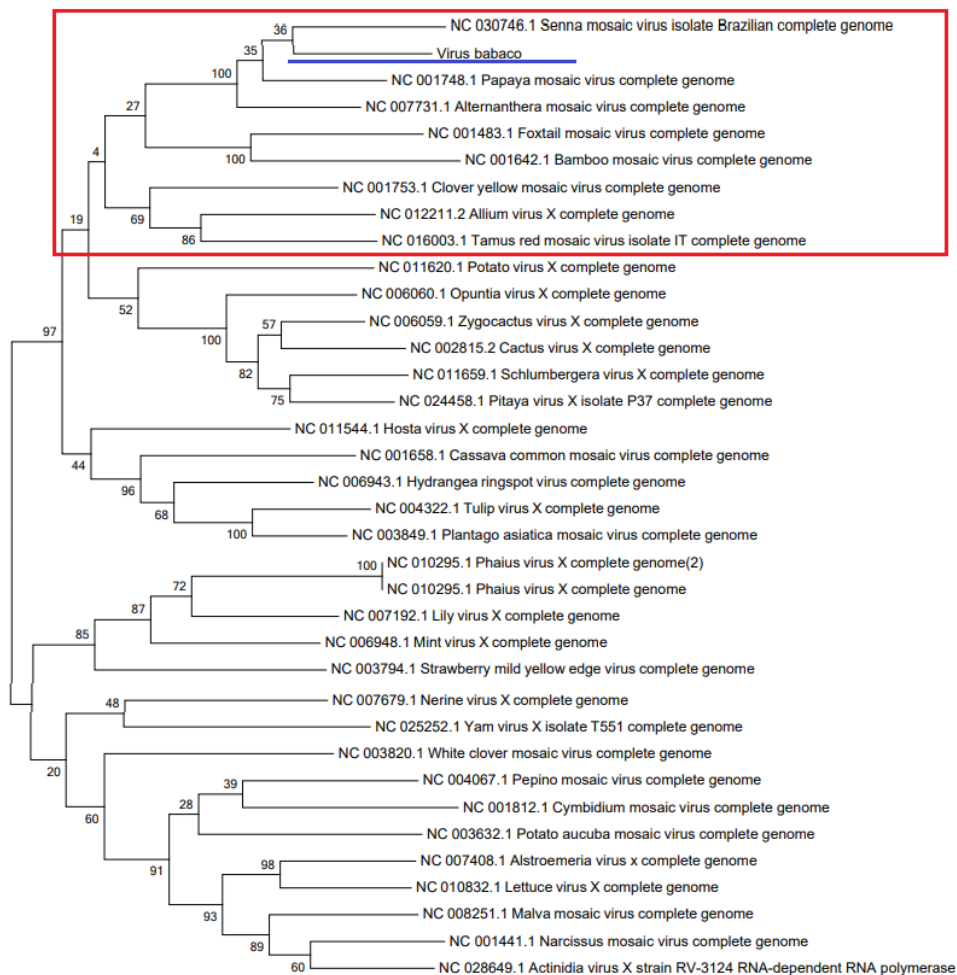


Figura 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para el género Potexvirus.

El número de genomas de referencia para el diseño de primers se redujo a ocho secuencias (Figura 5 encerradas en rojo) correspondientes a: *Senna mosaic virus*, *Alternanthera mosaic virus*, *Papaya mosaic virus*, *Foxtail mosaic virus*, *Bamboo mosaic virus*, *Clover yellow mosaic virus*, *Allium mosaic virus* y *Tamus red mosaic virus*. Con las secuencias de estos ocho genomas virales se realizó un alineamiento múltiple junto con el fragmento previamente secuenciado del virus del mosaico del babaco. Se buscó regiones altamente conservadas en el alineamiento múltiple aguas arriba y aguas debajo

de la secuencia del virus del mosaico del babaco previamente obtenida. Los primers se diseñaron con varias degeneraciones en los sitios de variación del alineamiento múltiple. La distancia delimitada por cada par de primer no fue mayor a 1000 pB para evitar errores en la reacción en cadena de la polimerasa. Los primers forward fueron un fragmento de 18 a 25 nt de las regiones conservadas en el alineamiento múltiple en dirección 5'→3', mientras que los primers reverse fueron el complemento reverso de un fragmento de 18 a 25 nt de las regiones conservadas en el alineamiento múltiple en dirección 5'→3'.

El análisis de los primers se realizó en el programa Online OligoAnalyzer 3.1 de la empresa IDT.

Las consideraciones tomadas en cuenta en el diseño de primers fueron:

- Tamaño del óligo: 18-25 nt
- Temperatura de melting: 40-60°C
- Porcentaje de Guaninas y citosinas: 40-60%
- Que no formen dímeros ni heterodímeros, ni hairpins en la secuencia

3.3.3.2 Amplificación del genoma mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se diseñaron seis pares de primers para la amplificación del genoma (AMV1, AMV2, AMV3, AMV4, AMV5, AMV6). Las reacciones de PCR se ensamblaron acorde a los componentes y cantidades indicados previamente en la Tabla 3. Los parámetros de amplificación de los primers fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 97°C por 2 min, 35 ciclos de tres etapas: desnaturalización a 95°C por 20 s, Annealing a temperaturas de

51°C para AMV1, 51°C para AMV2, 53°C para AMV3, 52°C para AMV4, 43°C para AMV5 y 44°C para AMV6 por 30 s, y síntesis a 72°C 45 s. Seguido de un ciclo de síntesis final a 72° por 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% como se describe en el apartado 3.3.1.4.

3.3.2.2 Secuenciación y ensamblaje del genoma viral

Los productos de PCR amplificados se secuenciaron por el método Sanger mediante la empresa ©Macrogen Inc. Las secuencias obtenidas se analizaron, ensamblaron y anotaron en el programa bioinformático GENEIOUS 10.1, empleando como referencia al genoma del Potexvirus *Alternanthera mosaic virus*.

3.3.2.3 Predicción de la estructura terciaria de la proteína de cubierta de BabMV

Con la secuencia del gen que codifica para la proteína de cubierta del virus, se realizó la traducción en el programa Mega 7 para obtener la secuencia de aminoácidos. Con la secuencia de aminoácidos se modeló la estructura terciaria (tridimensional) de la proteína en el programa phyre2.

3.3.3 Diseño de una prueba de diagnóstico Babaco Mosaic Virus, BabMV.

El ensayo de diagnóstico consistió en la extracción de ARN total de plantas infectadas como se describe en el apartado 3.3.1.1, seguido de la retro transcripción (apartado 3.3.1.2) y reacción en cadena de la polimerasa con primers diseñados en una región conservada de la secuencia de la proteína CP. Las condiciones de PCR se detallan en las tablas 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5

Componentes y cantidades empleadas en el diagnóstico de BabMV por PCR.

Componente	Concentración	Cantidad 1Rx (µl)
H ₂ O ultra pura	-	5.5
GoTaq® Green Master Mix	2X	12.5
Primer Forward	10 µM	1
Primer Reverse	10 µM	1
cDNA	40 ng/µL	5
Volumen Total		25

Tabla 6

Condiciones de PCR para el diagnóstico de BabMV.

	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo	
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Annealing	Síntesis	Síntesis final	Espera
<i>Temperatura</i>	97°C	95°C	43°C	72°C	72°C	18°C
<i>Tiempo</i>	2 min	20 s	30 s	30 s	4 min	inf

3.3.3.1 Ensayo de especificidad de la prueba de diagnóstico

La especificidad del diagnóstico de BabMV se verificó realizando el ensayo para 16 aislados virales y dos Potexvirus de diferente especie: *Papaya mosaic virus* y *Alternanthera mosaic virus* como grupos control.

Los grupos control de *Papaya mosaic virus* y *Alternanthera mosaic virus* se verificaron previamente por PCR amplificando con los primers genéricos para Potexvirus descritos por Olmedo & Ochoa (2016), que se muestran en la Tabla 2.

3.3.3.2 Ensayo de sensibilidad de la prueba de diagnóstico

Para detectar la sensibilidad de la prueba, se cuantificó la concentración del producto de PCR amplificado por los primers de diagnóstico y se realizaron diluciones del amplicón hasta una concentración de 4 ng/ μ L. Se realizó una PCR empleando como muestra de ADN a cada una de las diluciones, determinando la carga mínima de ADNc viral que detecta la prueba de diagnóstico la cual corresponde a la concentración de la menor dilución detectada por la PCR.

3.3.4 Filogeografía de Babaco Mosaic virus (BabMV)

El análisis filogeográfico de BabMV se realizó basándose en las secuencias de la proteína de cubierta (Coat Protein, CP) de 27 muestras virales correspondientes a las provincias de Imbabura, Pichincha, Santo Domingo, Tungurahua, Azuay y Loja.

Se diseñaron primers para la amplificación del gen que codifica para la proteína CP por PCR y se secuenció por el método Sanger en ambas direcciones a través de la empresa ©Macrogen Inc. Los resultados de la secuenciación se ensamblaron en el programa GENEIOUS 10.2.3. El detalle de los primers y condiciones de PCR se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7

Detalle de los primers para la amplificación del gen de la proteína cp de BabMV

Nombre	Secuencia 5' \rightarrow 3'	Longitud (nt)	Temperatura de melting (T _m , °C)	Tamaño esperado
cpBMVF	GCTGTTTTCTTAGTTATCTAG	21	46°C	654pb
cpBMVR	GAGGCAAACCTACTCIGG	18	55°C	

Tabla 8*Condiciones de PCR para la amplificación del gen de la proteína cp de BabMV*

	1 ciclo		35 ciclos			1 ciclo
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Annealing	Síntesis	Síntesis final	Espera
<i>Temperatura</i>	97°C	95°C	42°C	72°C	72°C	18°C
<i>Tiempo</i>	2 min	20 s	30 s	50 s	5 min	inf

Se alinearon las 27 secuencias con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) y se calculó el modelo de evolución molecular en el programa Mega 7.0. El análisis filogeográfico fue llevado a cabo con el programa BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) v1.8.4.

