



**“Caracterización genómica y biológica de un nuevo *Cheravirus* en babaco (*Vasconcellea x heilbornii*. var. *pentagona*)”**

Salazar Maldonado, Liseth Carolina

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 Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

9 de octubre del 2020

## Resultado del análisis de Urkund



## Document Information

<b>Analyzed document</b>	Proyecto de Titulación_Salazar Liseth.docx (D79775016)
<b>Submitted</b>	9/24/2020 2:58:00 AM
<b>Submitted by</b>	
<b>Submitter email</b>	fjflores2@espe.edu.ec
<b>Similarity</b>	8%
<b>Analysis address</b>	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS MS VACA FINAL.docx</b> Document TESIS MS VACA FINAL.docx (D36744874) Submitted by: jwron@espe.edu.ec Receiver: jwron.espe@analysis.arkund.com		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Eduardo_Moncayo_Tesis.docx</b> Document Eduardo_Moncayo_Tesis.docx (D40518710) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com		<b>3</b>
<b>SA</b>	<b>Tesis Fiama plain text.txt</b> Document Tesis Fiama plain text.txt (D29631919)		<b>4</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Eduardo Moncayo_Tesis Final.docx</b> Document Eduardo Moncayo_Tesis Final.docx (D43529759) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis solo texto AOviedo.txt</b> Document Tesis solo texto AOviedo.txt (D26223482) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com		<b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.4172/2167-0870.1000136">https://doi.org/10.4172/2167-0870.1000136</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM		<b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189519">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189519</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM		<b>2</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.25081/jsa.2017.v1i0.35">https://doi.org/10.25081/jsa.2017.v1i0.35</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM		<b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://doi.org/10.1093/bib/bbt083">https://doi.org/10.1093/bib/bbt083</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM		<b>1</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis_Karla Ramos correc2.docx</b> Document Tesis_Karla Ramos correc2.docx (D54146700) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com		<b>1</b>

## URKUND

W	URL: <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Babaco">https://en.wikipedia.org/wiki/Babaco</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM	 1
W	URL: <a href="https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/58269/RANGEL%20-%20Desarrollo%20de%20...">https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/58269/RANGEL%20-%20Desarrollo%20de%20...</a> Fetched: 5/29/2020 1:06:02 AM	 2
SA	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis_Karla Ramos.docx</b> Document Tesis_Karla Ramos.docx (D53540411) Submitted by: ffflores2@espe.edu.ec Receiver: ffflores2.espe@analysis.orkund.com	 2
W	URL: <a href="http://www.jstor.org/stable/41998798">http://www.jstor.org/stable/41998798</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM	 1
W	URL: <a href="https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087">https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM	 1
W	URL: <a href="https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/74370/1/Covadonga%20Torre%20Guardiol...">https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/74370/1/Covadonga%20Torre%20Guardiol...</a> Fetched: 7/8/2020 2:02:52 PM	 3
W	URL: <a href="https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.08">https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.08</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM	 1
W	URL: <a href="https://www.researchgate.net/publication/311680323_Transmision_de_virus_de_plantas...">https://www.researchgate.net/publication/311680323_Transmision_de_virus_de_plantas...</a> Fetched: 9/24/2020 2:59:00 AM	 1

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR

.....  
**Flores Flor, Francisco Javier PhD.**  
**DIRECTOR**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización genómica y biológica de un nuevo *Cheravirus* en babaco (*Vasconcellea x heilbornii*. var. *pentagona*)**” fue realizado por la señorita **Salazar Maldonado, Liseth Carolina** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de octubre de 2020



Firmado electrónicamente por:  
**FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR**

.....  
**Flores Flor, Francisco Javier PhD.**

C. C. 1713443479



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **Salazar Maldonado, Liseth Carolina**, con cédula de ciudadanía n° 1726006578, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Caracterización genómica y biológica de un nuevo *Cheravirus* en babaco (*Vasconcellea x heilbornii*. var. *pentagona*)** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 9 de octubre de 2020**

Firma

**Salazar Maldonado, Liseth Carolina**

C.C.: 1726006578



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Autorización de publicación**

Yo **Salazar Maldonado, Liseth Carolina**, con cédula de ciudadanía n°1726006578, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Caracterización genómica y biológica de un nuevo *Cheravirus* en babaco (*Vasconcellea x heilbornii*. var. *pentagona*)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 9 de octubre de 2020

Firma

**Salazar Maldonado, Liseth Carolina**

C.C.: 1726006578

## Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi madre Silvia Maldonado, a mis abuelitos y a mi tío Fabián, quienes procuraron que no me falte nada durante el transcurso de la carrera universitaria para que así todo mi esfuerzo y concentración se centre en mis estudios.

## **Agradecimiento**

Agradezco a mi familia por todo el apoyo y palabras de aliento en los momentos difíciles, este logro también es de ustedes. A todos mis familiares de Yaguachi que me acogieron durante mi estancia en la costa y me hicieron sentir como en casa. A la Licenciada Carmen Plaza por recibirme en su hogar durante los meses que estuve en Guayaquil.

Agradezco a mi tutor el Dr. Francisco Flores por darme todas las facilidades para culminar este proyecto y por guiarme en el transcurso de su realización. Al Dr. Diego Quito por haberme dado la apertura para la realización del proyecto y por tomarse el tiempo de compartir su conocimiento y ayudarme a despejar todas mis dudas. Al MSc. Juan Francisco Cornejo por su paciencia y buen ánimo para explicarme todo lo relacionado con el laboratorio e invernadero. A la Dra. Lisbeth Espinoza por permitirme ocupar las instalaciones del Laboratorio de Entomología de la ESPOL y por transmitirme su conocimiento. También quiero agradecer al Ing. Aníbal Martínez miembro del Consejo Provincial de Tungurahua y a sus colaboradores el Ing. Fernando Valenzuela y el Ing. Geovany Coba por tomarse el tiempo para acompañarme a los diferentes invernaderos de babaco en los diferentes cantones de la provincia de Tungurahua.

Quiero agradecer a mis amigos Fernando Villegas, Bryan Mangui y Luis Salvatierra por estar a mi lado durante el transcurso de la carrera universitaria y por abrirme las puertas de su hogar en las largas noches de estudio. En especial quiero agradecer a Daniel Acuña que hasta el final de esta etapa estuvo apoyándome de forma incondicional, sin importar lo ocupado o cansado que pudiese estar, motivándome a dar lo mejor de mí en cada actividad.

## Índice de contenido

Resultado del análisis de Urkund.....	2
Certificación .....	4
Responsabilidad de autoría .....	5
Autorización de publicación.....	6
Dedicatoria.....	7
Agradecimiento.....	8
Listado de figuras .....	11
Listado de tablas .....	11
Listado de abreviaturas.....	12
Resumen .....	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción .....	15
Formulación del problema.....	15
Justificación.....	16
Objetivos .....	17
Objetivo General .....	17
Objetivos Específicos .....	17
Capítulo II: Marco teórico .....	18
Generalidades del Babaco .....	18
Enfermedades del babaco causadas por virus.....	19
Generalidades de virus en plantas.....	20
Caracterización del género Cheravirus .....	21
Transmisión de virus .....	22
Transmisión vírica por injerto .....	22
Nemátodos como vectores víricos.....	22
Métodos de detección y diagnóstico .....	24
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) .....	25
Secuenciación de siguiente generación.....	25
Análisis Filogenéticos .....	26
Hipótesis .....	26

	10
Capítulo III: Materiales y métodos.....	26
Caracterización del virus a nivel genómico.....	26
Extracción de ARN total .....	27
Secuenciación de siguiente generación.....	27
Detección de Cheravirus .....	28
Obtención de muestras de material vegetal .....	28
Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) .....	28
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	29
Análisis bioinformático .....	30
Análisis de la secuencia.....	30
Construcción de árbol filogenético .....	30
Evaluación del rol de nemátodos en la transmisión del nuevo virus.....	31
Obtención de muestras de suelo .....	31
Extracción de nemátodos fitoparásitos (Xiphinema) por centrifugación en azúcar .....	31
Identificación de nemátodos .....	32
Multiplicación de plantas por injerto.....	32
Capítulo IV: Resultados .....	33
Análisis molecular .....	33
Secuenciación parcial del genoma de BabChV-1 .....	33
Detección de BabChV-1 en muestras de babaco recolectadas en las provincias de Azuay y Tungurahua .....	33
Análisis bioinformático .....	36
Comparación de ARN-1 de BabChV-1 con otros miembros del género Cheravirus .....	36
Establecimiento de relaciones filogenéticas entre miembros de la familia Secoviridae y el nuevo Cheravirus encontrado en Babaco.....	37
Análisis biológico.....	39
Identificación de nemátodos de las muestras de suelo recolectadas en las provincias de Azuay y Tungurahua.....	39
Método propuesto para la evaluación de nemátodos como vectores víricos .....	39
Reportes de Cherry rasp leaf virus (CRLV) asociados a la transmisión por Xiphinema spp...	41
Capítulo V: Discusión .....	42
Capítulo VI: Conclusiones.....	45
Capítulo VII: Recomendaciones .....	46
Bibliografía .....	47

### Listado de tablas

<b>Tabla 1</b> Cantidades empleadas para la preparación del master mix para la RT-PCR .....	28
<b>Tabla 2</b> Condiciones del programa de RT-PCR para la detección de Babaco cheravirus-1 .....	28
<b>Tabla 3</b> Primers empleados para la detección de Cheravirus en hojas de babaco .....	29
<b>Tabla 4</b> Cantidades empleadas para la preparación del master mix para la PCR.....	29
<b>Tabla 5</b> Condiciones del programa de PCR para la detección de Babaco cheravirus-1.....	30
<b>Tabla 6</b> Resultados del análisis SMART BLAST de la poliproteína del segmento ARN-1 .....	36
<b>Tabla 7</b> Porcentaje de identidad de los dominios encontrados en el segmento ARN-1 de BabChV-1 y otros miembros del género Cheravirus.....	37

### Listado de figuras

<b>Figura 1</b> Visualización de productos de PCR de BabChV-1 de las muestras recolectadas en Paute.....	34
<b>Figura 2</b> Visualización de productos de PCR de BabChV-1 de las muestras recolectadas en la provincia de Tungurahua.....	35
<b>Figura 3</b> Árbol de Neighbor-joining de los miembros representativos de la familia Secoviridae basada en las secuencias de la poliproteína del segmento ARN-1 .....	38

### Listado de abreviaturas

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**ALSV:** *Apple latent spherical virus*

**ARN:** ácido ribonucleico

**AVB:** *Arracacha virus B*

**BabChV-1:** babaco cheravirus-1

**BLAST:** Basic Local Aligment Search Tool

**CRLV:** *Cherry rasp leaf virus*

**CuLV:** *Currant latent virus*

**dNTP's:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**DTT:** ditioneíto

**HTS:** secuenciación de alto rendimiento

**M:** molar

**mL:** mililitro

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**pb:** pares de bases

**rpm:** revoluciones por minute

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

**spp:** especies

**StPV:** *Stocky prune virus*

**TAE:** disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA

**μL:** microlitro

## Resumen

Los virus fitopatógenos provocan importantes pérdidas económicas al afectar la calidad de la producción agrícola, cuestión que se agudiza a través de la propagación de cultivos por injerto. El carácter estéril del babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *pentagona*) requiere la implementación de métodos de multiplicación asexual con el fin de asegurar el rendimiento de la producción de sus frutos, volviéndolo susceptible a infecciones causadas por microorganismos incluyendo virus. Mediante la secuenciación masiva de ADN complementario de hojas recolectadas en viveros comerciales, se detectó el fragmento ARN-1 correspondiente a la poliproteína de un nuevo virus denominado tentativamente babaco cheravirus-1 (BabChV-1). El análisis filogenético de la secuencia de la poliproteína del cheravirus-1 confirmó la estrecha relación evolutiva que comparte con dos miembros del género *Cheravirus*, *Apple latent spherical virus* (ALSV) y *Cherry rasp leaf virus* (CRLV). El presente estudio sugiere un método de evaluación de transmisión de virus por nemátodos y provee una revisión bibliográfica de nemátodos como vectores biológicos del virus CRLV. La evidencia adquirida hasta el momento indica que el segmento ARN-1 del babaco cheravirus-1 es transmitido por injertos y que la titulación de la molécula de ARN-2 en las plantas de babaco infectadas es bajo o no está presente.

