



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: DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GÉNEROS
Potexvirus, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* EN AGUAS DE
RIEGO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) EN
LA PROVINCIA DE PICHINCHA**

AUTOR: OVIEDO LUDEÑA MARÍA ALEJANDRA

DIRECTOR: ING. FLORES FLOR FRANCISCO, Ph.D

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Detección e Identificación de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en aguas de riego de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en la provincia de Pichincha**” realizado por la Srta. **Oviedo Ludeña María Alejandra**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la Srta. **Oviedo Ludeña María Alejandra** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 13 de marzo 2017

Flores Flor Francisco Javier, Ph.D

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Oviedo Ludeña María Alejandra**, con cédula de identidad N° 17178584780 declaro que este trabajo de titulación “**Detección e Identificación de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en aguas de riego de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en la provincia de Pichincha**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

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

Sangolquí, 13 de marzo 2017

Oviedo Ludeña María Alejandra

C.C. 1718584780



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

AUTORIZACIÓN

Yo, **Oviedo Ludeña María Alejandra**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la Institución el presente trabajo de titulación “**Detección e Identificación de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en aguas de riego de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en la provincia de Pichincha**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 13 de marzo 2017

Oviedo Ludeña María Alejandra

C.C. 171858478

DEDICATORIA

Todo lo realice en honor a mi madre: María Dolores Ludeña Correa quien con su ejemplo me enseñó fortaleza y coraje para continuar con mis metas, siendo un apoyo incondicional durante todo mi desarrollo profesional y personal.

Esta tesis va dedicada con mucho cariño para ti mamá.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer el apoyo incondicional de mi familia: a mi madre, mi padrastro Darwin Pilacuan y a mis hermanas Yulissa, Diana y Sarita. Quiero agradecer a mi tío Luis Fernando Ludeña por acompañarme durante todos los años de mi desarrollo académico siendo como un padre para mí con su consejo y cariño.

El presente Proyecto de Titulación se llevó a cabo gracias a la colaboración del laboratorio de Microbiología Molecular y al Grupo de Investigación en Microbiología y Ambiente (GIMA) de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

Se agradece el apoyo del programa de Fruticultura de la Granja Experimental Tumbaco del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y de la Granja la Morita de la Facultad de Agropecuaria de la Universidad Central del Ecuador.

Quiero agradecer a mi director: Dr. Francisco Flores Flor por haber depositado su confianza en mí y por brindarme la oportunidad de trabajar en tan fascinante proyecto de detección de virus en agua, su entrega y dedicación han sido un gran ejemplo y ha inspirado mis pasos para encaminarme en mi vida profesional. Siempre toma más de su tiempo para acompañar y guiar a sus estudiantes y eso lo convierte en un gran profesor y amigo.

Todos mis agradecimientos al Ing. William Viera (INIAP) quien nos apoyó durante el proyecto y a la Ing. Andrea Sotomayor (INIAP) por acompañarnos en la toma de muestras junto a Don Orlando Trujillo (La morita, UCE), al Dr. Andrés Izquierdo por dedicar su tiempo y recursos a nuestro proyecto.

Desde que comencé en 2012 mis pasantías en el laboratorio de Microbiología descubrí que mi camino era ese pequeño e increíble mundo que se deja observar por un microscopio, todo guiado de la mano de excelentes personas como Almita Koch y Jessica Maishincho quienes me enseñaron a seguir adelante y me dieron un propósito a seguir en mi vida, por esto y por mucho

más agradezco infinitamente a ambas por haber depositado en mí su confianza y por ser más que profesoras unas amigas e inclusive segundas madres.

Quiero agradecer a mis queridas compañeras Mishell Achig, Rosita Miño (La Rose), Yanara Naranjo, Alison Madrid y Geovanna Arroyo por compartir conmigo las alegrías y tristezas que conlleva esta hermosa carrera de Ingeniería en Biotecnología.

A Luis Méndez y a toda su familia por acogerme en su corazón y llegar a ser una parte muy importante de mi vida, gracias por todo el amor.