Se realizaron análisis continuos con las combinaciones de relojes moleculares y modelos demográficos detallados en la Tabla 9. El número de corridas fue de diez millones de generaciones de las cadenas de Markov hasta establecer convergencia. La convergencia se evaluó en el programa Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2013) considerando convergentes a aquellas cadenas de Markov que presentasen para todos los parámetros calculados un tamaño efectivo de muestreo (effective sample size, ESS) mayor o igual a 200.

Tabla 9

Detalle de las combinaciones de relojes moleculares, modelos demográficos utilizados para el análisis filogeográfico.

Reloj Molecular	Modelo Demográfico
Estricto	Tamaño constante
	Crecimiento exponencial
Relajado Lognormal	Tamaño Constante
	Crecimiento exponencial

Una vez realizadas todas las corridas con las combinaciones de modelos de coalescencia, se comparó cada uno de ellos estimando las verosimilitudes marginales por los métodos “Path sampling” y “Stepping-Stone sampling” y determinando el factor de Bayes para estimar el modelo de coalescencia que más se ajuste al set de datos utilizado.

Con el programa Tree Annotator se generó un Árbol de Máxima Credibilidad (MCCT, Maximum Clade Credibility Tree) utilizando los árboles obtenidos en la corrida del análisis bayesiano. Se descartó el 10% de los árboles como “Burn in” para utilizar los datos de las cadenas de Markov en estado estacionario. Los datos generados se utilizaron para obtener las imágenes geo-localizadas del movimiento del virus en territorio ecuatoriano con el programa SPREAD3 (Bielejec et al., 2011).

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1 Detección de Potexvirus mediante RT-PCR

El Potexvirus causante de mosaico en plantas de babaco fue detectado inicialmente en dos muestras (NP y PP) de hoja sintomáticas de la provincia de Pichincha mediante RT-PCR y visualización por electroforesis en gel (Figura 6) con los primers descritos por Ochoa et al. (2014).

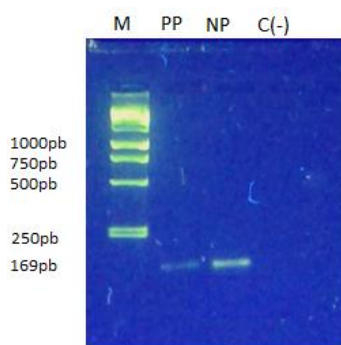


Figura 6. Detección de potexvirus mediante PCR con primers genéricos. Pocillo 1: marcador 1kb. Pocillo 2 y 3: productos de PCR de muestras de hoja de babaco amplificadas con primers para la detección de Potexvirus. Pocillo 4: Control negativo.

Los productos de PCR se secuenciaron por el método Sanger a través de la empresa ©Macrogen Inc. La secuencia consenso resultante se sometió a un análisis Blast para buscar homólogos en la base de datos del Gen Bank del NCBI. El porcentaje de identidad más cercano a nivel de nucleótidos fue del 71% con *Alternanthera mosaic virus*.

4.2 Caracterización del Genoma viral de BabMV

La caracterización molecular del virus del mosaico del babaco (BabMV) se realizó mediante secuenciación Sanger. A partir de la secuencia viral previamente obtenida como referencia, se diseñaron primers aguas arriba y aguas abajo en el genoma de referencia. Se amplificaron por PCR los segmentos del genoma delimitados por los primers diseñados, se secuenciaron los productos de PCR. Con esa información se ensambló parte del genoma del virus. Los primers diseñados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Detalle de los primers diseñados para la caracterización y secuenciación del genoma viral

Nombre		Secuencia	longitud	Tm	Tamaño esperado del producto
AMV1	F	CCCACTTTTCGATGCAAACAC	20	55°C	500 - 600 pb
	R	CCIGIICCIGCIACIGCATG	20	62°C	
AMV2	F	CACCARCAGGCIARRGAYGA	20	55°C	500 - 600 pb
	R	CTCAAAGTGCAGCATCGCCCC	21	62°C	
AMV3	F	TAGTGAGCCGCTTGTTGTCC	20	57°C	700 – 800 pb
	R	CGTCVCKGTASSWRCCTCCG	20	61°C	
AMV4	F	AACADRCTIGGRGTBACTC	20	56°C	500 – 600 pb
	R	CAATTCGCCTTGGGGTTTGAG	21	57°C	
AMV5	F	GCTATAGGTATAGGATTAGC	20	46°C	500-600 pb
	R	CCRTCRAAGAAATCRAAVGC	20	52°C	
AMV6	F	AAYGARCTBAGRMTIGAYTGG	21	48°C	500 – 600 pb
	R	AAATAGGGTGTACTTTCCAG	20	50°C	

4.2.1 Amplificación del genoma viral

A partir de dos muestras de ADN complementario de los RNA total extraído de las plantas de babaco infectadas (NP y PP), se amplificaron mediante PCR los fragmentos del genoma viral delimitados por los primers previamente diseñados, y se visualizó el tamaño de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% corrido durante 30 min a 200V (Figura 7).

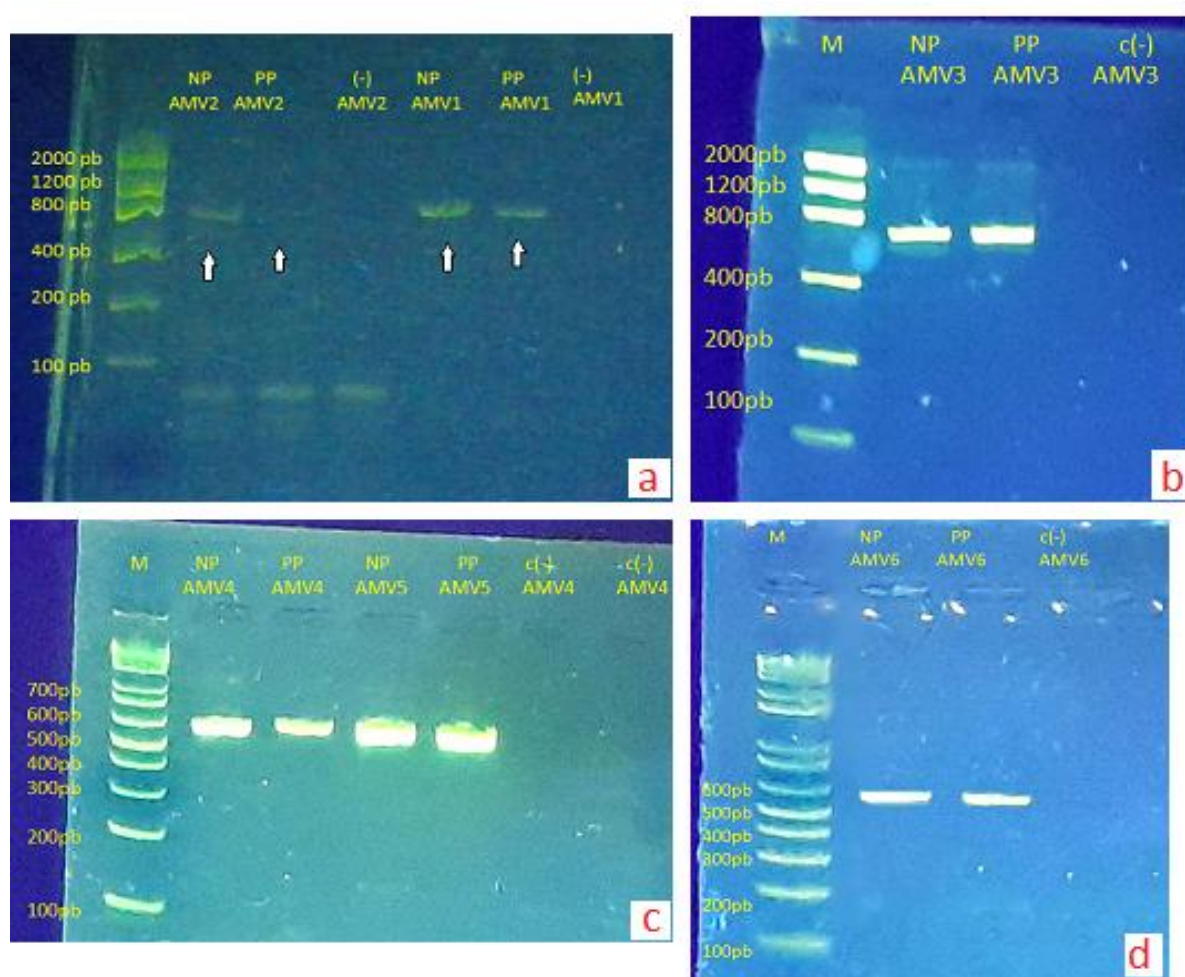


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos del genoma de BabMV: a) Primers AMV1 y AMV2 b) Primers AMV3 c) primers AMV4 y AMV5 d) Primers AMV6.