### Palabras clave:

- **CHERAVIRUS**
- **VASCONCELLEA X HEILBORNII VAR. PENTAGONA**
- **BABACO**
- **XIPHINEMA**
- **NEMATODES**

### **Abstract**

Plant viruses cause major economic losses by affecting the quality of agricultural production, an issue that increases due to grafting multiplication. The sterile character of babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *pentagona*) requires the implementation of asexual reproduction methods with the objective of achieving a profitable fruit production, what it renders babaco susceptible to microbial diseases, especially those caused by viruses. Through massive sequencing of complementary DNA from babaco leaves collected from Ecuadorian highlands commercial nurseries, the partial sequence of a new babaco virus tentatively named babaco cheravirus-1 (BabChV-1) was detected. Phylogenetic analysis of the sequence of the babaco cheravirus-1 RNA-1 polyprotein confirms a close evolutionary relationship with two members of the *Cheravirus* gender, *Apple latent spherical virus* (ALSV) and *Cherry rasp leaf virus* (CRLV). This work suggests a procedure to evaluate the virus transmission by nematodes and provides a bibliographic review of nematodes as CRLV biological vector. The current evidence shows that the RNA-1 babaco cheravirus-1 segment is transmitted by grafting and the titer of the RNA-2 molecule of the infected plants is low or absent.

#### **Keywords:**

- **CHERAVIRUS**
- **VASCONCELLEA X HEILBORNII VAR. PENTAGONA**
- **BABACO**
- **XIPHINEMA**
- **NEMATODES**

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

Los virus son los fitopatógenos de mayor importancia después de los hongos, ya que causan pérdidas económicas de billones de dólares anuales (Jeong et al., 2014), al reducir la calidad y cantidad de productos agrícolas a nivel mundial (Pecman et al., 2017). Desde la identificación del virus del mosaico del tabaco (TMV) en 1898, primer virus caracterizado, se conoce su carácter ubicuo y dependencia hacia sus hospederos (Sanfaçon, 2017). La implementación de métodos de secuenciación ha permitido la detección acelerada de nuevos virus en plantas (Lewsey y Carr, 2019), sin embargo, el conocimiento obtenido hasta el momento sigue siendo limitado (Roossinck, 2013).

Mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS), se analizaron muestras de invernaderos comerciales de babaco en la provincia de Azuay, dando lugar al reporte del primer viroma de babaco de Ecuador. Los resultados permitieron la detección de seis secuencias similares a partículas víricas, el genoma de tres de estas secuencias se detectó de forma parcial; las cuales presentaron homología con los géneros *Cheravirus*, *Nepovirus* y *Deltapartitivirus* (Cornejo-Franco et al., 2020).

La propagación de las enfermedades virales a nuevas zonas geográficas, se debe al movimiento de los vectores y al transporte de material vegetativo infectado (Al-Ali et al., 2013), problema que se agrava en países en vías de desarrollo (Kreuze y Valkonen, 2017). El babaco es un híbrido estéril que se originó de forma natural (Peña et al., 2017), por lo que su producción requiere de propagación vegetativa por brotes, estacas o injertos (Robles et al., 2016), haciéndolo susceptible a problemas fitopatológicos (Scheldeman et al., 2002). Es por esta razón que se requiere la implementación de métodos de manejo de cultivo que mitiguen el impacto

de los virus, lo que se logra a través del conocimiento del patógeno y su interacción con el ambiente (Aranda y Freitas-Astúa, 2017).

### **Justificación**

El babaco es una planta apetecida a nivel comercial por su fácil propagación, crecimiento y la poca mano de obra requerida (Kempler y Kabaluk, 1996). Su fruto constituye un producto de exportación (Robles et al., 2016), especialmente a países norteamericanos y europeos (Soria y Viteri D., 1999), debido a la ausencia de semillas, cutícula delgada y sabor agradable (Robles et al., 2016). Las principales provincias productoras de Ecuador son Tungurahua, Pichincha, Imbabura, Carchi, Azuay y Loja (Soria y Viteri D., 1999).

Las cualidades comerciales de un producto agrícola están determinadas por su sanidad, valor nutricional, características organolépticas y propiedades físicas (Parra, 1989), por esta razón, se deben desarrollar métodos de diagnóstico y mantenimiento contra las enfermedades en plantas, ya que los cultivos infectados pueden repercutir de manera negativa en la economía local y nacional de un país (Lucas, 2009). Las regiones en vías de desarrollo aplican productos para el control fitosanitario de bajo costo y efectividad reducida, lo que incrementa la susceptibilidad a ataques virales. Adicionalmente estas naciones, no cuentan con equipos ni personal capacitado que contribuya al reconocimiento y reporte de los virus que atacan a los cultivos (Rybicki y Pietersen, 1999).

Se requiere implementar métodos de diagnóstico que contribuyan a la detección de virus emergentes, así como la generación de información que permita entender la biología del virus (Rojas y Gilbertson, 2008). Entre las técnicas tradicionales de diagnóstico, se encuentra la interpretación visual de síntomas, sin embargo, factores como la cepa del virus, el huésped, el tiempo de infección, ambiente, desbalance nutricional, uso de pesticidas y contaminación pueden provocar errores en el proceso o inducir una sintomatología no aparente (Alemu, 2015).

Una vez que se haya generado este conocimiento se puede asegurar una agricultura segura y sustentable (López et al., 2003).

Las partículas víricas tienen que atravesar la cutícula y las paredes de celulosa para ingresar a las células vegetales, este proceso es posible gracias a las asociaciones que han desarrollado con insectos y nemátodos (Zaitlin y R., 1987). Generar información acerca del comportamiento y efectos de los vectores biológicos de un virus, permite la aplicación de tratamientos que prevengan su propagación (Harrison, 1977). Además, esto evita que el virus aumente su rango de hospederos (Brown, Ploeg, et al., 1995), con lo que se previenen mayores pérdidas económicas.

El presente proyecto pretende caracterizar un nuevo virus del babaco encontrado en un vivero comercial de la provincia de Azuay, enfocándose en la determinación del vector natural, secuenciación completa de su genoma y relaciones filogenéticas. La información generada permitirá un asesoramiento certero por parte de los dirigentes de los gobiernos locales a los agricultores en cuanto al control de enfermedades, con lo cual se podrá ofertar un fruto de calidad y mejorar los ingresos de los productores.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Caracterizar a nivel genómico y biológico un nuevo *Cheravirus* en babaco (*Vasconcellea x heilbornii*. var. *pentagona*).

### ***Objetivos Específicos***

- Obtener el genoma completo del nuevo *Cheravirus* encontrado en babaco (*Vasconcellea x heilbornii*. var. *pentagona*) mediante secuenciación de siguiente generación.

- Establecer relaciones filogenéticas del nuevo virus con miembros de la familia *Secoviridae* a través de la comparación de genes homólogos.
- Evaluar el rol de nemátodos encontrados en raíces de babaco en la transmisión del nuevo virus.

## Capítulo II: Marco teórico

### Generalidades del Babaco

El babaco (*Vasconcellea x heibornii*. var. *pentagona*) es un híbrido natural entre el chamburo (*Carica pubescens*) y el toronche (*Carica stipulata*) (Soria y Viteri D., 1999). Se originó en la provincia de Loja y se encuentra distribuido en los valles interandinos del Ecuador (Soria, 1997). No se han reportado variedades del babaco pero si ecotipos que se diferencian en su forma, color de pulpa y aroma (Soria, 1997). Su reproducción es asexual, debido a su condición estéril (Kempler y Kabaluk, 1996), por lo que su propagación se realiza mediante brotes, estacas o injertos (Robles et al., 2016). El cultivo fructifica a los 9 o 12 meses después del trasplante y su producción continúa hasta aproximadamente 36 meses (Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar, 2003).

El babaco tiene un mejor rendimiento bajo condiciones de invernadero que al cultivarlo al aire libre (Jadán y Dorca, 2019). Además el cultivo de babaco en invernadero ha permitido la extensión del cultivo a zonas donde no se cumplen las condiciones climatológicas necesarias (Soria, 1997). Se recomienda ubicar los invernaderos entre 1500 y 3100 msnm., con temperaturas ideales de 15 a 20°C, que se pueden regular mediante el uso de cortinas. El porcentaje de humedad requerido oscila entre el 60 y 80%, con una luminosidad de 5 horas diarias. El suelo debería tener una textura franco-arcillo-arenosa, con un 3% de materia orgánica y un pH entre 5,8 y 8,2 (Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar, 2003).

A partir de la exportación de esquejes de babaco en el año 1973 por parte de investigadores de Nueva Zelanda, la producción comercial del cultivo se expandió a países como Italia, España, Israel, Reino Unido, Estados Unidos y desde luego Nueva Zelanda. Las características que potencian su comercialización son su fácil propagación, rápido crecimiento y requerimiento de poca mano de obra (Kempler y Kabaluk, 1996). La carencia de semillas, cutícula delgada, así como el aroma y gusto de su fruto (Robles et al., 2016), facilitan la elaboración de jugos, mermeladas, dulces, jaleas, postres y frescos (Soria, 1997).

### ***Enfermedades del babaco causadas por virus***

La forma de propagación vegetativa por estacas da lugar al aumento de problemas fitopatológicos (Robles et al., 2016), causados por bacterias, virus, nemátodos, ácaros, áfidos (Soria, 1997) y hongos (Jadán y Dorca, 2019).

#### **Virus del mosaico de la papaya**

Es un virus de ARN, perteneciente al género *Potexvirus*, con un rango amplio de hospederos. Las plantas enfermas son de tamaño reducido con hojas cortas (Robles et al., 2016).

#### **Virus del mosaico del babaco (BabMV)**

Las partículas tienen forma de filamento y guardan relación con el *Papaya mosaic virus*, *Althernantera mosaic virus* y *Senna mosaic virus*, presentando un mosaico moderado (Alvarez Q. et al., 2017).

En campo el ataque vírico se puede controlar al seleccionar plantas madre sanas, emplear plantas obtenidas por propagación meristemática y por medio de la erradicación de plantas enfermas (Viteri D., 1992). El riesgo de estas enfermedades también puede disminuir al implementar métodos de propagación *in vitro* (Scheldeman et al., 2002).

## **Generalidades de virus en plantas**

Los virus de plantas están constituidos por ácidos nucleicos que contienen la información necesaria para su infección, rodeados por una capa de proteínas denominada cápside (Pearson, 2017). El 80% de virus de plantas corresponden a virus de ARN de cadena simple de sentido positivo, el porcentaje restante se distribuye entre virus de ARN de cadena doble o monocatenarios de sentido negativo (Lewsey y Carr, 2019).

La carencia de los principios biológicos básicos de los virus como homeostasis, regulación, funciones metabólicas, respuesta a estímulos, replicación y adaptación, no permite clasificarlos como seres vivos, en efecto se encuentran en el límite entre lo vivo y lo inerte (Hong y Ju, 2017). La replicación vírica se puede resumir en desensamblaje de las partículas víricas, traducción del genoma, modificaciones de la membrana celular, formación del complejo de replicación viral (en el caso de virus de RNA de cadena positiva), encapsulación del genoma, movimiento de las partículas viral entre células y a largas distancias a través de la planta. Para que este proceso se pueda llevar a cabo el virus manipula las rutas metabólicas y los componentes celulares del huésped (Wang, 2015).