No podía dejar de lado a mi compañera de tesis Fiana Guevara que con su entusiasmo y pericia me apoyó infinitamente con el desarrollo, su conocimiento y punto de vista fue primordial para alcanzar los objetivos propuestos en el proyecto. Tampoco puedo olvidarme de mis queridos pasantes: Sofía Robalino, Valeria Faz, Esteban Palacios, Álvaro Sampedro y Eduardo Moncayo (El Lalo), gracias chicos y chicas por acompañarme en este trayecto y les aseguro que nunca olvidaré todos los momentos que viví en su compañía.

ÍNDICE

AUTORIZACIÓN.....	ii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
1. PROBLEMA	1
1.1 Formulación del Problema	1
1.2 Justificación	1
1.3 Objetivos.....	3
CAPITULO II.....	4
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav.</i>)	4
2.2 Generalidades de los Virus	8
2.3 Síntesis de ADN complementario mediante Transcripción Inversa de la Reacción en cadena de la Polimerasa.....	22
2.4 Hipótesis	23
2.5 Cuadro de operacionalización de variables	23

CAPÍTULO III.....	24
3. METODOLOGÍA	24
3.1 Zona de estudio	24
3.2 Período de Tiempo de Investigación.....	25
3.3 Técnicas de Concentrado Viral	25
3.4 Extracción de ácidos nucleicos (ARN)	27
CAPÍTULO IV.....	31
4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	31
4.1 Análisis de resultados	31
4.2 Discusión de los resultados	37
4.3 Comprobación de hipótesis.....	42
CAPÍTULO V.....	42
5.1 Conclusiones	42
5.2 Recomendaciones	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables y Factores a determinar	50
Tabla 2. Concentraciones de buffer A para RT-PCR	55
Tabla 3. Concentraciones de buffer B para RT-PCR	55
Tabla 4. Master Mix para los tres géneros de virus	56
Tabla 5. Condiciones de Amplificación	56
Tabla 6. Cantidad y Calidad de ADN complementario.....	60
Tabla 7. Resultados de Secuenciación.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Hojas con deformación y clorosis en mosaico de tomate de árbol.....	33
Figura 2: TSWV provocando síntomas de necrosis en diferentes hospederos (Sherwood <i>et al.</i> , 2003).....	34
Figura 3: Virión de <i>Potexvirus</i> , sin envoltura, flexible y filamentoso (SIB, 2008).....	42
Figura 4: Genoma lineal (SIB, 2008).....	43
Figura 5: Cápside icosaédrica de <i>Tombusviridae</i> (SIB, 2010).....	45
Figura 6: Genoma de <i>Tombusviridae</i> , monopartido lineal ssRNA (+) (SIB, 2010).....	46
Figura 7: Virión de <i>Tobamovirus</i> , sin envoltura con simetría helicoidal (SIB, 2010).....	48
Figura 8: Genoma monopartido de <i>Tobamovirus</i> , ssRNA(+) de 6,3 a 6,5 kb (SIB, 2010).....	48
Figura 9: Reservorio 1 de INIAP	51
Figura 10: Contenedores de 10 litros con pre-flóculo de leche descremada en agitación por 8 horas a temperatura ambiente.....	53
Figura 11: Flóculo formado tras precipitación durante toda la noche con leche descremada y el precipitado obtenido (<i>pellet</i>) tras centrifugación a alta velocidad.....	58
Figura 12: Hojas de tomate de árbol recolectadas en La Morita, fue asignado	