4.2.2 Secuenciación y ensamblaje del genoma viral

Los productos de PCR se enviaron a la empresa ©Macrogen Inc donde se realizó la secuenciación Sanger en ambos sentidos. Los contigs resultantes se ensamblaron en el programa bioinformático Geneious utilizando el genoma de *Alternanthera mosaic virus* como referencia, ya que es especie descrita más cercana a nivel de nucleótidos al virus del mosaico del babaco. El ensamblaje se muestra en la Figura 8.

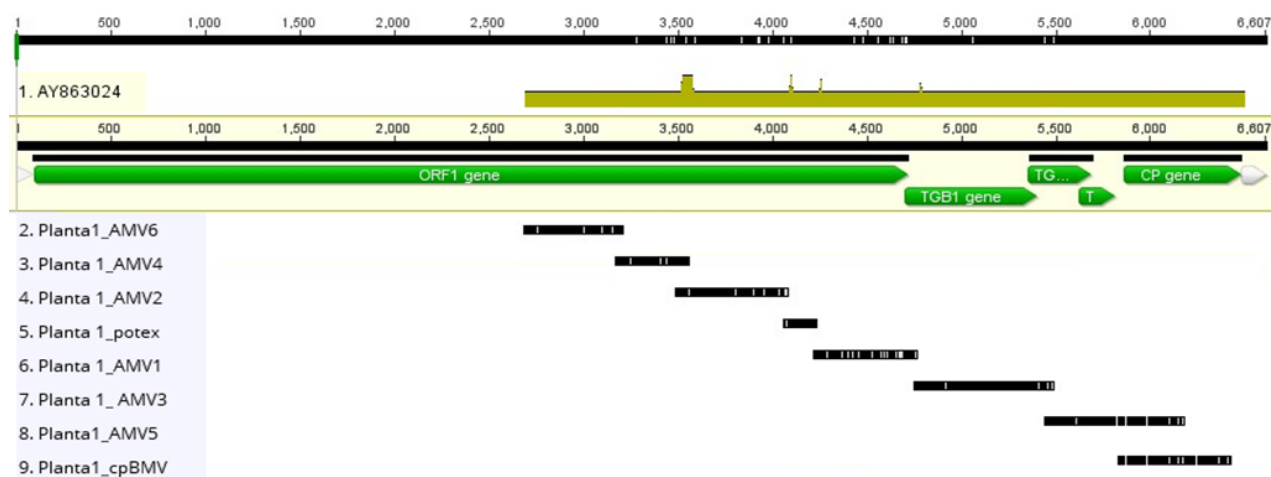


Figura 8. Ensamblaje del genoma de BabMV mapeado al genoma de *Alternanthera mosaic virus* como referencia.

Se logró secuenciar un tamaño de 3920 pb que corresponde aproximadamente al 60% del genoma completo de BabMV. La secuencia de nucleótidos obtenida mediante secuenciación Sanger se adjunta en el ANEXO 4.

La comparación de pares de bases mediante el algoritmo Blast, entre la secuencia viral obtenida del virus del babaco con secuencias descritas en la base de datos del NCBI, indica que las especies más cercanas genéticamente son: *Alternanthera mosaic virus*,

Papaya mosaic virus y *Senna mosaic virus*, con un porcentaje de identidad promedio del 73% para la secuencia de la CP a nivel de nucleótidos, y un porcentaje de identidad promedio del 74% a nivel de aminoácidos.

La comparación de bases mediante blast de la secuencia obtenida, con la secuencia viral descrita por Quinto et al. (2017), dio un porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos del 93% y del 97% a nivel de aminoácidos.

Basándonos en homología con otros Potexvirus como *Alternanthera mosaic virus*, el genoma de Babaco mosaic virus está organizado en cinco ORFs y dos regiones no traducidas a los extremos 5' y 3' (Untranslated regions, UTRs). El ORF 1 codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA, el ORF 2, ORF 3 y ORF 4 codifican para el triplete de genes (TGB) que codifican para tres proteínas responsables del movimiento e infectividad del virus, y el ORF5 que codifica para la proteína de cubierta o CP. El esquema del genoma de BabMV se ilustra en la Figura 9

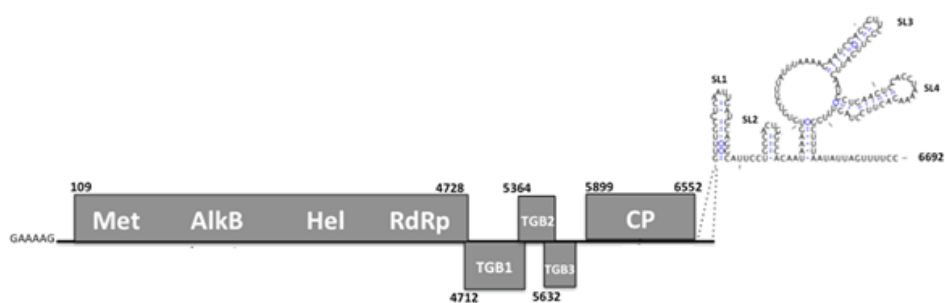


Figura 9. Representación del genoma de BabMV. Fuente: (Quinto et al., 2017)

4.3.3 Predicción de la estructura terciaria de la proteína CP de BabMV

El modelamiento de la estructura terciaria de la proteína de cubierta (CP) se generó en el programa Phyre 2 a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida realizando la traducción de la secuencia nucleótidos en el programa mega 7. La proteína CP tiene un plegamiento con estructuras en forma de hélices alfa (49%), un desorden del 30% y ninguna lámina beta, lo que le confiere una disposición espacial alargada, flexible y filamentosa (Figura 10).

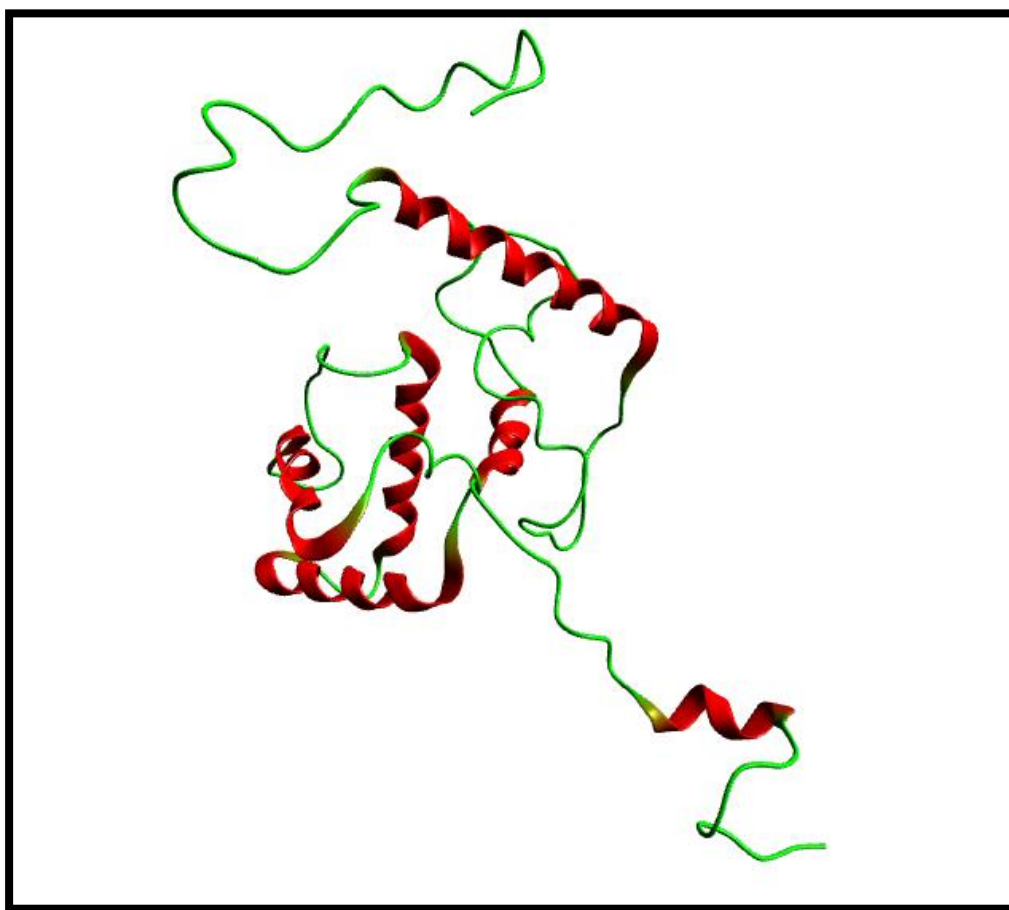


Figura 10. Estructura terciaria de la proteína de cubierta (CP) de BabMV

4.3 Diseño de prueba de diagnóstico para BabMV

La prueba de diagnóstico para BabMV se basó en una RT-PCR, para la cual, se diseñaron primers específicos para una región de la proteína de la cápside del virus. Los primers de diagnóstico se diseñaron en base al alineamiento múltiple de las secuencias que codifican para el gen de la proteína CP de 20 aislados virales de BabMV obtenidas previamente por secuenciación Sanger. Los primers de diagnóstico se muestran en la Tabla 11

Tabla 11

Detalle de los primers diseñados para diagnóstico de BabMV.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Longitud (nt)	Temperatura de melting (T _m , °C)	Tamaño esperado
BMVdF	TCAGAGTCATCHAACAYTGGAA	22	51°C	263pb
BMVdR	TGADGATTCACCAGARATC	19	47°C	

4.3.1 Especificidad de la prueba de diagnóstico

El ensayo de especificidad de la prueba de diagnóstico se lo realizó con 15 muestras de hojas de babaco de diferentes provincias del Ecuador (Pichincha, Tungurahua, Imbabura, Azuay y Loja) con sintomatología de virosis y un control positivo comercial de *Althernanthera mosaic virus* y *Papaya mosaic virus*, especies más relacionadas filogenéticamente con BabMV.