El carácter sésil de las plantas ha provocado que los virus se valgan de vectores específicos para su propagación (Wang y Zhou, 2016), tales como insectos, artrópodos, nemátodos y hongos (Sanfaçon, 2017). Sin embargo, este no es el único factor ecológico que determina el comportamiento de los virus, el rango de hospederos, sintomatología, tropismo tisular y modos de transmisión también influyen en su interacción con el medio (Aranda y Freitas-Astúa, 2017).

La caracterización e identificación de los virus en plantas frutales puede dificultarse por la baja concentración e irregularidad en su distribución, infecciones mixtas, ausencia de sintomatología o fluctuación de síntomas dependiendo de la temporada (Maliogka et al., 2018).

Actualmente el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la microscopía electrónica son los métodos preferidos para este fin (Nicolaisen, 2011).

### **Caracterización del género *Cheravirus***

El género *Cheravirus* pertenece al orden *Picornavirales* (James y Upton, 2002) y a la familia *Secoviridae* (Thompson et al., 2004). Poseen partículas isométricas de aproximadamente 26 nm de diámetro (Adams et al., 2013) con un número de pseudo-triangulación igual a 3 (Sanfaçon et al., 2009). Los miembros del género tienen un genoma bipartito de cadena simple de ARN encapsulada en tres proteínas de la cápside (Kon y Yoshikawa, 2014). Hasta la fecha se ha reportado la existencia de 5 especies de *Cheravirus*; *Apple latent spherical virus*, *Arracacha virus B*, *Cherry rasp leaf virus*, *Currant latent virus* y *Stocky prune virus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019).

El genoma de las especies pertenecientes al género *Cheravirus* están compuestos por dos moléculas de ARN. El ARN-1 tiene un tamaño aproximado de 7 kb y codifica una poliproteína que da lugar a cinco proteínas maduras: un cofactor de proteasa (C-Pro), una helicasa (Hel), una proteasa de serina (Pro), una proteína viral ligada al genoma (VPg) y una ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp). El ARN-2 tiene una longitud de 3.3 kb y codifica a una poliproteína que escinde en cuatro proteínas: una proteína de movimiento (MP) y tres proteínas de la cápside (CPs) de 20, 22 y 25 kDa (Adams et al., 2013).

La evidencia experimental ha demostrado que miembros del género *Cheravirus* se movilizan entre células a través de estructuras tubulares (Sanfaçon et al., 2009). Su rango de hospederos varía dependiendo el virus e incluye maleza alemana a cultivos infectados (Nyland et al., 1969). CRLV es transmitido por nemátodos del género *Xiphinema sp.* (James y Upton, 2002)

y semillas infectadas (Hansen et al., 1974). Generalmente las infecciones de ALSV son asintomáticas

### **Transmisión de virus**

En algunos casos los fitovirus ingresan a la cutícula del hospedero por medio de laceraciones, provocados por los organismos que los transportan (transmisión horizontal). En otros casos los virus son transmitidos de forma vertical por semillas o mediante material vegetativo proveniente de una planta madre infectada (Walkey, 1991); (Fermin, 2018). La transmisión de virus por medio de semillas se produce a través del embrión o de otros tejidos como la cubierta (Kamada et al., 2018). Los miembros de la familia *Secoviridae* son transmitidos por medio de inoculación mecánica, vectores que incluyen insectos o nemátodos y mediante semillas o polen (Fermin, 2018).

### ***Transmisión vírica por injerto***

La propagación vegetativa por injerto tiene un rol ambiguo, por un lado contribuye a la dispersión de enfermedades pero por otro esta técnica se usa en el control de plagas (Goldschmidt, 2014). Los virus adquiridos a través de reproducción asexual persisten de manera perenne, a pesar de que estos no coloniza toda la planta en la primera etapa de desarrollo (Hull, 2014). La transmisión tiene lugar a pesar de que el material vegetal injertado no sea compatible o fisiológicamente funcional (Goldschmidt, 2014).

### ***Nemátodos como vectores víricos***

La primera evidencia de un nemátodo como posible vector de virus, fue reportada por el equipo de investigación de Loewenberg, mediante microscopía electrónica observaron partículas como virus (VLPs) en nemátodos, los mismos que fueron encontrados en nódulos de raíces de plantas infectadas (Schoelz y Stewart, 2018). Para establecer la sinergia entre nemátodos y virus se debe tener en cuenta los siguientes criterios; a) demostrar la infección de

la planta de estudio, b) realizar ensayos con nemátodos recolectados de forma manual, c) incluir controles que contrasten al nemátodo como vector inequívoco, d) el nemátodo debe estar identificado y e) el virus caracterizado (Brown, Ploeg, et al., 1995). Las investigaciones que buscan dilucidar esta interacción se ven obstaculizadas principalmente por el habitat, comportamiento alimentario y condiciones de cultivo de los nemátodos (Syller, 2014).

Se considera que la transmisión de virus por nemátodos es de carácter no circulatorio ya que no se ha encontrado evidencia de que exista multiplicación vírica dentro del mismo (Walkey, 1991). Tanto *Nepovirus* como *Tobravirus* son transmitidos por nemátodos (Harrison, 1977). Cabe destacar que el vector de las especies del género *Tobravirus* es un nemátodo, pero que solo un tercio de los *Nepovirus* se transmite por medio de este vector (Hull, 2014). La moléculas de ARN-2 de los *Nepovirus* es la que interacciona con el nemátodo permitiendo su transmisibilidad (Brown, Robertson, et al., 1995). Los nemátodos ectoparasíticos capaces de realizar este proceso pertenecen a las familias: Longidoridae (Dorylaimida; género *Longidorus* y *Xiphinema*) y Trichodoridae (Triplonchida; género *Thichodorus* y *Paratrichodorus*) (Syller, 2014). Los géneros *Longidorus* y *Xiphinema* son transmisores de *Nepovirus* y los género *Trichodorus* y *Paratrichodorus* son transmisores de *Tobravirus* (Harrison, 1977).

La infección se realiza mediante el estilete, pudiéndose acumular partículas víricas en el animal (Fermin, 2018). Las partículas permanecen en el interior del nemátodo durante meses o años, pero se pierden en la muda, su liberación esta sujeta a cambios de pH producidos por el flujo de saliva durante su alimentación (Hull, 2002). Las células aledañas que no estuvieron en contacto directo con el estilete del nemátodo, manifiestan granulaciones en el citoplasma o núcleos y nucleolos atrofiados (Palomares et al., 2017). A pesar de que se detecten partículas víricas en el aparato digestivo de un nemátodo, esto no significa que las transmita (Hull, 2014).

En Ecuador se ha detectado la presencia de *Xiphinema* sp. en raíces de carrizo, cebada, fréjol, maíz, mandarina, naranjilla, hobos, papa, pimienta, piretro, tomate de árbol, tomate y yuca (Eguiguren y Défaz T., 1992).

### **Métodos de detección y diagnóstico**

La importancia de la identificación viral radica en que las enfermedades causadas por fitovirus pueden ser confundidas con el estrés ambiental al que es sometida la planta o con la presencia de otros patógenos ya que la sintomatología puede ser similar, en otros casos las enfermedades son asintomáticas y por lo tanto no pueden ser visualizadas (Yadav y Khurana, 2016); (Jeong et al., 2014). Los métodos de detección y diagnóstico de enfermedades en cultivos se clasifican en directos (técnicas serológicas y moleculares) e indirectos (cambios morfológicos en la planta infectada) (Fang y Ramasamy, 2015).

Las tecnologías frecuentemente utilizadas para la detección de patógenos son aquellas basadas en principios bioquímicos, entre las que destacan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación molecular y secuenciación de alto rendimiento (HTS). Las dos primeras son las más implementadas en los laboratorios debido a su alta sensibilidad (capacidad de detectar el agente infeccioso sin obtener falsos positivos o negativos), alta especificidad (número mínimo de patógenos detectados en un ensayo) y bajo costo, no obstante, en los últimos años la secuenciación está teniendo mayor impacto en la caracterización de nuevos virus (Pallás et al., 2018); (López et al., 2003).

Entre los desafíos que presenta la caracterización de virus destaca la baja carga viral, la distribución desigual del virus en la planta, la aparición de infecciones mixtas en plantas individuales, las infecciones asintomáticas o sintomatología fluctuante dependiendo de la temporada y la naturaleza heterogénea y compleja del viroma de la planta (Maliogka et al., 2018).

### ***Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)***

La reacción en cadena de la polimerasa relaciona secuencias de géneros y familias con el genoma del virus diana (Yadav y Khurana, 2016), objetivo que se consigue al diseñar oligonucleótidos y sondas específicas (Martinelli et al., 2015). El éxito del proceso recae en la eficacia de la extracción del material genético, que tiene que estar libre de inhibidores (López et al., 2003), en la actividad de la enzima (polimerasa), en la solución tampón y en la concentración de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) (Fang y Ramasamy, 2015).

La RT-PCR se caracteriza por ser un proceso rápido, específico y rentable para la detección de virus de ARN (Xu et al., 2017). El proceso consiste en obtener ADN complementario (cDNA) a partir del ARN genómico usando hexámeros generados al azar y la enzima transcriptasa inversa, estos productos se amplifican por PCR implementando primers complementarios a la región de interés (Li y Hartung, 2007). La detección vírica puede dificultarse en algunos casos por la falta de genes distintivos que puedan ser comparados con ensayos realizados con anterioridad mediante PCR o RT-PCR (Roossinck, 2019).

### ***Secuenciación de siguiente generación***

La secuenciación de siguiente generación hace posible la detección de todos los patógenos desconocidos que puedan estar invadiendo la planta de estudio, en especial en ausencia de sintomatología (Jones et al., 2017), lo que permite la detección y caracterización de nuevos virus presentes tanto en hospederos como en potenciales vectores (Hadidi et al., 2016).

Los pasos para la preparación de la muestra incluyen: extracción del ácido nucleico, fragmentación de la secuencia, enriquecimiento del ARN viral y preparación de bibliotecas (Maliogka et al., 2018). Desde 2009 la secuenciación de ARN se ha hecho a partir de la extracción de diferentes tipos de ARN entre los que figuran: ARN total (totRNA), ARN ribosomal

(rRNA), ARN de doble cadena (dsRNA), virus derivados de ARN pequeño de interferencia (sRNA), ARN de partículas virales y RNA poliadenilado (poly(A) RNA) (Pecman et al., 2017).

### **Análisis Filogenéticos**

La filogenética se basa en la comparación de las variaciones de segmentos homólogos de los diversos clados (Haubold, 2013); (Sleator, 2013). Los análisis filogenéticos contribuyen a la comprensión de cómo los procesos de mutación, recombinación, deriva genética y diversidad genética se relacionan con la evolución de los fitovirus (Pagán, 2018), esto se consigue al implementar diagramas hipotéticos que representan relaciones evolutivas entre organismos denominados árboles filogenéticos (Sleator, 2013). Básicamente los análisis filogenéticos constan de cuatro pasos: i) alineamiento de secuencias, ii) determinar el modelo de sustitución; iii) construir el árbol; y iv) evaluar el árbol (Brinkman y Leipe, 2001).

### **Hipótesis**

**H<sub>0</sub>:** Nemátodos del género *Xiphinema* no son vectores del nuevo *Cheravirus* encontrado en los cultivos de invernaderos comerciales de babaco de las zonas muestreadas de Tungurahua y Azuay.

**H<sub>1</sub>:** Nemátodos del género *Xiphinema* son vectores del nuevo *Cheravirus* encontrado en los cultivos de invernaderos comerciales de babaco de las zonas muestreadas de Tungurahua y Azuay.

## **Capítulo III: Materiales y métodos**

### **Caracterización del virus a nivel genómico**

La determinación del genoma del virus se realizó a partir de una planta mantenida bajo condiciones de invernadero en el Centro de investigaciones Biotecnológicas del Ecuador - CIBE. La secuenciación se realizó a partir de ARN total según se explica en el siguiente apartado.