un código para cada planta: ip (planta 4), jp (p-6), kp (p-7) y lp (p-10)	59
Figura 13: Frutos de tomate de árbol recolectados en la Granja experimental Tumbaco, se observa el cambio de coloración entre cada muestra empezando desde F1 hasta F4	59
Figura 14: Amplificación de muestras de planta de babaco mediante PCR <i>Potexvirus</i> , en el primer piso se observan bandas positivas en NP y OP superiores al tamaño de fragmento esperado (169 pb). En el segundo piso se observa mayor cantidad de fragmentos de cDNA en AP, CP y mP	61
Figura 15: Amplificación de muestras del reservorio 1 mediante PCR <i>Potexvirus</i> , se observan bandas marcadas por debajo de los 250 pb en SKM y ninguna banda en PEG y C (-)	62
Figura 16: Amplificación de muestras del reservorio 1 mediante PCR <i>Tombusvirus</i> , se observan bandas tenues por debajo de los 250 pb en PEG y SKM. Presencia de banda alrededor de los 600pb para PEGF y C (-)	62
Figura 17: Amplificación de muestras <i>Potexvirus</i> . Se observan bandas tenues entre los 100 y 200 pb en la muestra PEG y C+ (babaco), ninguna banda en PEG2, SKM, SKM2 y C (-)	63

RESUMEN

Los virus fitopatógenos afectan a una gran variedad de cultivos en nuestro país. En el caso de frutales, las infecciones con virus conllevan baja producción y pueden causar muerte en las plantas. Al momento los reportes de virus en plantaciones frutales del Ecuador son limitados pero a nivel mundial constantemente se descubren nuevos patosistemas virus/planta frutal. El objetivo del proyecto fue detectar por primera vez en Ecuador la presencia de virus fitopatógenos en dos reservorios de agua de riego para cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en el sector de Tumbaco. Se probaron dos métodos de concentración viral; el primero, utilizando floculación con leche descremada y el segundo, con precipitación con polietilenglicol. Se recolectaron muestras de tomate de árbol con síntomas de virosis para determinar la presencia del mismo tipo de virus tanto en planta como en agua. Se retrotanscribió el ARN extraído de los concentrados tanto virales como de plantas y se amplificó utilizando primers genéricos para *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus*. Los resultados de secuenciación para muestras de agua indicaron la presencia de dos *Tombusvirus* con 99- 97% de identidad a nivel nucleotídico con *Neckar River Virus*, un *Mandavirus* con un 66% de identidad con *Indian Citrus Ringspot Virus* y un *Potexvirus* con 76% de identidad con *Lagenaria mild mosaic virus*. En tomate de árbol no se encontraron miembros de ninguno de los tres géneros analizados por lo que no existe evidencia de que los virus detectados en aguas de riego son transmitidos a la planta.

PALABRAS CLAVE:

- VIRUS.
- FITOPATÓGENOS.
- TAMARILLO.

ABSTRACT

Phytopathogenic viruses affect a large variety of crops in our country. In fruit trees, viral infections lead to low productivity, which implies considerable monetary losses for farmers. Currently, virus reports on Ecuadorian fruit plantations are limited, but new virus/ fruit plant pathosystems are constantly being discovered worldwide.

The objective of this project was to detect, for first time in Ecuador, phytopathogenic viruses in irrigation waters. Two water reservoirs for tamarillo crops in Tumbaco were analyzed for the presence of phytopathogenic viruses of genera that have previously been reported in waters. Two methods of viral concentration were tested, first by using flocculation with skimmed milk and the second by precipitation with polyethyleneglycol. Plant samples with virus symptoms were collected to determine if the same type of virus is present in both plant and water. RNA extracted from viral concentrates and plants was reverse transcribed and amplified using generic primers for *Potexvirus*, *Tombusvirus* and *Tobamovirus*. Sequencing results for water samples indicated the presence of two *Tombusviruses* with 99-97% of nucleotide identity with *Neckar River Virus*, one *Mandavirus* with 66% nucleotide identity with *Indian Citrus Ringspot Virus* and one *Potexvirus* with 76% of nucleotide identity with *Lagenaria mild mosaic virus*. Members of the three analyzed genera were not found in tamarillo, suggesting that these viruses are not being transmitted by water. The results illustrate the presence of undescribed potentially phytopathogenic viral species that could represent a threat to several crops in Ecuador.

KEY WORDS:

- VIRUS.
- PHYTOPATHOGEN.
- TAMARILLO.