La prueba de diagnóstico resultó positiva para todas las muestras de hojas de babaco con sintomatología de virosis independientemente de la región geográfica. El control de especificidad de la prueba de diagnóstico correspondiente a AltMV y PapMV resultó negativo con los primers diseñados para la detección de BabMV (Figura 11) mientras que con los primers genéricos descritos por Ochoa *et al.* (2014) para la detección de Potexvirus el resultado fue positivo (Figura 12), con lo que se corrobora que el ensayo de diagnóstico es específico para esta nueva especie.

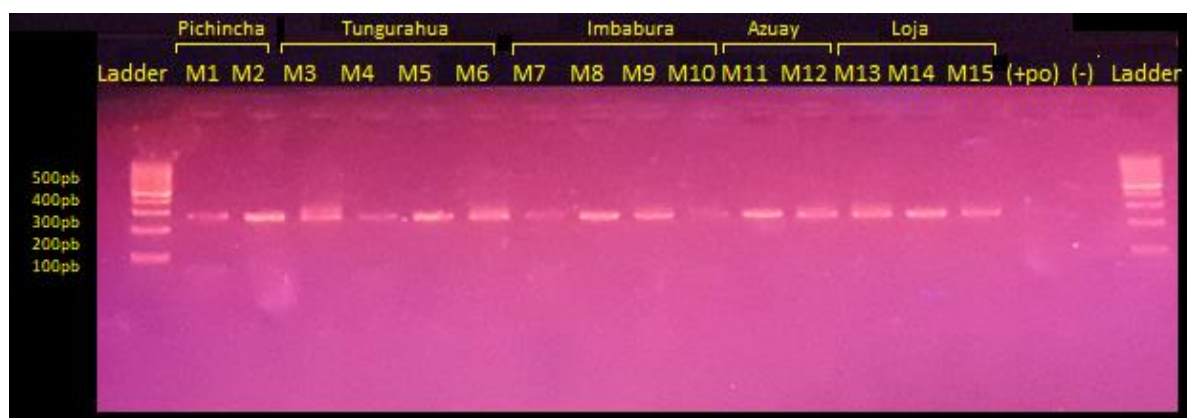


Figura 11. Electroforesis del ensayo de diagnóstico viral con muestras de babaco infectado con primers para diagnóstico de BabMV

Pocillo 1 y 19: marcador de peso molecular. Pocillo 2-16: muestras de hoja de babaco con sintomatología de virosis. Pocillo 17: control de especificidad de la prueba de diagnóstico (AltMV/PapMV). Pocillo 18: control negativo.

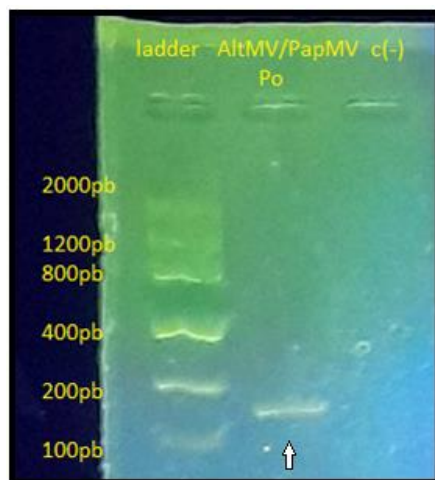


Figura 12. Detección de Potexvirus en el control positivo de *Alternanthera mosaic virus* y *Papaya mosaic virus* con primers genéricos.

Pocillo 1: Marcador de peso molecular. Pocillo 2: producto de PCR de la muestra control AltMV/PapMV con primers genéricos para Potexvirus. Pocillo 3: control negativo.

4.3.2 Ensayo de sensibilidad

Para el ensayo de sensibilidad de la prueba de diagnóstico, se cuantificó la concentración de los productos de PCR amplificados por los primers de diagnóstico y se realizaron diluciones a concentraciones conocidas de los amplicones. Posteriormente se realizó una PCR empleando como muestra de ADN a cada una de las diluciones, y se determinó la cantidad mínima de ADNc viral que detecta la prueba de diagnóstico la cual corresponde a la concentración de la menor dilución detectada por la PCR que fue de 8 ng/ μ L, distinguiéndose una banda muy tenue en el gel (Figura 13).

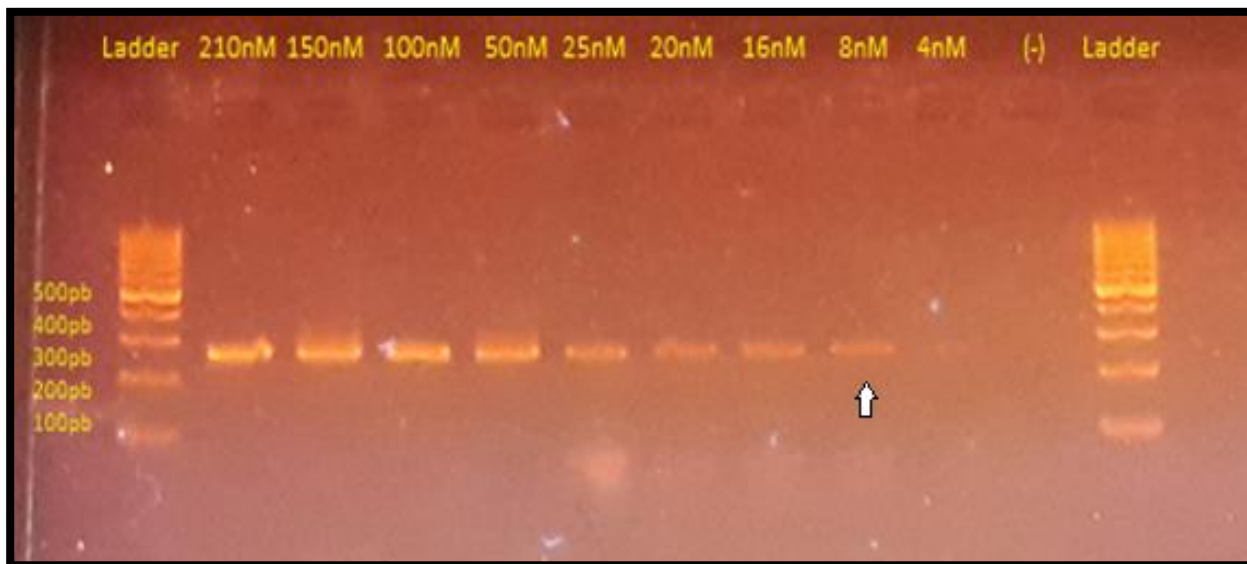


Figura 13. Sensibilidad de la prueba de diagnóstico para BabMV. Pocillo 1 y 12: marcador de peso molecular. Pocillo 2-10: productos de PCR de las diluciones de ADN viral. Pocillo 11: control negativo.

4.4 Filogeografía de BabMV

El análisis filogeográfico de BabMV se realizó basándose en las secuencias de la proteína de la cápside (Coat Protein, CP) de 24 muestras virales extraídas de hojas de babaco y tres de hojas de Chamburo correspondientes a las provincias de Imbabura, Pichincha, Santo Domingo, Tungurahua, Azuay y Loja.

El modelo de evolución molecular que mejor se ajustó a los datos del alineamiento del gen CP de BabMV fue el K2 + G + I que es una simplificación del modelo HKY con una distribución gamma y sitios invariables. En el análisis filogeográfico se utilizaron modelos de espacio continuo para intentar inferir localidades de movimiento del virus que

pueden haber existido, pero para los cuales no se tiene aislamientos.

En todas las combinaciones de relojes moleculares y modelos demográficos se obtuvieron valores de ESS mayores a 200 por lo que se consideró que las cadenas de Markov llegaron a convergencia.

El mejor modelo de coalescencia se determinó mediante el factor de Bayes cuyo objetivo es cuantificar el soporte de un modelo sobre otro, La fuerza de la evidencia del ajuste de los datos a un determinado modelo de coalescencia sobre otro según Kass & Raftery (1995) se indica en la Tabla 12:

Tabla 12

Fuerza de la evidencia de ajuste de los datos acorde al factor de bayes

$2(\text{Ln } K_0 - \text{Ln}K)$	Fuerza de la evidencia
0-2	No significativa
2-6	Positiva
6-10	Fuerte
>10	Muy fuerte

Donde K es la verosimilitud marginal del modelo de coalescencia y K_0 es la mayor verosimilitud marginal entre todos los modelos de coalescencia.

El mayor valor de verosimilitud marginal fue para el modelo de coalescencia con un reloj molecular estricto y un modelo demográfico de crecimiento exponencial. El valor del logaritmo natural de las verosimilitudes marginales y la fuerza de soporte de ajuste de los datos a este modelo de coalescencia sobre los otros se muestran en la tabla 13.