### ***Extracción de ARN total***

Se colocó aproximadamente 100 mg de tejido vegetal en tubos de 2 mL con rulimanes estériles en un molino mezclador a 23 ciclos/s a dos tiempos durante 45 s. Se agregó 1,5 mL de buffer de extracción por muestra y se homogeneizó. La mezcla fue centrifugada a 3000 rpm por 2 min. Se añadió 650  $\mu$ L de acetato de potasio 6M y 650  $\mu$ L del sobrenadante en nuevos tubos de 2mL y se mezcló varias veces. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. En nuevos tubos de 1,5 mL se agregó 750  $\mu$ L de isopropanol y 750  $\mu$ L del sobrenadante evitando tomar la fase superior e inferior. Se centrifugó a 13000 rpm por 30 min. El sobrenadante fue eliminado y se agregó 750  $\mu$ L de Wash Buffer y 25  $\mu$ L de sílica por muestra, se mezcló en un vortex hasta obtener un color homogéneo. La mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 30 s y el sobrenadante eliminado. Se lavó por una segunda ocasión con 750  $\mu$ L de Wash Buffer y mezclado mediante vortex. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 3 min y el sobrenadante eliminado. El pellet fue secado al vacío durante 15 min. Se agregaron 80  $\mu$ L de agua pura a las muestras y nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Finalmente se transfirieron 50  $\mu$ L del sobrenadante a nuevos tubos, evitando tomar la sílica. El procedimiento detallado se basa en el trabajo de Halgren et al. (2007).

### ***Secuenciación de siguiente generación***

La secuenciación fue realizada por la empresa ©MacroGen Inc., a través de la plataforma Illumina. Para enriquecer el ARN viral, el ARN ribosómico fue removido usando RiboZero de Illumina. El ARN enriquecido fue utilizado para generar una biblioteca de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit ARN True Seq de Illumina. Las lecturas obtenidas a partir de la secuenciación se procesaron usando herramientas bioinformáticas libres (*pipelines*) para el ensamblaje de los contigs.

## Detección de Chervavirus

### *Obtención de muestras de material vegetal*

Se recolectaron hojas jóvenes de 20 plantas de babaco por cada huerto visitado de las provincias de Azuay (Cantón Paute) y Tungurahua (Cantones Baños, Patate y Pelileo), el muestreo fue realizado a manera de zigzag y las hojas fueron transportadas en bolsas de plástico dentro de una hielera y almacenadas a 4°C hasta su análisis.

### *Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)*

La RT-PCR se realizó a partir de ARN total extraído, usando la metodología anteriormente detallada, empleando la enzima Transcriptasa reversa RevertAid® de Thermo Scientific™. A continuación se detalla la cantidad de cada reactivo y el programa implementado para el proceso:

**Tabla 1**

*Cantidades empleadas para la preparación del master mix para la RT-PCR*

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen por Reacción [μL]</b>
Agua DEPC	7,95
Buffer 5X	3
DTT	0,75
Hexámeros al azar	0,6
dNTP's	0,6
Enzima RT	0,1
<b>Volumen total</b>	<b>13</b>

*Nota.* Información proporcionada por el equipo de investigación del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador-CIBE del Programa de Virología.

**Tabla 2**

*Condiciones del programa de RT-PCR para la detección de Babaco chervavirus-1*

<b>Fases</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Hibridación	25°	5 min
Extensión	47°	60 min

Fases	Temperatura	Tiempo
Desactivación enzimática	80°	8 min

*Nota.* Información proporcionada por el equipo de investigación del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador-CIBE del Programa de Virología.

Se agregó 2 µL de ARN por muestra, con lo que se obtuvo un volumen final de 15 µL.

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

La PCR se realizó a partir de 2 µL de ADNc por muestra, obtenido en el paso anterior, en este paso se usó la Taq DNA polimerasa de GenScript. A continuación se detalla la información de los reactivos y programa implementado para el proceso:

**Tabla 3**

*Primers empleados para la detección de Cheravirus en hojas de babaco*

Forward	Reverse	Temperatura de Anneling [°C]	Producto de Amplificación
GCTTGTCATTAGCACGGCTAAC	GCAGGAAAGAGCGTCTGATCA	55-57	447

*Nota.* Información recuperada del estudio realizado por Cornejo-Franco et al. (2020).

**Tabla 4**

*Cantidades empleadas para la preparación del master mix para la PCR*

Reactivo	Volumen por Reacción [µL]
Agua	6,275
Buffer 10X	1
Primer Forward	0,2
Primer Reverse	0,2
dNTP's	0,25
Enzima Taq polimerasa	0,075
<b>Volumen total</b>	<b>8</b>

*Nota.* Información proporcionada por el equipo de investigación del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador-CIBE del Programa de Virología.

**Tabla 5***Condiciones del programa de PCR para la detección de Babaco cheravirus-1*

<b>Fases</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95°	5 min	1
Desnaturalización	95°	30 s	
Alineamiento	55°	30 s	40
Extensión	72°	1 min	
Extensión final	72°	5 min	1

*Nota.* Información proporcionada por el equipo de investigación del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador-CIBE del Programa de Virología.

Para la visualización de resultados se usó 8 µL de SYBR Safe en un gel compuesto por 1,6 g de agarosa disueltos en 80 mL de buffer TAE 1X. La cámara de electroforesis fue programada a 90 V por 35 min.

#### **Análisis bioinformático**

##### ***Análisis de la secuencia***

Los dominios de la secuencia query MN648671 del Babaco cheravirus-1 (BabChV-1) se determinaron mediante el software online ScanProsite y se comprobó los resultados obtenidos con el software InterProScan y Conserved Domain Database (CCD) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se realizó un SMART BLAST con la secuencia de la poliproteína y con las secuencias de los dominios encontrados para determinar la similitud existente entre el BabChV-1 y otras especies del género *Cheravirus*.

##### ***Construcción de árbol filogenético***

El árbol filogenético se construyó al realizar un alineamiento múltiple por ClustalW de las secuencias de la poliproteína del ARN-1, obtenidas del Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de miembros representativos de la familia *Secoviridae* usando el modelo de Neighbor-

joining con un soporte de bootstrap de 1000 repeticiones, sin modificar los parámetros provistos por default, mediante el software MEGA-X.

## **Evaluación del rol de nemátodos en la transmisión del nuevo virus**

### ***Obtención de muestras de suelo***

Se recolectaron muestras de suelo de 5 plantas de babaco por cada huerto visitado de las provincias de Azuay (Cantón Paute) y Tungurahua (Cantones Baños, Patate y Pelileo), las muestras fueron tomadas de una planta de cada esquina y del centro del huerto. La recolección se hizo en base a los protocolos descritos por University of Florida (2019), para lo cual se empleó un barreno cilíndrico y bolsas plásticas. Se descartó la primera porción de tierra extraída ya que la parte superficial de suelo contiene una baja cantidad de nemátodos. La muestra fue recolectada a una profundidad aproximada de entre 20 a 30 cm, sección en la que se encuentra el nemátodo de interés. Se almacenaron las muestras en refrigeración a una temperatura aproximada de 4°C hasta su análisis.

### ***Extracción de nemátodos fitoparásitos (*Xiphinema*) por centrifugación en azúcar***

Las muestras fueron procesadas en base a la metodología sugerida en la guía de Van Bezooijen (2006): el proceso descrito a continuación requiere la preparación previa de una solución azucarada, para lo cual se debe diluir 454 g de azúcar en un litro de agua, se recomienda emplear agua caliente para acelerar el proceso y empezar la extracción una vez la solución se haya enfriado. En un vaso de precipitación de 100 mL fueron colocados 100 cm<sup>3</sup> de suelo, esta cantidad de suelo se colocó sobre un colador que se encontraba sobre un recipiente de 2L, el contenido del colador se lavó con un chorro de agua potable y se llenó el recipiente con agua hasta alcanzar un volumen de 650 mL, se retiró el colador y se descartó las rocas y materiales de gran tamaño. Se removió la solución y se dejó precipitar por casi 15 s. El líquido obtenido se vertió a través de un tamiz de malla 400. Se enjuagó con agua del grifo,

manteniendo el tamiz inclinado, dando golpes suaves al costado del tamiz para que el agua caiga. Las partículas retenidas en la malla fueron recolectadas con ayuda de una piseta con agua y la solución obtenida se vertió sobre un embudo de rama corto de 50 mm colocado sobre un tubo de 50 mL. El embudo se enjuagó suavemente con la piseta. Se retiró el embudo y el contenido del tubo fue centrifugado a 3500 rpm por 3 min. Se descartó el sobrenadante y sobre el pellet se vertió la solución azucarada hasta alcanzar la máxima capacidad del tubo, con ayuda de una espátula se rompió el pellet para dejar las partículas de tierra en suspensión, este paso debe realizarse sin aplicar demasiada fuerza. El tubo se centrifugó a las mismas condiciones y se vertió el centrifugado sobre un tamiz de malla 500. Las partículas retenidas fueron enjuagadas con agua para eliminar la solución azucarada, el tamiz tiene que encontrarse inclinado y se debe cuidar que el agua no rebose y se pierdan las partículas. En un tubo de 50 mL nuevo colocado debajo del embudo de vidrio lavado previamente, se colectó el producto retenido en el tamiz con ayuda de una piseta, esta vez cuidando que el volumen obtenido no sobrepase los 10 mL del tubo con el fin de que la muestra quepa en una caja Petri para el conteo e identificación de nemátodos. Si la identificación no se realizaba de forma inmediata o si iba a ser analizada nuevamente, la muestra se mantenía en refrigeración a 5°C.

### ***Identificación de nemátodos***

La solución de extracción de nemátodos se colocó en una caja Petri de plástico de dimensiones 35 x 10 mm y se observó mediante un microscopio óptico, empleando los objetivos 10X y 40X. Los diferentes géneros fueron identificados mediante claves taxonómicas, descritas en la guía de Mengistu et al. (2012).

### ***Multiplificación de plantas por injerto***

Se incrementó el número de plantas infectadas con BabChV-1 para los ensayos de determinación de vector biológico a través del método de transmisión de virus por injerto del

tipo hendidura terminal. Se realizaron cortes transversales tanto en el injerto (yemas de plantas de babaco positivas para el virus) como en el patrón (plantas de papaya) de plantas de diámetro similar. Primero se retiraron las ramas y hojas cercanas al punto de injerto. Luego se hizo un corte vertical en la parte central de la base del patrón y un corte doble en forma de bisel en la base del injerto. Finalmente se insertó el injerto en el patrón y se recubrió el punto de unión con cinta parafilm. El procedimiento se realizó en base a la metodología descrita por Dijkstra y de Jager (1998a).

#### **Capítulo IV: Resultados**

Parte de los resultados detallados en esta sección se basan en investigaciones previas sobre el *Cheravirus* de babaco y en estudios de miembros del género *Cheravirus* ya que la pandemia impidió que todos los ensayos propuestos puedan llevarse a cabo.

##### **Análisis molecular**

###### ***Secuenciación parcial del genoma de BabChV-1***

El proceso de secuenciación originó alrededor de 35 millones de fragmentos (reads) en bruto, cerca de 800 mil reads permitieron la formación 6 contigs, uno de los contigs generados presentó una longitud de 6806 nucleótidos que mostró similitud con el ARN- 1 del *Apple latent spherical virus* del género *Cheravirus* al analizarlo en el programa informático de alineamiento local BLAST. El número de acceso de esta secuencia es MN648671. El fragmento de ARN-2 no pudo ser detectado (Cornejo-Franco et al., 2020).