CAPÍTULO I

1 PROBLEMA

1.1 Formulación del Problema

Las enfermedades virales afectan a un amplio rango de hospederos, desde microorganismos como bacterias hasta el ser humano. Aunque la mayoría de investigaciones en el área de virología se realizan en virus humanos, los virus fitopatógenos representan un foco de estudio importante en el ámbito científico (Rajarshi, 2016).

En el Ecuador, los estudios realizados en relación a virus fitopatógenos son limitados, sin embargo, existen varias enfermedades virales descritas para tomate de árbol (Revelo *et al.*, 2004). Los cultivos de Tomate de árbol representan un total de 14,748 hectáreas, con un rendimiento aproximado de 9,90 toneladas por hectárea (Montero *et al.*, 2013), colocando al frutal como producto de consumo nacional e internacional.

La transmisión de los virus que afectan al tomate de árbol es mediada por múltiples vectores, es difícil controlar la diseminación de las partículas virales en las plantaciones cuando se observan síntomas avanzados de la enfermedad; la única medida para evitar la propagación del agente causal es la eliminación completa de la planta enferma (León *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que uno de los medios de propagación de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* es el agua (Foster y Taylor, 1998) y se pretende determinar si la fuente hídrica usada para el riego de cultivos de tomate de árbol es capaz de transmitir virus de alguno de estos géneros a la planta.

1.2 Justificación

El Tomate de árbol se cultiva en varias provincias del Ecuador con un total de 14,748 hectáreas, siendo las provincias de mayor producción Pichincha y Tungurahua. El fruto tiene alta demanda de la población ecuatoriana y su exportación inició a finales de la década de los años 80. Su producción se ha incrementado desde los últimos 15 años siendo los principales mercados: Estados Unidos, España y Chile (CICO, 2009). Según fuentes del Banco Central del Ecuador BCE – Sistema de Inteligencia de Mercados (SIM) desde el 2006 el comercio de Tomate de árbol mostró un crecimiento en exportaciones, debido a nuevas oportunidades en el mercado extranjero (CICO, 2009).

La calidad del tomate de árbol fomenta el incremento del comercio y las exportaciones. En nuestro país las condiciones climáticas afectan a los cultivos e impiden el crecimiento de los frutos. Las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos son otro factor a tomar en cuenta por lo que la detección inmediata de patógenos permite mejorar la calidad de vida y asegurar la soberanía alimentaria del país.

La determinación de virus infecciosos ayuda a determinar su riesgo en muestras ambientales (Hong *et al.*, 2000). Virus entéricos humanos han sido detectados previamente tanto en aguas de bebida como en aguas residuales (Metcalf *et al.*, 1995). La identificación y el posterior tratamiento de las fuentes de contaminación viral fomentan la diseminación de contagios y posibles epidemias.

Dados los antecedentes mencionados anteriormente, la detección e identificación de virus patógenos de plantas de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en aguas de riego de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en la provincia de Pichincha permite asegurar la seguridad alimentaria y mejorar la calidad del producto para el consumo humano.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Detectar e identificar virus de los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* en plantas y aguas de riego de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en la provincia de Pichincha.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar dos técnicas de concentración de partículas virales en muestras de agua.
- Detectar la presencia de virus de géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Tobamovirus* mediante técnicas de biología molecular.
- Identificar a los virus detectados mediante secuenciación y análisis de secuencias.
- Determinar si el agua de riego es una posible fuente de contaminación de las plantas de tomate de árbol infectadas.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

2.1.1 Origen y Reseña Histórica

El Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) se originó en América del Sur y se cree que procede de selvas y bosques ubicados en la reserva Tucumano – Boliviana al noreste de Argentina y el sur de Bolivia (Revelo *et al.*, 2004). Su cultivo en Ecuador se popularizó desde mediados de 1980 debido a su demanda y potencial para exportación (Revelo *et al.*, 2008). La superficie cosechada de tomate de árbol incrementó de 1,370 a 3,250 hectáreas desde 1993 a 1997 (León *et al.*, 2004) y actualmente se estima una producción nacional anual de 14,695 toneladas (Sivaprasad *et al.*, 2015).