Tabla 13

Verosimilitudes marginales y soporte de ajuste del set de datos a un modelo de coalescencia con un reloj molecular estricto y modelo demográfico de crecimiento exponencial

Modelo de coalescencia	Ln(k)	Path sampling		Stepping-Stone sampling		
		2(LnK ₀ - LnK)	Significancia	Ln(k)	2(LnK - LnK ₀)	Significancia
Reloj estricto Tamaño constante	-2504.742	40	Muy significativo	2504.635	39	Muy significativo
Reloj Estricto crecimiento exponencial	-2484.813	0	-	-2485.101	0	-
Reloj relajado Tamaño constante	-2508.775	48	Muy significativo	-2509.262	48	Muy significativo
Reloj relajado tamaño exponencial	-2504.047	38	Muy significativo	2504.272	38	Muy significativo

El modelo de coalescencia que más se ajusta al set de datos genéticos es la combinación de un reloj molecular estricto y un modelo demográfico de expansión de crecimiento exponencial, por lo que probablemente el ritmo de evolución del virus haya sido constante a lo largo del tiempo con un ritmo de crecimiento poblacional exponencial.

El árbol de máxima credibilidad (MCCT, Figura 14) obtenido con el programa Tree Anotator, agrupa a los aislados virales en 3 posibles genotipos: En el genotipo 1 se agruparon aislados virales de babaco de la provincia de Loja, Azuay, Imbabura, Tungurahua, Pichincha y Santo Domingo de los Tsachilas. El genotipo 2 corresponde a dos aislados virales de babaco de la provincia de Tungurahua, y el genotipo 3 corresponde a los aislados virales del hospedero chamburo del Azuay.

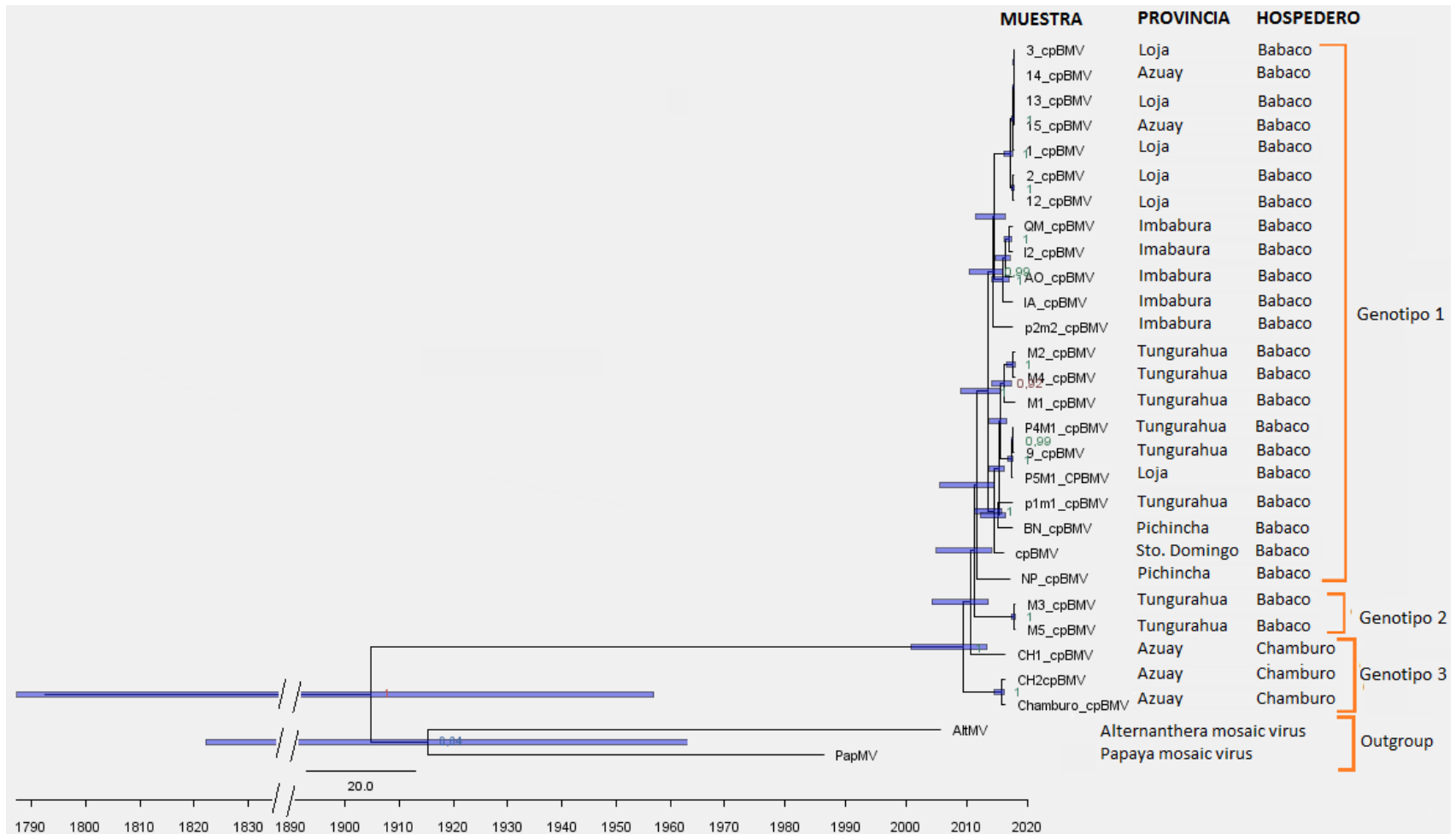


Figura 14. Árbol de máxima credibilidad. Realizado con los árboles resultantes del análisis bayesiano de coalescencia continuo, asumiendo un modelo demográfico de crecimiento exponencial y un reloj molecular estricto.

Los números en los nodos representan el valor de soporte del clado (Probabilidades posteriores). Las barras representan el intervalo de confianza de años en los que probablemente se separaron los diferentes aislados de su ancestro en común.

El posible año de origen del virus causante de mosaico en plantas de babaco (Babaco Mosaic Virus, BabMV) de acuerdo al análisis bayesiano de coalescencia continuo realizado, se encuentra en el intervalo de 1790 a 1960 con un nivel de confianza del 95%.

Los parámetros evolutivos del virus se calcularon dentro del análisis de coalescencia continuo. Se observó que BabMV evoluciona con una tasa de 4.81×10^{-3} sustituciones/sitio/año (intervalo 2.5×10^{-3} a 9.4×10^{-3}) con una edad del ancestro en común más reciente de 113 años (intervalo de 228 a 58 años) con nivel de confianza del 95%.

En el programa mega 7, se determinó la distancia genética entre los distintos aislados virales (Figura 15), siendo la provincia de Tungurahua la región geográfica con mayor variabilidad genética, agrupando a dos posibles genotipos virales de un mismo hospedero. La diversidad genética promedio del gen de la proteína CP fue del 5.4%. Con ayuda del programa SpreaD3 se obtuvo una posible ruta de dispersión de BabMV alrededor del Ecuador, así como una estimación del centro de origen más probable.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1. 1 cpBMV																											
2. 2 cpBMV	0.010																										
3. 3 cpBMV	0.000	0.010																									
4. 9 cpBMV	0.049	0.049	0.049																								
5. 12 cpBMV	0.011	0.002	0.011	0.051																							
6. 13 cpBMV	0.000	0.010	0.000	0.049	0.011																						
7. 14 cpBMV	0.000	0.010	0.000	0.049	0.011	0.000																					
8. 15 cpBMV	0.000	0.010	0.000	0.049	0.011	0.000	0.000																				
9. AO cpBMV	0.044	0.041	0.044	0.046	0.043	0.044	0.044	0.044																			
10. cpBMV	0.049	0.046	0.049	0.039	0.048	0.049	0.049	0.049	0.044																		
11. BN cpBMV	0.048	0.048	0.048	0.044	0.050	0.048	0.048	0.048	0.053	0.037																	
12. I2 cpBMV	0.043	0.039	0.043	0.044	0.041	0.043	0.043	0.043	0.021	0.042	0.051																
13. IA cpBMV	0.038	0.034	0.038	0.039	0.036	0.038	0.038	0.038	0.019	0.038	0.043	0.018															
14. NP cpBMV	0.050	0.053	0.050	0.056	0.055	0.050	0.050	0.050	0.054	0.063	0.068	0.060	0.051														
15. p1m1 cpBMV	0.056	0.053	0.056	0.031	0.055	0.056	0.056	0.056	0.044	0.044	0.037	0.039	0.032	0.054													
16. p2m2 cpBMV	0.051	0.048	0.051	0.060	0.050	0.051	0.051	0.051	0.049	0.056	0.060	0.051	0.046	0.070	0.061												
17. Chamburo cpBMV	0.087	0.082	0.087	0.083	0.084	0.087	0.087	0.087	0.078	0.079	0.083	0.080	0.071	0.070	0.079	0.080											
18. P4M1 cpBMV	0.049	0.049	0.049	0.000	0.051	0.049	0.049	0.049	0.046	0.039	0.044	0.044	0.039	0.056	0.031	0.060	0.083										
19. P5M1 CPBMV	0.046	0.046	0.046	0.005	0.048	0.046	0.046	0.046	0.044	0.037	0.043	0.042	0.038	0.053	0.036	0.058	0.081	0.005									
20. QM cpBMV	0.044	0.041	0.044	0.046	0.043	0.044	0.044	0.044	0.022	0.044	0.053	0.008	0.019	0.061	0.044	0.049	0.081	0.046	0.044								
21. M1 cpBMV	0.055	0.051	0.055	0.039	0.053	0.055	0.055	0.055	0.049	0.039	0.044	0.044	0.039	0.063	0.041	0.060	0.083	0.039	0.037	0.042							
22. M2 cpBMV	0.036	0.033	0.036	0.024	0.034	0.036	0.036	0.036	0.037	0.021	0.024	0.032	0.028	0.051	0.029	0.041	0.070	0.024	0.022	0.034	0.024						
23. M3 cpBMV	0.081	0.085	0.081	0.086	0.085	0.081	0.081	0.081	0.085	0.087	0.085	0.080	0.071	0.072	0.078	0.098	0.089	0.086	0.084	0.085	0.083	0.078					
24. M4 cpBMV	0.037	0.034	0.037	0.022	0.036	0.037	0.037	0.037	0.036	0.019	0.024	0.031	0.026	0.049	0.027	0.043	0.069	0.022	0.021	0.032	0.022	0.005	0.076				
25. M5 cpBMV	0.080	0.083	0.080	0.083	0.083	0.080	0.080	0.080	0.081	0.083	0.081	0.076	0.067	0.070	0.074	0.094	0.085	0.083	0.085	0.081	0.079	0.074	0.003	0.072			
26. CH1 cpBMV	0.089	0.085	0.089	0.079	0.087	0.089	0.089	0.089	0.086	0.082	0.092	0.083	0.081	0.054	0.081	0.094	0.081	0.079	0.075	0.085	0.079	0.074	0.096	0.072	0.094		
27. CH2cpBMV	0.095	0.089	0.095	0.083	0.091	0.095	0.095	0.095	0.085	0.086	0.091	0.087	0.078	0.070	0.083	0.087	0.013	0.083	0.081	0.089	0.090	0.078	0.096	0.076	0.092	0.070	