###### ***Detección de BabChV-1 en muestras de babaco recolectadas en las provincias de Azuay y***

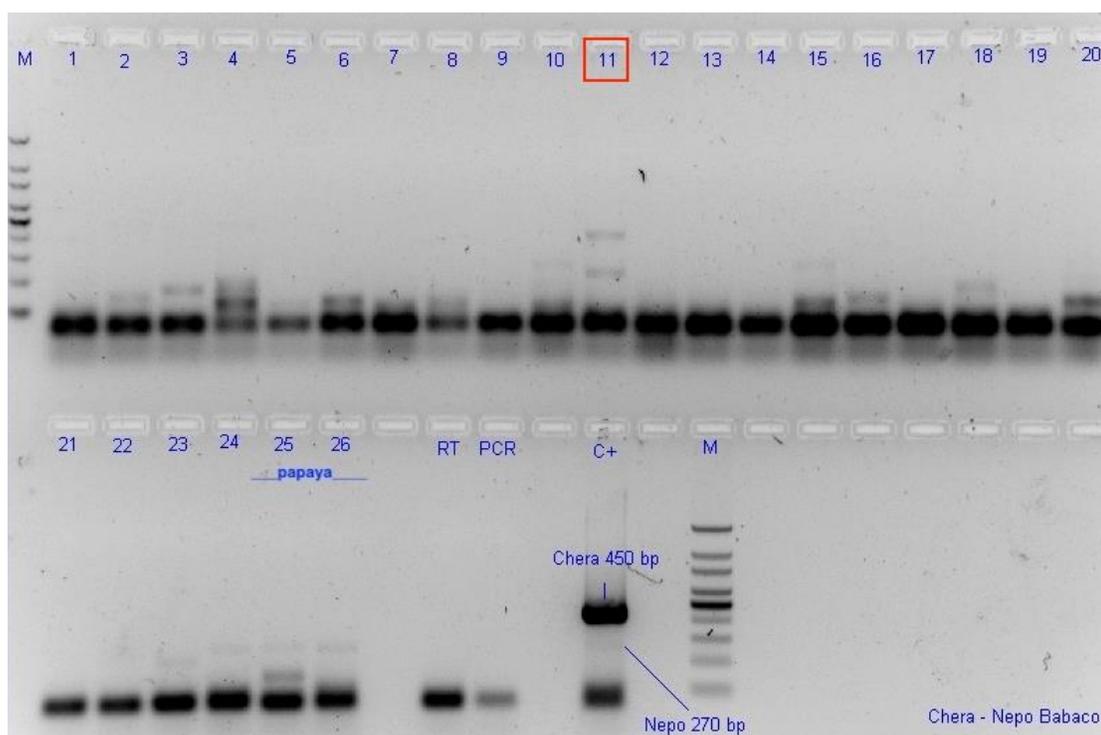
###### ***Tungurahua***

Una de las muestras recolectadas en la parroquia de Paute (muestra 11) dio positivo para BabChV-1 (Figura 1), presentando una banda de 447 pb. Las muestras tomadas en la provincia de Tungurahua, representadas en la Figura 2 dieron negativas para el nuevo

*Cheravirus*, sin embargo, estas muestras presentaron dos bandas inespecíficas en casi todos los carriles; una banda con un tamaño de 600 a 800 pb y otra comprendida entre 300 y 400 pb. Estas bandas pueden representar fragmentos de ARN de la planta, lo que puede deberse a la alta concentración del ARN total extraído.

### Figura 1

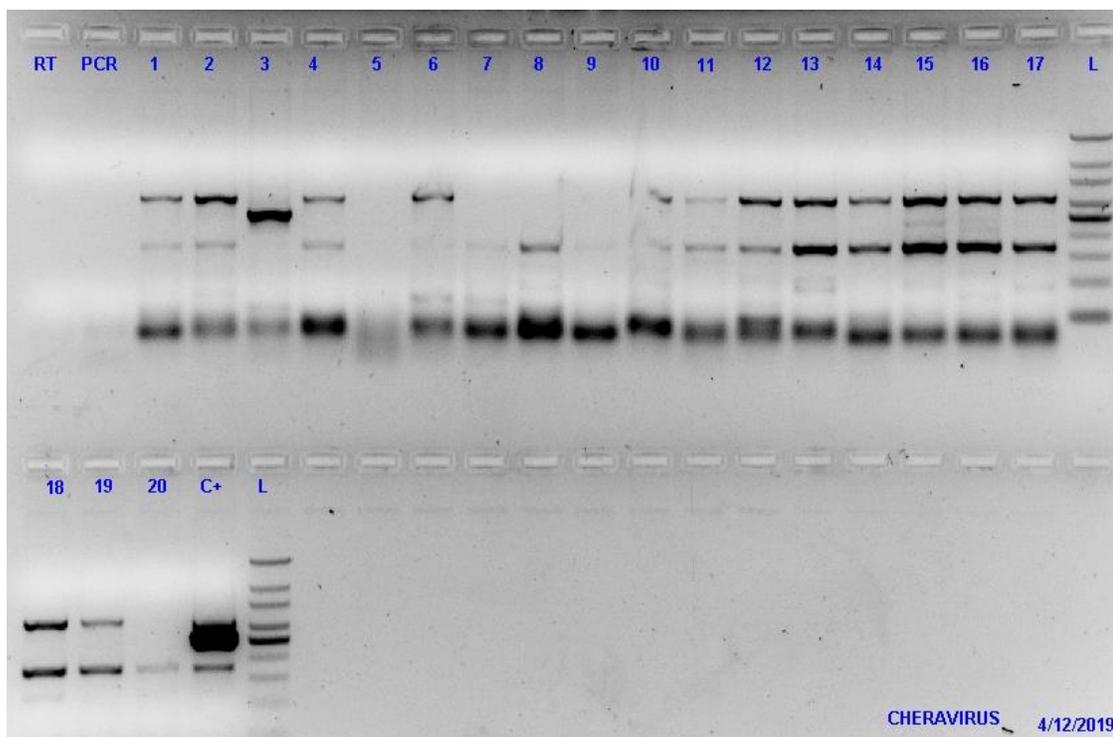
*Visualización de productos de PCR de BabChV-1 de las muestras recolectadas en Paute.*



*Nota.* La fotografía muestra el resultado de la reacción de la polimerasa de 24 hojas de babaco tomadas de un invernadero comercial del cantón Paute. M: marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder de GenScript); C+: control positivo (ADNc obtenido de las plantas de babaco mantenidas en el invernadero del CIBE); RT: master mix de la reacción de RT-PCR sin ácidos nucleicos; PCR: master mix de la reacción de PCR sin ácidos nucleicos. Imagen proporcionada por el equipo de investigación del Programa de Virología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIBE).

**Figura 2**

*Visualización de productos de PCR de BabChV-1 de las muestras recolectadas en la provincia de Tungurahua*



*Nota.* La fotografía muestra el resultado de la reacción de la polimerasa de 20 hojas de babaco tomadas de un invernadero comercial de la provincia de Tungurahua. L: marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder de GenScript); C+: control positivo (ADNc obtenido de las plantas de babaco mantenidas en el invernadero del CIBE); RT: master mix de la reacción de RT-PCR sin ácidos nucleicos; PCR: master mix de la reacción de PCR sin ácidos nucleicos. Imagen proporcionada por el equipo de investigación del Programa de Virología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIBE).

## Análisis bioinformático

### Comparación de ARN-1 de BabChV-1 con otros miembros del género *Cheravirus*

La secuencia de ARN 1 de virus BabChV-1 presenta un porcentaje de identidad del 69,67% con la poliproteína homóloga del virus *Apple latent spherical virus* (Tabla 6). Todos los virus pertenecientes al género *Cheravirus* presentan un porcentaje de homología con el nuevo virus del babaco a excepción de la especie *Stocky prune virus* (StPV). Adicionalmente, la secuencia query tiene un porcentaje de identidad del 31,61% con la especie *Maize chlorotic dwarf virus*, perteneciente a la familia *Secoviridae* miembro del género *Waikavirus*.

**Tabla 6**

Resultados del análisis SMART BLAST de la poliproteína del segmento ARN-1

Secuencia homóloga	Número de acceso	% de cobertura	% de identidad
<i>Apple latent spherical virus</i>	NP_620568.1	95%	69,67%
<i>Cherry rasp leaf virus</i>	ANC51274.1	99%	66,10%
<i>Currant latent virus</i>	YP_009220374.1	99%	59,05%
<i>Arracacha virus B</i>	YP_007697622.1	80%	34,34%
<i>Maize chlorotic dwarf virus</i>	AAV86083.1	36%	31,61%

La secuencia de ARN-1 de BabChV-1 presenta 3 dominios: ARN helicasa; 3C cisteína proteasa y un dominio de la enzima transcriptasa inversa. La Tabla 7 muestra que los dominios comparados presentan un alto porcentaje de identidad con el ARN-1 del virus *Apple latent spherical virus* y que al comparar los dominios del Arracacha virus B con BabChV-1 solo existe homología con el dominio de la enzima.

**Tabla 7**

*Porcentaje de identidad de los dominios encontrados en el segmento ARN-1 de BabChV-1 y otros miembros del género Cheravirus*

Dominio	Inicio	Final	Porcentaje de identidad con la secuencia			
			ALSV	CRLV	AVB	CuLV
ARN Helicasa	758	928	91,81%	83,63%	N.A.	74,27%
3C Cisteína Proteasa	1237	1448	74,18%	66,98%	N.A.	63,55%
Transcriptasa inversa	1729	1871	77,46%	76,76%	52,86%	75,52%

*Nota:* ALSV: Apple latent spherical virus; CRLV: Cherry rasp leaf virus; AVB: Arracacha virus B;

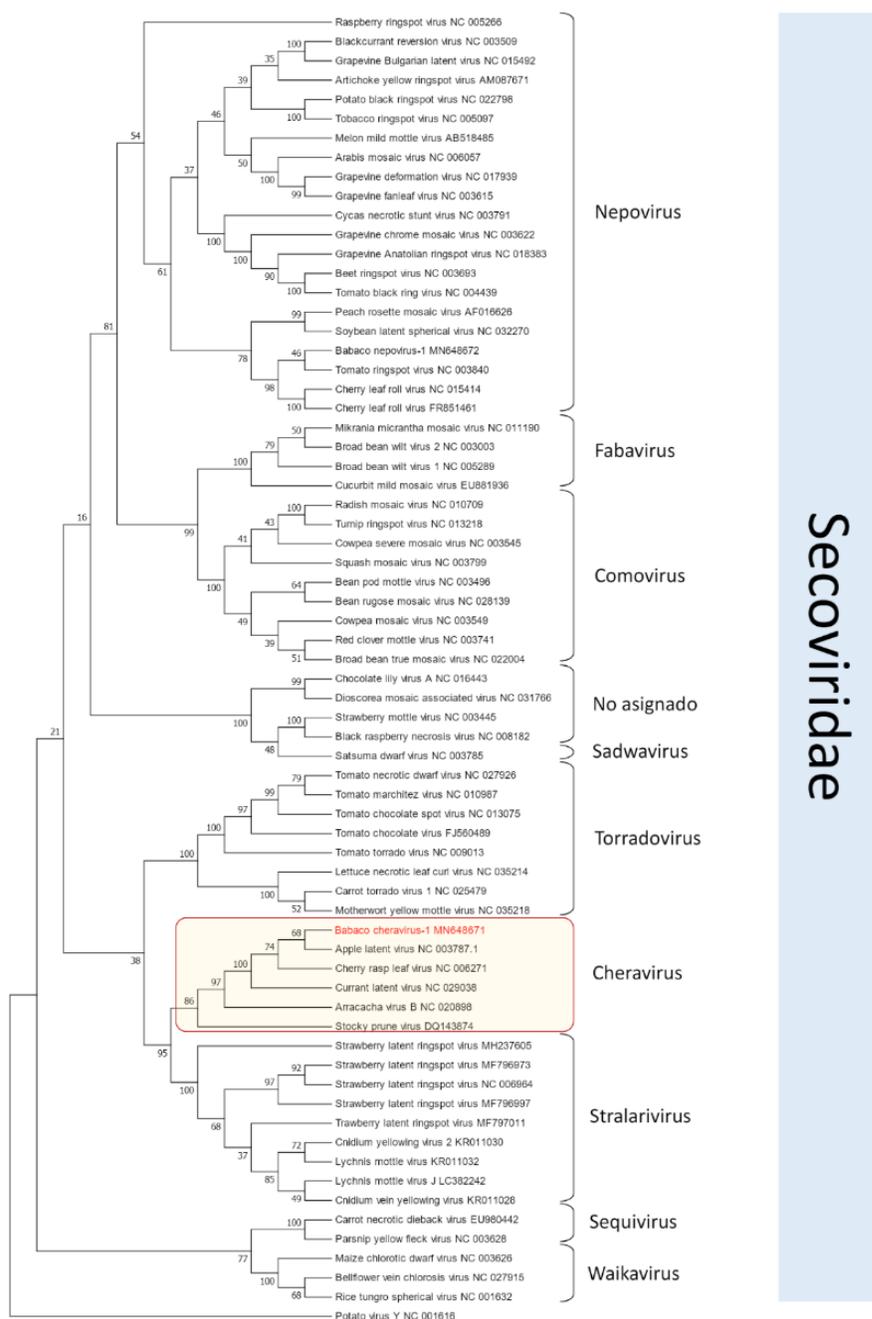
CuLV: Currant latent virus; NA: no aplica.