Reportes del 2013 (Guerrero *et al.*, 2013) mencionan descensos significativos del rendimiento nacional en cultivos de tomate de árbol del 37%, que pueden ser atribuidos a la incidencia de enfermedades como la lancha, ceinicilla, alternariosis, antracnosis y virosis (León *et al.*, 2004)

El tomate de árbol se encuentra en Bolivia, Argentina, Venezuela, Ecuador, Perú y Colombia. Se cultiva comercialmente en Colombia, Ecuador, Perú y Nueva Zelanda, y ha sido introducido a menor escala en Estados Unidos, México, países de Europa, África, Asia, Oceanía y Australia (Revelo *et al.*, 2004).

En Ecuador se cultiva en varias provincias: Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Cañar, Azuay y Loja, siendo las provincias de mayor producción Tungurahua y Pichincha (CICO, 2009).

2.1.2 Taxonomía

La planta de tomate de árbol fue clasificada inicialmente como *Solanum betaceum* por Cavanilles en 1799, posteriormente Sendtner en 1845 lo transfirió al género *Cyphomandra*; hasta que estudios filogenéticos la colocaron nuevamente en el género *Solanum* (Olmstead y Palmer, 1992).

De acuerdo a Revelo et al., 2004, la clasificación taxonómica del tomate de árbol es la siguiente:

Reino: Vegetal

División: Fanerógamas

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Subclase: Metaclamídeas

Orden: Tubiflorales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum betaceum* Cav.

Alrededor del mundo al tomate de árbol se lo conoce con los siguientes nombres: “Baum tomate” en Alemania, “tamarillo” en Nueva Zelanda y Estados Unidos, “tomate de cera” en Portugal, “tree tomato” en Inglaterra y como “tomate de árbol o de ají” en España (León et al., 2004).

2.1.3 Enfermedades virales del Tomate de árbol

En cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) las enfermedades virales se presentan con síntomas de enanismo (bajo crecimiento), hojas enrolladas con tonalidades rojizas y amarillentas en mosaico y los brotes son deformados (Revelo et al., 2008), como se observa en la figura 1.



Figura 1: Hojas deformadas con deformación y clorosis en mosaico de tomate de árbol.

Ciertas hojas presentan además del mosaico engrosamiento de venas y presencia de ampollas o vejigas en la lámina foliar. Los síntomas en frutos son muy variados se observan manchas geométricas moradas que cubren casi todo el fruto o lo deforman dándole la pulpa seca un sabor ácido (Tamayo, 2011).

Reportes en Nueva Zelanda demuestran que el tomate de árbol conocido como tamarillo es susceptible al menos a seis clases de virus, entre ellos *Cucumber mosaic cucumovirus*, *Potato aucuba mosaic Potexvirus*, *Alfalfa mosaic virus*, *arabis mosaic nepovirus* (Descrito por Thomas y Procter en 1972) y *Tomato spotted wilt tospovirus* (Eagles, 1994).

Según Jaramillo *et al.*, 2011, los virus que afectan al tomate de árbol en Ecuador son *Tamarillo mosaic virus* (TaMV, *Potyvirus*), *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*), *Potato aucuba mosaic virus* (PAMV, *Potexvirus*), *Alfalfa mosaic virus* (AMV, *Alfamovirus*), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tospovirus*), *Tomato mosaic virus* (ToMV, *Tobamovirus*) y otros miembros del género *Potyvirus*.

Los virus más agresivos en cultivos ecuatorianos son el TaMV y el TSWV que causan la marchitez manchada del tomate conocida como Mancha aceitosa o bronceado del tomate de árbol (figura 2). Las hojas presentan clorosis y manchas aceitosas oscuras en el haz que se tornan necróticas tras la infección (Revelo *et al.*, 2008).



Figura 2: TSWV provocando síntomas de necrosis en diferentes hospederos (Sherwood *et al.*, 2003).