Figura 15. Cálculo de la distancia genética comparada por pares entre cada aislado de BabMV. En verde se encierran los aislados virales pertenecientes al genotipo 2 y en rojo los aislados virales pertenecientes al genotipo 3. El azul se encierra la distancia genética comparada entre los tres aislados virales de chamburo pertenecientes al genotipo 3.

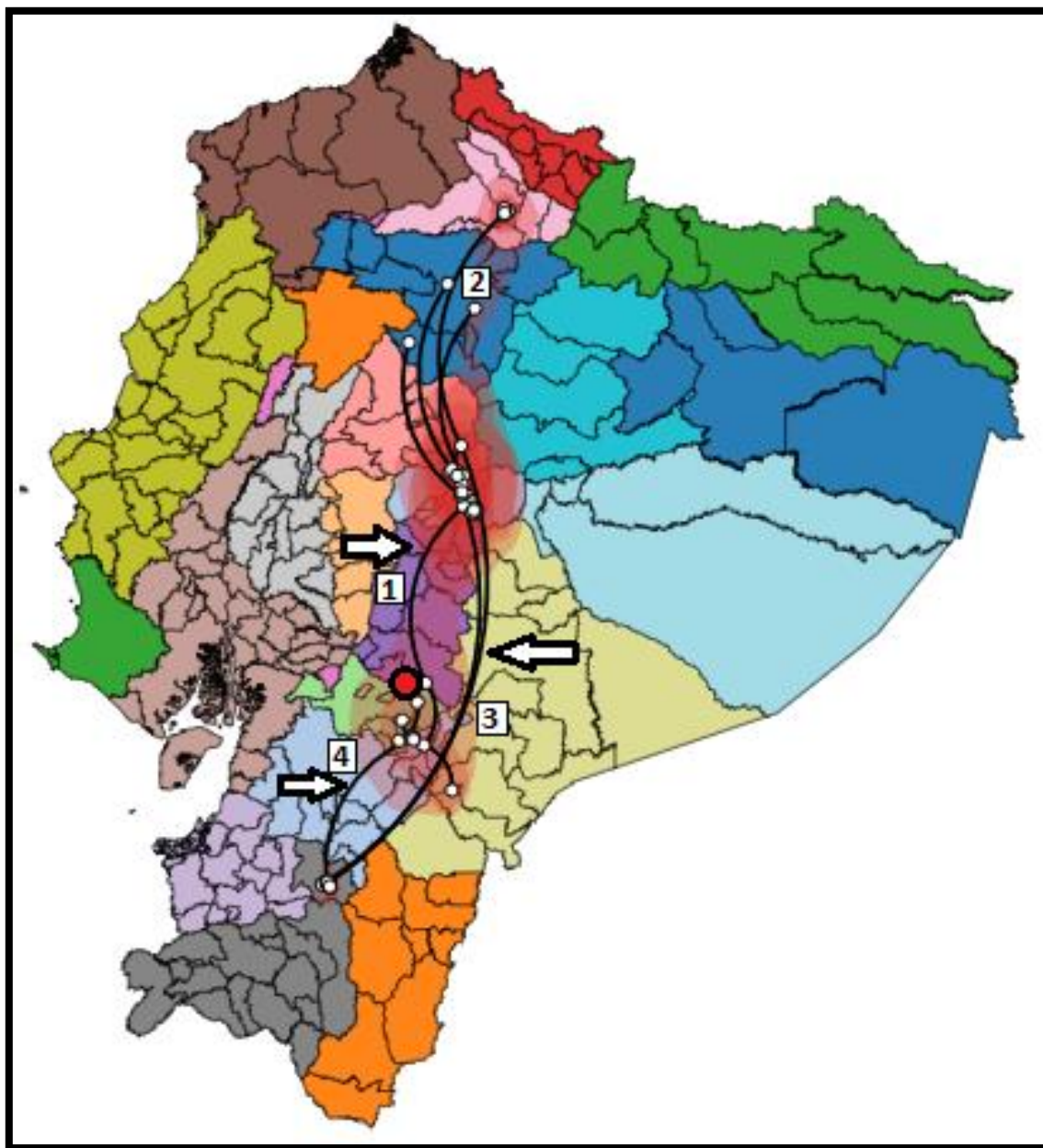


Figura 16. Ruta de dispersión de Babaco Mosaic Virus en Ecuador. El punto rojo representa el posible centro de origen. Los números indican el orden de la dispersión a partir del centro de origen. Las flechas indican los saltos geográficos.

El mapa de dispersión indica que posiblemente la epidemia viral inició en la provincia de Cañar saltando inmediatamente a la provincia de Tungurahua, lugar donde existe mayor variabilidad genética de donde se dispersa a las provincias de Pichincha Santo Domingo e Imbabura. Además, se observa un largo salto geográfico del virus desde la provincia de Tungurahua hasta Loja, y desde la provincia de Loja llega a la provincia de Azuay. Dado a que no se tienen datos del virus en la provincia de Cañar se entiende que el programa infiere localidades de movimiento del virus que pueden haber existido para los cuales no se posee aislamientos debido a que se seleccionó un modelo de espacio continuo para el análisis filogeográfico (Vaghi, 2015).

CAPÍTULO V

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización molecular del virus causante de mosaico en plantas de babaco (BabMV) indicó una relación estrecha con *Alternanthera mosaic virus* (AltMV) y *Papaya mosaic virus* con un porcentaje de identidad del 74% a nivel de aminoácidos de la proteína CP, estos valores de identidad están por debajo del umbral de la demarcación de especies de acuerdo con las directrices del Comité Internacional en Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) para Potexvirus, el cual es del 80%, por lo que este virus representa una nueva especie. Este nuevo Potexvirus coincide con el virus recientemente caracterizado por Quinto et al. (2017) durante el transcurso de este estudio dando porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de la proteína CP del 97%. Quinto et al. (2017) sugieren el nombre de Babaco Mosaic virus para este nuevo Potexvirus.

La estructura terciaria de la proteína de cubierta de BabMV es de disposición flexible y alargada la cual es similar a la estructura de la proteína CP del Potexvirus *Pepino mosaic virus* acorde a una búsqueda de homólogos cercanos en la base de datos Uniprot.

La prueba de detección y diagnóstico de BabMV consistió en una RT-PCR con el set de primers F: 5'-TCAGAGTCATCHAACAYTGGAA-3' y R: 5'-TGADGATTCACCAGARATC-3' que amplifican para un fragmento de 263 pb de una región de la proteína CP. Esta región del genoma se eligió debido a que las secuencias

de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) presentan varios motifs y secuencias conservadas entre familias virales (Bruen, 2003), por lo que pueden presentarse falsos positivos durante el diagnóstico y detección. La secuencia del bloque triplete de genes (TGB) por el contrario, es un sitio de alta variabilidad genética a nivel de género (Quinto, et al., 2017), y realizando un alineamiento múltiple de las secuencias del TGB del aislado viral de bases de datos, con la secuencia obtenida en este estudio y dos secuencias de aislados de chamburo, se observa que la variabilidad genética del TGB en BabMV es elevada a comparación con la variabilidad genética de la proteína CP, por lo que con el transcurso del tiempo puede haber mutaciones en la secuencia que influyan en la complementariedad de los primers presentándose falsos negativos durante la detección.

Las poblaciones de virus de plantas al igual que la de otros organismos, son genéticamente heterogéneas debido a las mutaciones que generan variantes entre los individuos de una población. La estructura genética de la población puede cambiar con el tiempo en el proceso evolutivo. La evolución puede conducir al surgimiento de diferentes entidades taxonómicas y un aspecto del estudio de la evolución es aclarar la historia evolutiva de los organismos y sus relaciones taxonómicas (García et al., 2001). BabMV ha sido caracterizado y descrito recientemente como el agente causal del mosaico en plantas de babaco (Quinto et al., 2017), por lo que se desconoce su dispersión, origen y parámetros evolutivos. Mediante filogeografía se pueden estimar estos parámetros evolutivos relacionados con la dispersión geográfica, como las localizaciones geográficas de ancestros, la edad del ancestro común, las tasas de dispersión territorial y las tasas de sustitución (Vaghi, 2015).