***Establecimiento de relaciones filogenéticas entre miembros de la familia Secoviridae y el nuevo Cheravirus encontrado en Babaco***

Los análisis filogenéticos de las secuencias de la poliproteína correspondiente al ARN-1 indican que BabChV-1 tiene una relación más cercana con ALSV y CRLV que con los otros miembros del género *Cheravirus*. La disposición de las ramas del árbol indica que el precursor de la poliproteína de StPV está distantemente relacionado con el virus del babaco y con los otros miembros del género.

Figura 3

Árbol de Neighbor-joining de los miembros representativos de la familia Secoviridae basada en las secuencias de la poliproteína del segmento ARN-1



*Nota:* El alineamiento de secuencias y el árbol se generaron a través del software MEGA-X. Se usó como outgroup al Potato virus Y (PVY) un miembro de la familia Potyviridae.

## **Análisis biológico**

### ***Identificación de nemátodos de las muestras de suelo recolectadas en las provincias de Azuay y Tungurahua***

Ninguna de las muestras recolectadas presentó nemátodos del género *Xiphinema*. No obstante, se encontraron nemátodos del género *Helicotylenchus* (conocido comúnmente como espiral), *Tylenchorhynchus* (stunt), *Trichodorus* (stubby root) y otros nemátodos de vida libre no identificados. Se pudo identificar estos organismos en base la forma de su estile, terminación de la cola, la posición que adoptaban al estar en reposo y su locomoción.

### ***Método propuesto para la evaluación de nemátodos como vectores víricos***

Se recomienda multiplicar plantas de babaco infectadas y no infectadas mediante el método de multiplicación por injerto. Los nemátodos requeridos para el ensayo no deben haber tenido contacto con plantas de babaco infectadas con el virus que se pretende caracterizar, lo que se podría contrastar con ensayos previos de RT-PCR de hojas de las plantas muestreadas. La recolección de suelo se podría realizar a 20, 30, 40, 50 y 60 cm de profundidad ya que se ha comprobado la presencia de nemátodos del género *Xiphinema* a estas condiciones. Una vez realizada la extracción, identificación y conteo de nemátodos (procedimientos detallados en la sección de metodología), se los debe recolectar de forma individual con una micropipeta, del total de nemátodos recuperados se recomienda separar de 10 a 15 especímenes para comprobar que estén libres de partículas víricas, lo cual se consigue mediante ensayos de inmunoadsorción-microscopía electrónica (ISEM) o RT-PCR empleando los primers diseñados para la detección de BabChV-1. La cantidad restante de nemátodos será empleada en la inoculación de plantas de babaco y plantas cebo. En este caso la planta cebo ayudará a la propagación de nemátodos, se sugiere el uso de petunia o maíz, sembradas en una mezcla estéril de suelo y arena. Luego de 3 o 4 semanas se extraerían los nemátodos de la tierra que

contenía a las plantas cebo, se contaría la cantidad de nemátodos recuperados y se separaría de 10 a 15 nemátodos para verificar que estén libres de virus. Los nemátodos restantes se inocularían en las plantas de babaco que hayan dado positivas para BabChV-1. Transcurridas de 3 a 4 semanas se haría una extracción, identificación y conteo de los nemátodos contenidos en las plantas de babaco infectas para su posterior inoculación en plantas de babaco libres de virus. Después de otras 4 semanas se podría constatar si las plantas están o no infectadas al realizar pruebas de PCR tanto a las hojas de las plantas de babaco como a los nemátodos de la tierra que las contiene. Si los ensayos resultan ser positivos se podría concluir que el nemátodo es el vector biológico del virus. El procedimiento planteado se basa en la metodología descrita por Taylor y Brown (1997). Es importante mencionar que los nemátodos del género *Xiphinema* y *Longidorus* son persistentes, es decir, retienen las partículas víricas por largos periodos de tiempo antes de su transmisión por lo que se podría considerar un mayor tiempo de inoculación entre cada extracción (Walkey, 1991). Se podrían emplear los métodos descritos por Delpasand Khabbazi et al. (2017), Demangeat et al. (2004) y Finetti-Sialer y Ciancio (2005) para la extracción de ARN en nemátodos del género *Xiphinema* en caso de que se escoja determinar la presencia o ausencia de virus mediante RT-PCR.

Ensayos de transmisión de *Raspberry ringspot virus* (miembro de la familia *Secoviridae*) mediante *Longidorus macrosoma* (miembro de la familia *Longidoridae*) descritos por Brown et al. (1988), demuestran que de 30 nemátodos inoculados en la planta infectada se logró recuperar el 80% de los nemátodos después de 3 a 4 semanas de inoculación, se estimaba que el 20% de estos nemátodos se habían alimentado de las raíces de las plantas fuente, asumiendo que cada agalla observada había sido causada por un nemátodo, 32% ingirieron virus de los cuales el 55% retenía las partículas víricas en su aparato digestivo. Se recuperó el 70% de los nemátodos inoculados en las plantas cebo después de 4 semanas, de esta cantidad el 133% se

había alimentado de las raíces de las plantas cebo (se usó el mismo criterio anteriormente descrito), pero se estimó que solo el 5% de los nemátodos recobrados había transmitido partículas víricas.

***Reportes de Cherry rasp leaf virus (CRLV) asociados a la transmisión por Xiphinema spp.***

En Columbia Británica, provincia de Canadá, se encontraron nemátodos de la especie *Xiphinema americanum* en el suelo de árboles de cerezos infectados con *Cherry rasp leaf virus* (CRLV). Los ensayos realizados en este estudio determinaron que la población de nemátodos fue mayor en árboles de cerezo maduros (25 años) que en árboles jóvenes (1 año). Los nemátodos que resultaron ser virulentos fueron recuperados de las capas superficiales de suelo comprendidos entre 0 y 60 cm de profundidad. (Hansen et al., 1974).

En estados de la costa oeste de Estados Unidos y en Columbia Británica en Canadá se detectó la infección de CRLV en manzanos, cerezos y melocotoneros y en Quebec en frambuesos. En este estudio se reconoció a las especies *X. americanum*, *X. californicum*, *X. rivesi* como vectores de CRLV (Brown et al., 1993).

Se realizaron experimentos para determinar si las poblaciones de nemátodos recolectadas en Pensilvania (USA), California (USA), Peachland (Canadá) y Columbia Británica (Canadá) transmitían 3 virus de la familia *Secoviridae* de norte américa incluyendo CRLV. Se estableció que las especies de nemátodos *X. americanum*, *X. californicum* y *X. rivesi* son capaces de transmitir el virus CRLV en *Chenopodium quinoa* (Brown et al., 1994).

En marzo de 2013 se recolectaron muestras de suelo de invernaderos de cerezo en Chelan County en el estado de Washington, estas plantas presentaban CRLV posiblemente transmitido por el *X. rivesi*. Cabe recalcar que en este reporte no se constató la interacción entre el virus y el vector, esta interacción se infirió en base a investigaciones previas ya que en el

reporte tan solo se determina el género de la población de nemátodos muestreada (Akinbade et al., 2014).

La bibliografía consultada hasta el final de la redacción del presente documento no presenta evidencias de que otros miembros del género *Cheravirus* sean transmitidos por nemátodos, sin embargo, no se descarta la probabilidad de que estos virus puedan tener un vector. Así mismo, se debe tomar en cuenta que los virus pueden ser transmitidos por más de un método.

### **Capítulo V: Discusión**

La propagación vegetativa permite la multiplicación de babaco debido a la naturaleza partenocárpica de sus frutos (Jadán y Dorca, 2019), no obstante, es un método favorable para la transmisión de virus de las plantas madre a su progenie (Desbiez et al., 2011). El buen manejo de un cultivo se logra a través del conocimiento de los patógenos que pueden infectarlo y su interacción con el ambiente (Aranda y Freitas-Astúa, 2017). Mediante la secuenciación masiva de cinco muestra tomadas de un vivero comercial de babaco localizado en la provincia de Azuay se detectó un nuevo virus perteneciente al género *Cheravirus* (Alvarez-Quinto et al., 2018), esta información permitió el diseño de primers para su detección por PCR, la construcción de un árbol filogenético para la determinar la relación del virus con otros ya reportados y la propuesta de ensayos de campo para la determinación de nemátodos como potenciales vectores del virus.

Se detectó BabChV-1 únicamente en las muestras tomadas en la provincia de Azuay, contrario a lo presentado por Cornejo-Franco et al. (2020) que reporta un porcentaje de ocurrencia del 4% en viveros de Paute, 10% en huertos de producción de Patate y 6% en plantas silvestres de Saraguro, es decir, la provincia de Tungurahua presenta incidencia del virus, a pesar de que esto no se ve reflejado en el presente estudio.

La secuenciación masiva del material vegetal de las plantas de babaco permitió dilucidar solo uno de los segmentos del nuevo *Cheravirus*, la molécula de ARN-1 que codifica para una poliproteína que se escinde para dar lugar a cinco proteínas maduras (Adams et al., 2013). Según Cornejo-Franco et al. (2020) esto se puede deber a que la baja concentración de virus no permite la detección completa de su genoma por secuenciación de alto rendimiento, más aun se debe considerar que la distribución vírica no es igual en toda la planta, varía con el tiempo, la posición y la edad de las hojas (Lacroix et al., 2016). Adicionalmente, se debería considerar que se ha demostrado que virus de los géneros *Comovirus* y *Nepovirus*, pertenecientes a la familia *Secoviridae*, pueden replicarse en células individuales en ausencia del segmento ARN-2 debido a que la información necesaria para la replicación está contenida en la molécula de ARN-1 (Thompson et al., 2017). Dada la forma de multiplicación de la planta y la relación evolutiva que BabChV-1 comparte con *Comovirus* y *Nepovirus* esta podría ser la causa por la cual no se obtiene la secuencia de ARN-2.

Los virus de plantas poseen más de un modo de transmisión, ya sea por polen, semillas o vectores (Hamelin et al., 2017). Los principales vectores son los insectos, pero los virus también pueden transmitirse por ácaros, nemátodos u hongos (Gallet et al., 2018). La información disponible hasta el momento señala al nemátodo *Xiphinema* como vector de *Cherry rasp leaf virus* (James y Upton, 2005). Por un lado, los estudios de caracterización de *Stocky prune virus* proponen que la distribución restringida del virus puede ser un indicio de su transmisión por nemátodos (Candresse et al., 2006), pero por otro lado los estudios de caracterización de *Currant latent virus* reportan que el virus circula en áfidos de la especie *Cryptomyzys ribis* ya que se encontraron partículas virales tanto en la cabeza como en el abdomen del insecto (Petrzik et al., 2015). Empero, no se ha validado de forma experimental los dos últimos estudios. Incluso, se conoce que el otro medio de transmisión reconocido en el

género *Cheravirus* es a través de semillas (Thompson et al., 2017), sin embargo, este no sería el caso del babaco. Otro posible medio de transmisión podría ser a través de la maleza aleada a los cultivos (Brown et al., 1993). La especificidad entre el nemátodo y el virus está conferida por las propiedades de las proteínas de la cápside que son codificadas por el segmento ARN-2 (Marmonier et al., 2010), de modo que si no se logra obtener la secuencia del segmento de ARN-2 de BabChV-1 no se podría concluir una interacción virus-vector. Posiblemente la planta madre que sirvió para la multiplicación de babaco en el vivero comercial de Azuay sea la que esté en contacto con nemátodos y ella sea el foco de infección.