Para realizar el análisis de coalescencia filogeográfico se deben tener en cuenta dos restricciones: la región genética que se utilice debe ser conservada, y no debe estar expuesta a mecanismos de recombinación (Lefeuvre et al., 2010). En este estudio se eligió a la secuencia que codifica para la proteína de cubierta (Coat protein, CP) dado a la baja variabilidad genética que existe entre los distintos individuos de esta especie (Distancia genética promedio: 5,43%). Sin embargo, pese a que no se realizaron análisis de posibles zonas de recombinación en el genoma de BabMV, la secuencia de la CP se eligió en base a los estudios de Abubakar et al. (2003), Fargette et al. (2004), Lefeuvre, et al. (2010) & Vaghi, (2015), quienes encuentran que la región más adecuada para el análisis filogeográfico en virus es el ORF de la CP porque no se encontraron puntos calientes de recombinación en esta zona del genoma.

En el árbol de máxima credibilidad (MCCT) agrupa a los aislados de BabMV en tres genotipos distintos. En el genotipo 1 se agruparon varios aislados virales de diferentes localidades del Ecuador, lo que indicaría que para BabMV no existiría una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica como señala Fargette et al. (2004). Sin embargo, la distribución de la variabilidad genética en las poblaciones virales depende de dos procesos evolutivos principales: la deriva genética y la selección. La deriva genética es un proceso aleatorio donde ocurren mutaciones al azar que son heredadas a las nuevas generaciones, mientras que la selección es un proceso direccional en el que las variantes más adecuadas a un determinado entorno aumentan su frecuencia poblacional. La selección está asociada con todos los factores que intervienen en el ciclo de vida del virus, entre ellos su relación con el hospedero (García

et al., 2001), la diversidad genética es esencial en las poblaciones virales para adaptarse a las presiones ambientales, rango de hospederos (Schneider & Roossinck, 2001), así como a los mecanismos de resistencia de la planta (Acosta et al., 2010), pero dado a que babaco es un frutal híbrido y su propagación es asexual por medio de estacas o brotes, no existe una amplia variedad de hospederos a los que deba adaptarse BabMV. Además, en el Ecuador el babaco se cultiva mayoritariamente en invernaderos adaptados para su crecimiento, lo que podría reducir la deriva genética viral debido al efecto fundador, el cual ocurre cuando un virus entra a una nueva región geográfica u hospedero (García et al., 2001) justificando la poca relación entre variabilidad genética y distancia geográfica, sin embargo la alta tasa de sustitución del gen de la proteína de la cápside puede deberse a la elevada tasa de error de la replicasa viral en los virus de ARN (Velthuis, 2014).

En el genotipo viral 3 se agrupan las muestras virales del hospedero chamburo aislados de la provincia del Azuay (Figura 14). La distancia genética de estos aislados virales comparados con los aislados virales del hospedero babaco de la misma provincia, y del resto del Ecuador en general, es bastante amplia (promedio del 9%, figura 15). El chamburo es un frutal con reproducción sexual de poco interés comercial que se cultiva para consumo local en pequeñas extensiones de tierra (Proaño, 2007). El efecto en la variabilidad genética de BabMV en chamburo por efecto fundador y su interacción con la variabilidad del hospedero, causó un aumento en la distancia genética, (inclusive al comparar dos aislados distintos de chamburo su variabilidad es alta, de 7 al 8% al comparar los aislados CH1, CH2 y Chamburo, Figura 15), lo que sugiere una adaptación del virus al entorno. El genotipo viral 2 agrupó por el contrario, a dos aislados virales de

babaco de la provincia de Tungurahua distantes genéticamente del resto de aislados del país (Figura 14). La variabilidad genética de estos aislados puede deberse a la procedencia del linaje clonal de babaco cultivada en esa zona. Se debería entonces realizar un seguimiento del linaje de la ascendencia del hospedero.

Dentro de los parámetros evolutivos de BabMV, se calculó la tasa de sustitución, la cual está relacionada directamente con el proceso evolutivo del virus ya que mide la velocidad con la que cambia la secuencia del gen (Vaghi, 2015). Para el ORF de la CP, la tasa de sustitución fue de 4.81×10^{-3} sustituciones/sitio/año ($2.4 \times 10^{-3} - 9.4 \times 10^{-3}$, Nivel de confianza del 95%), el valor se asemeja a la tasa de sustitución de otros virus fitopatógenos como Begomovirus (9.8×10^{-3}) (Vaghi, 2015), *East african cassava mosaic virus* (1.6×10^{-3}) (Duffy & Holmes, 2009) y *Rice yellow mottle virus* (1.178×10^{-4}) (Fargette, et al., 2008), éste último cercano a BaMV.

La fecha de origen inferida por el análisis filogeográfico data al ancestro en común más cercano en el intervalo de 1790 a 1960 (Nivel de confianza: 95%). Quinto et al. (2017) especula que BabMV y el Potexvirus asociado serológicamente a *Papaya mosaic virus* descrito en el año 1989 por Marina & Giordano en Italia son la misma especie dado a que el Babaco fue introducido a Italia desde Ecuador a inicios de los 80. Dicha especulación sería confirmada con la edad probable de origen del virus. El intervalo de confianza de edad de origen de alrededor de 170 años, pese a la flexibilidad y precisión de los análisis bayesianos para inferir el conocimiento previo, este rango de fechas es bastante amplio, y aunque los virus de ARN mutan rápidamente provocando cambios evolutivos inclusive dentro de un huésped requiriéndose pocos meses de diferencia de fechas de muestreo

para inferir parámetros evolutivos, se debería incrementar el número de muestras temporales y repetir el análisis filodinámico para reducir la incertidumbre. Además, se deberían realizar pruebas de infectividad de *Papaya mosaic virus* en babaco, ya que este fue asociado únicamente serológicamente su cultivo (Marina & Giordano 1988).

El centro de origen que infiere el programa Spread3 en el análisis filogeográfico de BabMV es la provincia de Cañar, sin embargo, no se tienen datos de aislados virales de esta provincia, por lo que se entiende que el programa infiere en base a las fechas de muestreo y la variabilidad genética, posibles localizaciones del virus que pueden haber existido (Vaghi, 2015). Los lugares más antiguos de muestreo de BabMV para la cual se tiene registro están en la provincia de Azuay para los aislados del hospedero chamburo y en la provincia de Santo domingo para el aislado reportado en bases de datos por Quinto et al. (2017). El lugar con mayor variabilidad genética de BabMV es la provincia de Tungurahua debido al creciente aumento de cultivos de babaco en la zona, por lo que no es de extrañarse que el programa Spread infiera una localidad intermedia en base a los datos presentados. Pese a eso, se puede observar un salto directo del virus desde la provincia de Cañar hacia la provincia de Tungurahua (lugar con mayor variabilidad genética), a partir de la cual se dispersa el virus por el resto del país. Estos datos indicarían que el posible centro de origen sería la provincia de Tungurahua, pero las encuestas realizadas a los agricultores en la zona de muestreo afirman que los brotes y estacas de babaco que ellos siembran y reponen cuando los cultivos parecen provienen de la provincia de Loja. En el mapa de dispersión de BabMV, se observa un largo salto geográfico del virus desde la Provincia de Tungurahua hasta Loja, pero las plantas de

babaco que se cultivan allí no migran en esa dirección ya que el frutal es endémico de Loja, y gran mayoría de los linajes clonales de babaco se producen en esta provincia para su distribución, lo que sugeriría que el centro de origen más probable de BabMV está ligada al centro de origen del hospedero (Babaco o su progenitor Chamburo), es decir la provincia de Loja.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES

- El genoma viral de BabMV consta de cinco ORFs y dos UTRs a los extremos al igual que otros Potexvirus, El ORF1 codifica para la replicasa viral, Los ORF2, ORF3 y ORF4 codifican para el bloque triple de genes implicados en la infectividad del virus y el ORF5 codifica para la proteína de cubierta CP.
- La estructura terciaria de la proteína de cubierta de BabMV contiene 49% de hélices alfa, un desorden del 30% y ninguna lámina beta, lo que le confiere una disposición flexible y alargada homóloga al potexvirus *Bamboo Mosaic Virus*.
- La RT-PCR diseñada para el diagnóstico de BabMV detectó todos los aislados virales sometidos a prueba y fue capaz de detectar hasta 8 ng / μ L de RNA viral. No presentó reacción cruzada con otros potexvirus cercanos.
- El análisis filogeográfico en conjunto con los eventos de propagación del babaco conocidos en el Ecuador, permitieron inferir que el centro de origen más probable de BabMV está ligado con el centro de origen de su hospedero el cual es la Provincia de Loja.
- El análisis filogeográfico y la prueba de diagnóstico viral permitirán tomar medidas fitosanitarias para el cultivo de babaco, evitando la dispersión de linajes clonales infectados con el virus.

CAPÍTULO VII

7. RECOMENDACIONES

- Para los estudios evolutivos de virus fitopatógenos de plantas híbridas de reproducción asexual como el babaco, se debería tomar en cuenta aislados virales de diferentes hospederos de reproducción sexual como el chamburo y la papaya, ya que al no ser líneas clonales, la variabilidad genética del huésped va a influenciar en la adaptación y evolución del virus. Además, pueden existir genotipos hospedadores que estén ligados a la raíz evolutiva del virus, que desencadenen migraciones territoriales o que presenten genes de resistencia al virus.
- Si bien, los análisis bioinformáticos ayudan a predecir posibles eventos pasados en la evolución de un organismo, hay que tener en cuenta los eventos de migración conocidos para sacar conclusiones acordes a la realidad.
- Se debería incrementar el número de muestras temporales y repetir el análisis filodinámico para reducir la incertidumbre temporal y corroborar los parámetros evolutivos del virus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abubakar, Z., Ali, F., Pinel, A., Traore, O., N'Guessan, P., Notteghem, J. L., ... & Fargette, D. (2003). Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. *Journal of General Virology*, 84(3), 733-743.
- Abubakar, Z., Ali, F., Pinel, A., Traore, O., N'Guessan, P., Notteghem, J. L., ... & Fargette, D. (2003). Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. *Journal of General Virology*, 84(3), 733-743.
- Acosta-Leal, R., Bryan, B. K., & Rush, C. M. (2010). Host effect on the genetic diversification of beet necrotic yellow vein virus single-plant populations. *Phytopathology*, 100(11), 1204-1212.
- Arauz Luis, 1998. Fitopatología. Un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 1era edición. Pp 59-63. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=I6jDW5HI9BAC&pg=PA60&dq=virus+fitopatogenos&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiS8NycnbLYAhWr1IMKHbSGAJsQ6AEISTAH#v=onepage&q=virus%20fitopatogenos&f=false>
- Bruenn, J. A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic acids research*, 31(7), 1821-1829.
- Castillo, X. O., Fermin, G., Tabima, J., Rojas, Y., Tennant, P. F., Fuchs, M., ... & Restrepo, S. (2011). Phylogeography and molecular epidemiology of Papaya ringspot virus. *Virus research*, 159(2), 132-140.

- Coyago, R.L.; F.X. León; V.E. Patiño: Evaluación del comportamiento del Babaco (*Vasconcellea x heilbornii nm. pentagona*) en tres tipos de alturas de podas en plantas de seis años de producción en la Parroquia Bulán, cantón Paute, Provincia del Azuay. Títulos para optar los grados de Ingenieros Agropecuarios Industriales. Universidad Politécnica Salesiana Sede-Matriz Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Cuenca, Ecuador. 2010, 128 p.
- De Cañar, A. D. A. I. (2003). El cultivo de babaco en invernadero. *Editorial Abya Yala. Quito, Ecuador.*
- Di Bello, P. L., Ho, T., & Tzanetakis, I. E. (2015). The evolution of emaraviruses is becoming more complex: seven segments identified in the causal agent of Rose rosette disease. *Virus research*, 210, 241-244.
- Duffy, S., & Holmes, E. C. (2009). Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *Journal of General Virology*, 90(6), 1539-1547.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5):1792-1797
- Emerson, B. C., & Hewitt, G. M. (2005). Phylogeography. *Current biology*, 15(10), R367-R371.
- Escobar Imbaquingo, D. J. (2012). Efectos a la aplicación de tres estimulantes radiculares en la producción vegetativa de estacas de Babaco (*Carica pentágona Hilb*) en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB, 2012). Recuperado de: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/465/10/T->

UTB-FACIAG-AGR-000080.03.pdf

- Espinoza, R. R. (2016). Biocontrol de la Marchitez Vascular del Babaco (*Vasconcellea heilbornii*. var. pentágona) empleando microorganismos antagonistas (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Loja-Ecuador.
- Fargette, D., Pinel, A., Abubakar, Z., Traoré, O., Brugidou, C., Fatogoma, S., ... & Konaté, G. (2004). Inferring the evolutionary history of Rice yellow mottle virus from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *Journal of virology*, 78(7), 3252-3261.
- Faria, N. R., Suchard, M. A., Rambaut, A., Lemey, P. 2011. Towards a quantitative understanding of viral phylogeography. *Current Opinion in Virology*, 1(5):423–429.
- Fernández R, Gómez A, Llorente R, & Villena Rubén. (2010). Virus Fitopatógenos.
- García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 157-186
- García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 157-186.
- Gergerich, R & V. Dolja. (2006). Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible. Trans. Silvina L. Giammaría. Recuperado de: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/PlantVirusesEspagnol.aspx>

- González, G.R. 2017. Evolución de Técnicas de Diagnóstico de Virus Fitopatógenos. Serie Fitosanidad Núm. 98. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 12 p. Extraído de: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/evolucion-de-tecnicas-de-diagnostico-de-virus-fitopatogenos>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ©. (2016). Taxonomy History. recuperado de <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Jacome, J. F. (2011). Evaluación de tres mezclas de sustratos y tres fitohormonas en enraizamiento de brotes laterales de babaco (*Carica pentagona*), barrio Pinlocruz, cantón Mejía, provincia de Pichincha. Recuperado de: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/733/1/T-UTC-0571.pdf>
- Kenyon, L., Tsai, W. S., Shih, S. L., & Lee, L. M. (2014). Emergence and diversity of begomoviruses infecting solanaceous crops in East and Southeast Asia. *Virus research*, 186, 104-113.
- Kühnert, D., Wu, C. H., & Drummond, A. J. (2011). Phylogenetic and epidemic modeling of rapidly evolving infectious diseases. *Infection, genetics and evolution*, 11(8), 1825-1841.
- Kumar, R., Manchev, N., Patil, B. & Ivanona, M. (Ed.) (2016). *Plant Viruses: Evolution and Management*. Singapore: Springer Nature. pp.1-25.
- Lefeuvre, P., Martin, D. P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A. J., Meredith, S., ... & Heydarnejad, J. (2010). The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathogens*, 6(10), e1001164.

- Lim, T. K. (2012). *Vasconcellea x heilbornii*. En T. K. Lim (Ed.), *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Volume 1* (p. 718-721). New York: Springer.
- Marina, B., & Giordano, P. (1988, June). An elongated virus associated with yellow mosaic of babaco. In XIV International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases 235 (pp. 149-156).
- Mehle, N. & Ravnkar, M. (2012). Plant Viruses in aqueous environment - Survival, mediated transmission and detection. *ELSEVIER Review*, pp. 4903-4907.
- Montenegro, F. (2009). Cultivo de Babaco (*Carica pentagona* H.) Bajo invernadero. Recuperado de: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/cultivo-babaco-carica-pentagona-t27813.htm>
- Montes Mosquera, A. D. J. (2017). *Análisis de modelo de negocio para la producción comercialización y distribución del congelado de la pulpa de babaco en el mercado local de Guayaquil y su exportación a la ciudad de Amsterdam-Holanda* (Bachelor's thesis, U). recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18303/1/TESIS%20MONTES.pdf>
- Munevar, F, (2016). Timeline: Organisms that have had their genomes sequenced. Recuperado de: <https://www.yourgenome.org/facts/timeline-organisms-that-have-had-their-genomes-sequenced>
- Naidu R & Hughes J. (2001). Methods for the detection of plant virus diseases. *Plant Virology*
- Ochoa Corona, F. M., Fletcher, J., & Olson, J. (2014). Final Report Research Suggestions for USDA-APHIS FY12 Farm Bill section 10201. Unpublished, 18.

- Ochoa, J., Fonseca, G., & Ellis, M. A. (2000). First report of Fusarium wilt of Babaco (*Caricax heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador. *Plant Disease*, 84(2), 199-199.
- Olmedo Velarde, A., & Ochoa Corona, F. (2016). Discriminating Potexvirus species by RT-PCR coupled to High Resolution Melting.
- Proaño, E. (2007). Fitoquímica y agroindustrialización de dos genotipos de vasconcellea, chamburo (*Vasconcellea Cundinamarcensis* V. Badillo) y toronche (*Vasconcellea Stipulata* V. Badillo) (Bachelor's thesis, SANGOLQUÍ/ESPE-IASA I/2007).
- Quinto, R. A., Cornejo, J. F., & Quito, D. F. (2017). Characterization of a not so new potexvirus from babaco (*Vasconcellea x heilbornii*). *PloS one*, 12(12), e0189519.
- Rambaut A., Marc Suchard M., Drummond A. Tracer. 2013. Versión 1.6. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rivera German, 1999. Conceptos Introdutorios a la Fitopatología. Editorial Universidad Estatal a distancia. Primera edición
- Robles Carrión, A. R., Herrera Isla, L., & Torres Gutiérrez, R. (2016). El babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona* Badillo). Principales agentes fitopatógenos y estrategias de control. *Centro Agrícola*, 43(2), 83-92.
Recuperado de:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-5785201600020001
- Rodríguez, K. (2013). Plan de exportación de babaco para la compañía Agro-Productos del Ecuador “El Migrante Cia. Ltda.” de la ciudad de Saraguro al

mercado europeo para el año, 12-14.

- 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.
- Schneider, W. L., & Roossinck, M. J. (2001). Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of virology*, 75(14), 6566-6571.
- Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). (2008). Potexvirus Virion & Genome. Recuperado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/272.html#tab6
- Thomson, D., & Dietzgen, R. G. (1995). Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *Journal of Virological Methods*, 54(2-3), 85-95.
- Vaghi Medina, C. G. (2015). Diversidad genética, recombinación y filogeografía de bogomovirus que infectan tomate en Argentina.
- Velthuis, A. J. (2014). Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. *Cellular and molecular life sciences*, 71(22), 4403-4420.
- Verchot-Lubicz J., Baulcombe D.C. (2011) Potexvirus. In: Tidona C., Darai G. (eds) *The Springer Index of Viruses*. Springer, New York, NY
- VISAVET, (2013). *Detección y caracterización molecular de microorganismos*. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria. Universidad de Complutense.