Al igual que la mayoría de investigaciones, el presente estudio está sujeto a diferentes limitaciones. Para empezar la pandemia impidió cumplir con la planificación del trabajo de laboratorio, motivo por el cual la parte experimental no pudo llevarse a cabo en su totalidad y no se pudo realizar un nuevo muestreo en la provincia de Azuay donde se ha demostrado la presencia del virus de interés (Cornejo-Franco et al., 2020). Además, la falta de información sobre los patógenos que afectan las poblaciones de babaco y sobre el género del virus estudiado no permite llegar a conclusiones sólidas, esto posiblemente se debe a que las enfermedades causadas por estos virus no perjudican de forma significativa la producción agrícola de cultivos de interés como la papa (Adams et al., 2013), aunque la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal (EPPO) clasifique al *Arracacha B virus* y al *Cherry rasp leaf virus* en la lista A1 de especies de plagas que necesitan regulación como medidas cuarentenarias en países de Latinoamérica como Brasil, Argentina y Chile (EPPO, 2020). Pese a que las enfermedades causadas por estos patógenos no son de interés primario, se debe tener información básica y comprobada de las mismas, para poder aplicar regulaciones fitosanitarias óptimas. Por último, las condiciones del suelo muestreado no eran las propicias, ya que es recomendable muestrear cuando el suelo presenta la humedad adecuada y no se ha aplicado nematicidas 4 semanas

previas al muestreo (University of Florida, 2019), el suelo estaba árido cuando se recolectaron los nemátodos en la provincia de Tungurahua y no se tenía certeza del tiempo en el que se aplicó nematicidas en el cultivo. En general, los nemátodos del género *Xiphinema* se encuentran a profundidades mayores de 20 cm si el suelo está seco o la temporada es fría (Dijkstra y de Jager, 1998b).

La secuencia de la poliproteína del segmento de ARN-1 del nuevo *Cheravirus* encontrado en babaco tiene una alta similitud con *Apple latent spherical virus* y comparte un linaje evolutivo con miembros de la familia *Secoviridae*. Los experimentos realizados hasta el momento no permiten afirmar o negar al nemátodo *Xiphinema* como vector de BabChV-1, por lo que se requiere poner en marcha los ensayos de transmisión propuestos.

#### Capítulo VI: Conclusiones

- La secuenciación de las hojas jóvenes de babaco tomadas de la provincia de Azuay dio como resultado una secuencia de 6806 nucleótidos correspondientes al segmento de ARN-1 del nuevo *Cheravirus* de babaco que tiene un porcentaje del 69,67% de identidad con *Apple latent spherical virus* y 66,10% de identidad con *Cherry rasp leaf virus*.
- Se ha comprobado que los primers generados permiten la detección del *Cheravirus* en plantas de babaco.
- La evidencia que se tiene hasta el momento no ha permitido determinar la existencia o ausencia de la secuencia ARN-2 de BabChV-1 en las hojas de las plantas de babaco analizadas.
- Las hojas recolectadas para esta investigación en el cantón Paute en la provincia de Azuay mostraron una carga viral leve, mientras que el muestreo en los cantones Baños, Patate y Pelileo en la provincia de Tungurahua no dieron positivos para el *Cheravirus* de babaco.

- Los análisis filogenéticos demostraron que la secuencia de la poliproteína de BabChV-1 presenta similitud con los géneros comprendidos en la familia *Secoviridae*.
- Las muestras de la provincia de Tungurahua analizadas con los primers específicos para la detección del babaco cheravirus-1, dieron como resultado bandas inespecíficas y el suelo de estos viveros presentó nemátodos del género *Trichodorus*.
- En el suelo de las plantas que dieron positivas para *Cheravirus* no se encontraron indicios de nemátodos del género *Xiphinema*, se debe tomar en cuenta que los nemátodos pueden encontrarse a distintas profundidades, su población varía dependiendo de la época del año y las condiciones del ambiente, por lo cual no se puede descartar su rol como vector.

#### **Capítulo VII: Recomendaciones**

- Tomar muestras de suelo y hojas de plantas de babaco que no se encuentren en invernaderos.
- Realizar una secuenciación masiva de hojas de babaco de los cantones Pelileo, Baños y Patate para confirmar la presencia de virus del género *Tobravirus* y realizar ensayos de transmisión entre estos virus y nemátodos del género *Trichodorus*.
- Recolectar muestras de suelo de viveros comerciales de babaco tanto de las provincias de Azuay como Tungurahua para determinar qué especies de nemátodos se encuentran en el suelo, mediante secuenciación masiva.
- Tomar muestras de suelo a profundidades variables de 0 a 60 cm para determinar la densidad poblacional de nemátodos en diferentes estratos.
- Muestrear plantaciones de babaco en diferentes épocas del año con el fin de definir la carga viral y densidad poblacional de nemátodos a distintas condiciones.

- Tomar muestras no aéreas de plantas de babaco para conocer la distribución de *Cheravirus* en toda la planta.
- Probar métodos de transmisión mecánica para *Cheravirus* en plantas de babaco.
- Purificar BabChV-1 con el propósito de realizar futuros ensayos de sintomatología.

### Bibliografía

- Adams, I. P., Glover, R., Souza-Richards, R., Bennett, S., Hany, U., & Boonham, N. (2013). Complete genome sequence of arracacha virus B: a novel cheravirus. *Arch Virol*, 158(4), 909-913. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1546-x>
- Akinbade, S. A., Mojtahedi, H., Guerra, L., Eastwell, K., Villamor, D. E. V., Handoo, Z. A., & Skantar, A. M. (2014). First Report of *Xiphinema rivesi* (Nematoda, Longidoridae) in Washington State. 98(7), 1018-1018. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-13-0961-pdn>
- Al-Ali, E., Al-Hashash, H., Al-Aqeel, H., & Hejji, B. (2013). Multiple Important Plant Viruses Are Present On Vegetable Crops in Kuwait. *Journal of Clinical Trials*, 03. <https://doi.org/10.4172/2167-0870.1000136>
- Alemu, K. (2015). Detection of Diseases, Identification and Diversity of Viruses: A Review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(1), 204-213.
- Alvarez-Quinto, R. A., Cornejo-Franco, J. F., Mollov, D., & Quito-Avila, D. F. (2018, 22-25 de octubre de 2018). *Identificación de tres nuevos virus en babaco (Vasconcellea x heilbornii) a través de secuenciación masiva* IV Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad 2018, Hotel Hilton Colon, Guayaquil, Ecuador.
- Alvarez Q., R. A., Cornejo F., J. F., & Quito A., D. F. (2017). Characterization of a not so new potexvirus from babaco (*Vasconcellea x heilbornii*). *PLOS ONE*, 12(12), e0189519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189519>

- Aranda, M. A., & Freitas-Astúa, J. (2017). Ecology and diversity of plant viruses, and epidemiology of plant virus-induced diseases. *Annals of Applied Biology*, 171(1), 1-4. <https://doi.org/10.1111/aab.12361>
- Brinkman, F. S. L., & Leipe, D. D. (2001). Phylogenetic Analysis. In *Bioinformatics* (pp. 323-358). <https://doi.org/10.1002/0471223921.ch14>
- Brown, D. J., Halbrecht, J. M., Robbins, R. T., & Vrain, T. C. (1993). Transmission of Nepoviruses by *Xiphinema americanum*-group Nematodes. *J Nematol*, 25(3), 349-354.
- Brown, D. J. F., Halbrecht, J. M., Jones, A. T., Vrain, T. C., & Robbins, R. T. (1994). Transmission of three North American nepoviruses populations of four distinct species of the *Xiphinema americanum* group. *Phytopathology*, 84(6), 646-649. <https://doi.org/10.1094/phyto-84-646>
- Brown, D. J. F., Lamberti, F., Taylor, C. E., & Trudgill, D. L. (1988). Nematode-Virus Plant Interactions.
- Brown, D. J. F., Ploeg, A. T., & Trudgill, D. L. (1995). The Transmission of Viruses by Plant Nematodes. In A. B. R. Beemster, G. J. Bollen, M. Gerlagh, M. A. Ruissen, B. Schippers, & A. Tempel (Eds.), *Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology* (Vol. 23, pp. 57-66). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88728-3.50015-9>
- Brown, D. J. F., Robertson, W. M., & Trudgill, D. L. (1995). Transmission of Viruses by Plant Nematodes. 33(1), 223-249. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.001255>
- Candresse, T., Svanella-Dumas, L., & Le Gall, O. (2006). Characterization and partial genome sequence of stocky prune virus, a new member of the genus Cheravirus. *Arch Virol*, 151(6), 1179-1188. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0682-y>
- Cornejo-Franco, J. F., Medina-Salguero, A., Flores, F., Chica, E., Grinstead, S., Mollov, D., & Quito-Avila, D. F. (2020). Exploring the virome of *Vasconcellea x heilbornii*: the first step

towards a sustainable production program for babaco in Ecuador. *European Journal of Plant Pathology*, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02037-2>

Delpasand Khabbazi, A., Sokhandan Bashir, N., Asl, E., & Delpasand Khabbazi, S. (2017).

Molecular detection of Grapevine fanleaf Virus by the isolation of ssRNA and dsRNA from *Xiphinema index*. *Journal of Scientific Agriculture*, 1, 100.

<https://doi.org/10.25081/jsa.2017.v1i0.35>

Demangeat, G., Komar, V., Cornuet, P., Esmenjaud, D., & Fuchs, M. (2004). Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single *Xiphinema index* nematode vector. *Journal of Virological Methods*, 122(1), 79-86.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.006>

Desbiez, C., Moury, B., & Lecoq, H. (2011). The hallmarks of “green” viruses: Do plant viruses evolve differently from the others? *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11, 812-824.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.020>

Dijkstra, J., & de Jager, C. P. (1998a). Virus Transmission by Grafting. In J. Dijkstra & C. P. de Jager (Eds.), *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises* (pp. 120-122). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-72030-7\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-642-72030-7_24)

Dijkstra, J., & de Jager, C. P. (1998b). Virus Transmission by Nematodes. In J. Dijkstra & C. P. de Jager (Eds.), *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises* (pp. 129). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-72030-7\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-642-72030-7_24)

Eguiguren, R., & Défaz T., M. (1992). Principales fitonemátodos en el Ecuador su descripción, biología y combate. *INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nematología, Manual no. 21.*

EPPO. (2020). *EPPO Global Database (available online)*. <https://gd.eppo.int>

- Fang, Y., & Ramasamy, R. P. (2015). Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. *Biosensors*, 5(3), 537-561. <https://doi.org/10.3390/bios5030537>
- Fermin, G. (2018). Host Range, Host–Virus Interactions, and Virus Transmission. In (pp. 101-134). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811257-1.00005-X>
- Finetti-Sialer, M. M., & Ciancio, A. (2005). Isolate-Specific Detection of Grapevine fanleaf virus from *Xiphinema index* Through DNA-Based Molecular Probes. *95*(3), 262-268. <https://doi.org/10.1094/phyto-95-0262>
- Gallet, R., Michalakakis, Y., & Blanc, S. (2018). Vector-transmission of plant viruses and constraints imposed by virus-vector interactions. *Curr Opin Virol*, 33, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.005>
- Goldschmidt, E. E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Frontiers in plant science*, 5, 727-727. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00727>
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., & Barba, M. (2016). Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Front Microbiol*, 7, 1325-1325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325>
- Halgren, A., Tzanetakis, I. E., & Martin, R. R. (2007). Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, 97(1), 44-50. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-0044>
- Hamelin, F. M., Hilker, F. M., Sun, T. A., Jeger, M. J., Hajimorad, M. R., Allen, L. J. S., & Prendeville, H. R. (2017). The evolution of parasitic and mutualistic plant-virus symbioses through transmission-virulence trade-offs. *Virus Res*, 241, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.011>

- Hansen, A. J., Nyland, G., McElroy, F. D., & Stace-Smith, R. (1974). Origin, cause, host range and spread of cherry rasp leaf disease in North America. *Phytopathology*, *64*, 721-727.  
<https://doi.org/10.1094/Phyto-64-721>
- Harrison, B. (1977). Ecology and control of viruses with soil-inhabiting vectors. *Annual Review of Phytopathology*, *15*(1), 331-360.
- Haubold, B. (2013). Alignment-free phylogenetics and population genetics. *Briefings in Bioinformatics*, *15*(3), 407-418. <https://doi.org/10.1093/bib/bbt083> %J Briefings in Bioinformatics
- Hong, J.-S., & Ju, H.-J. (2017). The Plant Cellular Systems for Plant Virus Movement. *The plant pathology journal*, *33*(3), 213-228. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.09.2016.0198>
- Hull, R. (2002). CHAPTER 11 - Transmission 1: By Invertebrates, Nematodes and Fungi. In R. Hull (Ed.), *Matthews' Plant Virology (Fourth Edition)* (pp. 485-531). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012361160-4/50062-1>
- Hull, R. (2014). Plant to Plant Movement. In C. Mullane (Ed.), *Plant Virology* (5 ed., pp. 669-751). Elsevier Inc.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2019). *New Taxonomy Release (2019): Master Species List #35. Updates approved during EC 51, Berlin, Germany, July 2019; Email ratification March 2020.*
- Jadán, M., & Dorca, C. (2019). Propagation methods in Babaco plants (*Vasconcella x helbornii*). *Tropical Plant Research*, *6*. <https://doi.org/10.22271/tpr.2019.v6.i1.007>
- James, D., & Upton, C. (2002). Nucleotide sequence analysis of RNA-2 of a flat apple isolate of Cherry rasp leaf virus with regions showing greater identity to animal picornaviruses than to related plant viruses. *Arch Virol*, *147*(8), 1631-1641.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-002-0833-3>

- James, D., & Upton, C. (2005). Genome segment RNA-1 of a flat apple isolate of Cherry rasp leaf virus: nucleotide sequence analysis and RT-PCR detection. *Arch Virol*, *150*(7), 1469-1476. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0503-3>
- Jeong, J., Ju, H., & Noh, J. (2014). A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease*, *20*, 173-181. <https://doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
- Jones, S., Baizan-Edge, A., MacFarlane, S., & Torrance, L. (2017). Viral Diagnostics in Plants Using Next Generation Sequencing: Computational Analysis in Practice. *Frontiers in plant science*, *8*, 1770-1770. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01770>
- Kamada, K., Omata, S., Yamagishi, N., Kasajima, I., & Yoshikawa, N. (2018). Gentian (*Gentiana triflora*) prevents transmission of apple latent spherical virus (ALSV) vector to progeny seeds. *Planta*, *248*(6), 1431-1441. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2992-9>
- Kempler, C., & Kabaluk, T. (1996). Babaco (*Carica pentagona* Heilb.): a possible crop for the greenhouse. *Hortscience*, *31*(5), 785-788. <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.5.785>
- Kon, T., & Yoshikawa, N. (2014). Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing. *Front Microbiol*, *5*, 595. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00595>
- Kreuze, J. F., & Valkonen, J. P. (2017). Utilization of engineered resistance to viruses in crops of the developing world, with emphasis on sub-Saharan Africa. *Curr Opin Virol*, *26*, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.022>
- Lacroix, C., Renner, K., Cole, E., Seabloom, E. W., Borer, E. T., & Malmstrom, C. M. (2016). Methodological Guidelines for Accurate Detection of Viruses in Wild Plant Species. *Applied and environmental microbiology*, *82*(6), 1966-1975. <https://doi.org/10.1128/AEM.03538-15>

- Lewsey, M. G., & Carr, J. P. (2019). RNA Viruses: Plant Pathogenic. In T. M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)* (pp. 178-193). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13100-0>
- Li, R., & Hartung, J. S. (2007). Reverse transcription-polymerase chain reaction-based detection of plant viruses. *Curr Protoc Microbiol, Chapter 16*, Unit 16C.11.  
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16c01s6>
- López, M. M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M. T., Llop, P., Penyalver, R., & Cambra, M. (2003). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int Microbiol, 6*(4), 233-243. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0143-y>
- Lucas, J. (2009). *Plant pathology and plant pathogens*. John Wiley & Sons.
- Maliogka, V. I., Minafra, A., Saldarelli, P., Ruiz-García, A. B., Glasa, M., Katis, N., & Olmos, A. (2018). Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies. *Viruses, 10*(8), 436.  
<https://doi.org/10.3390/v10080436>
- Marmonier, A., Schellenberger, P., Esmenjaud, D., Schmitt-Keichinger, C., Ritzenthaler, C., Andret-Link, P., Lemaire, O., Fuchs, M., & Demangeat, G. (2010). The coat protein determines the specificity of virus transmission by *Xiphinema diversicaudatum*. *Journal of Plant Pathology, 92*(1), 275-279. <http://www.jstor.org/stable/41998798>
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L. R., Davis, C. E., & Dandekar, A. M. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development, 35*(1), 1-25. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1>

- Mengistu, T., Dababat, A., Sekora, N., Akyazi, F., & Abebe, E. (2012). *Identification key for agriculturally important plant-parasitic nematodes. Prepared for the International Nematode Diagnosis and Identification Course 2012 - A manual for nematology.*
- Nicolaisen, M. (2011). An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *Journal of Virological Methods*, 173(1), 137-143.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.022>
- Nyland, G., Lownsbery, B. F., Lowe, S. K., & Mitchell, J. F. (1969). The transmission of cherry rasp leaf virus by *Xiphinema americanum*. *Phytopathology*, 59(8), 1111-1112.
- Pagán, I. (2018). The diversity, evolution and epidemiology of plant viruses: A phylogenetic view. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 187-199.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.033>
- Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A., & James, D. (2018). Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids [Review]. 9(2087).  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087>
- Palomares, J., Escobar, C., Cabrera, J., Vovlas, A., & Castillo, P. (2017). Anatomical Alterations in Plant Tissues Induced by Plant-Parasitic Nematodes. *Frontiers in plant science*, 8, 1987-1987. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01987>
- Parra, A. (1989). Comercialización de frutas y hortalizas. *Ingeniería e Investigación*(19), 14-19.
- Pearson, M. (2017). Viral Diseases. In B. Thomas, B. G. Murray, & D. J. Murphy (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)* (pp. 137-147). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00057-5>
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., & Ravnkar, M. (2017). Next Generation Sequencing for Detection and Discovery of Plant Viruses and

Viroids: Comparison of Two Approaches. *Front Microbiol*, 8, 1998-1998.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>

Peña, D., Villena O., P. G., Aguirre de Juana, A., & Jiménez, C. (2017). Diversidad genética de accesiones de la familia Caricaceae en el sur de Ecuador. *MASKANA*, 8(1), 85-102.

<https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.08>

Petrzik, K., Přebilová, J., Špak, J., & Havelka, J. (2015). Partial genome sequence of currant latent virus, a new chera-like virus related to Apple latent spherical virus. *Journal of General Plant Pathology*, 81(2), 142-145. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0574-7>

Robles, A., Herrera, F., & Torres, R. (2016). El babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo). Principales agentes fitopatógenos y estrategias de control. Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo). Major plant pathogens and control strategies. *Centro Agrícola*, 43, 83-92.

Rojas, M., & Gilbertson, R. (2008). Emerging Plant Viruses: a Diversity of Mechanisms and Opportunities. In M. J. Roossinck (Ed.), *Plant Virus Evolution* (pp. 27-51). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75763-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75763-4_3)

Roossinck, M. J. (2013). Plant Virus Ecology. *PLOS Pathogens*, 9(5), e1003304.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003304>

Roossinck, M. J. (2019). Viruses in the phytobiome. *Curr Opin Virol*, 37, 72-76.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.06.008>

Rybicki, E., & Pietersen, G. (1999). Plant Virus Disease Problems in The Developing World. In K. Margniorosch, F. A. Murphy, & A. J. Shatkin (Eds.), *Advances in Virus Research* (Vol. 53, pp. 127-175). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60346-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60346-2)

- Sanfaçon, H. (2017). Grand Challenge in Plant Virology: Understanding the Impact of Plant Viruses in Model Plants, in Agricultural Crops, and in Complex Ecosystems. *Front Microbiol*, 8, 860-860. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00860>
- Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, R., & Wetzels, T. (2009). Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Arch Virol*, 154(5), 899-907. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0367-z>
- Scheldeman, X., Van Damme, P., & Romero Motoche, J. P. (2002). Highland papayas in southern Ecuador: Need for conservation actions.
- Schoelz, J. E., & Stewart, L. R. (2018). The Role of Viruses in the Phytobiome. *Annu Rev Virol*, 5(1), 93-111. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043421>
- Sleator, R. D. (2013). A Beginner's Guide to Phylogenetics. *Microbial Ecology*, 66(1), 1-4. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0236-x>
- Soria, N. (1997). Babaco, fruto con potencial en el Ecuador y el mundo. *Revista Informativa INIAP*, 9, 35-43.
- Soria, N., & Viteri D., P. (1999). Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador. *INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Fruticultura*.
- Syller, J. (2014). Biological and molecular events associated with simultaneous transmission of plant viruses by invertebrate and fungal vectors. *Mol Plant Pathol*, 15(4), 417-426. <https://doi.org/10.1111/mpp.12101>
- Taylor, C. E., & Brown, D. J. F. (1997). Methodology. In *Nematode vectors of plant viruses* (pp. 213-215). CAB International.

- Thompson, J. R., Dasgupta, I., Fuchs, M., Iwanami, T., Karasev, A. V., Petrzik, K., Sanfaçon, H., Tzanetakis, I. E., van der Vlugt, R., Wetzel, T., Yoshikawa, N., & Consortium, C. R. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Secoviridae. *Journal of general Virology*, *98*, 529–531.
- Thompson, J. R., Perry, K. L., & De Jong, W. (2004). A new potato virus in a new lineage of picorna-like viruses. *Arch Virol*, *149*(11), 2141-2154. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0362-3>
- University of Florida. (2019). *Collecting Nematodes Samples from Fruit and Nut Trees*. Retrieved 2020/8/25 from <http://entnemdept.ufl.edu/nematology-assay-lab/collecting-samples-from-fruit-and-nut-trees/>
- Van Bezooijen, J. (2006). *Methods and techniques for nematology*.
- Viteri D., P. (1992). El cultivo del babaco en el Ecuador. *INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Fruticultura., Manual no. 19*, 17 p.
- Walkey, D. G. (1991). Virus Transmission by Biological Means. In *Applied Plant Virology* (pp. 168-191). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3090-5>
- Wang, A. (2015). Dissecting the Molecular Network of Virus-Plant Interactions: The Complex Roles of Host Factors. *53*(1), 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120001>
- Wang, A., & Zhou, X. (2016). *Current Research Topics in Plant Virology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2>
- Xu, Q., Liu, H., Yuan, P., Zhang, X., Chen, Q., Jiang, X., & Zhou, Y. (2017). Development of a simplified RT-PCR without RNA isolation for rapid detection of RNA viruses in a single small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallén). *Virology Journal*, *14*(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0732-6>

Yadav, N., & Khurana, S. M. (2016). Plant Virus Detection and Diagnosis: Progress and Challenges. In (pp. 97-132). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2610-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2610-9_7)

Zaitlin, M., & R., H. (1987). Plant Virus-Host Interactions. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1), 291-315. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.38.060187.001451>