Generalmente la transmisión de los virus fitopatógenos se da mediante propagación vegetativa por estacas o injertos y mediante insectos vectores como pulgones, mosca blanca y cicadélidos (Revelo *et al.*, 2008). Hasta la actualidad no se ha descrito la transmisión de virus patógenos de tomate de árbol mediante agua de riego en el Ecuador.

No existe control de enfermedades virales mediante productos químicos y una vez que se presenta la enfermedad es imposible controlarla (Tamayo, 2011). Como medida de prevención se recomienda no sembrar plántulas sospechosas de enfermedad, desinfectar las herramientas de trabajo y las manos con agua jabonosa periódicamente cuando se realice desyerba, poda y cosecha (Tamayo, 2011). Además cualquier planta con signos de virosis debe ser eliminada inmediatamente, la poda de árboles para controlar la virosis no es recomendable debido a que el virus

permanece en el tejido vegetal y aparecen síntomas en el nuevo brote (Tamayo, 2011) (Revelo *et al.*, 2008).

2.2 Generalidades de los Virus

Los virus son organismos que se acogen a varias definiciones. Acorde a Cann, (2005) son parásitos obligados submicroscópicos que sobreviven de forma intracelular mediante las siguientes cláusulas: carecen de información genética que les permitan constituir estructuras para cumplir funciones vitales (metabolismo y reproducción); las partículas virales (llamados viriones) se forman a partir de componentes preformados destacando que los viriones no crecen ni sufren división.

La definición de Desnues, (2012) en cambio menciona que son capaces de infectar a eucariotas, bacterias y arqueas, además de otros organismos vivos. Siendo incapaces de reproducirse por sí mismos, los virus dependen de la maquinaria celular de un hospedero (Rajarshi *et al.*, 2016).

En cuanto a su estructura, están provistos de ácidos nucleicos: una cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) o una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) empaquetados junto a moléculas cargadas positivamente (Na, Mg, K, poliaminas y otras proteínas) que neutralizan la repulsión provocada por cargas electrostáticas de grupos fosfatos del esqueleto del nucleótido. Los ácidos nucleicos se encuentran envueltos o protegidos por una cubierta externa llamada cápside y es una estructura formada por subunidades proteicas repetidas de forma múltiple (Cann, 2005).

Las proteínas de la cápside poseen moléculas de adhesión afines a receptores de la célula hospedera y pueden encontrarse en dos tipos de simetría: helicoidal e icosaédrica (Cann, 2005).

La clasificación de los virus se considera un campo complejo, debido a los diversos cambios que sufren al encontrarse nuevos descubrimientos

que cuestionan la clasificación actual; la nomenclatura de cada virus está establecida acorde al hospedero al cual infecta, la enfermedad que provoca o el lugar donde la enfermedad fue reportada por primera vez escrito en siglas en inglés, por ejemplo el virus del mosaico del tabaco que recibió su nombre debido a que produce clorosis en forma de mosaico en esta planta (Rivera, 2007).

Hasta la actualidad se han definido dos sistemas de clasificación: La clasificación Jerárquica de Virus y la clasificación de Baltimore. El primero discrimina cuatro características principales: naturaleza del ácido nucleico: ARN o ADN, simetría de la cápside, presencia o ausencia de envoltura y las dimensiones del virion y cápside (Beuret, 2002). La clasificación de Baltimore en cambio clasifica a los virus acorde al sentido y composición del ácido nucleico en siete grupos arbitrarios: Virus de Cadena doble de ADN, Cadena simple en sentido positivo de ADN, Cadena doble de ARN, Cadena simple en sentido positivo de ARN, Cadena simple en sentido negativo de ARN, Cadena simple en sentido positivo de ARN con ADN intermediado en el ciclo vital, Cadena doble de ADN con ARN intermediado (Beuret, 2002). Para más detalles observar el anexo 1

2.2.1 Virus de Plantas

Los virus de plantas también son parásitos intracelulares obligados como otros virus que utilizan la maquinaria del hospedero para su replicación, se encuentran ampliamente distribuidos y son importantes para la economía agrícola al ser los causantes de enfermedades provocando pérdidas en la producción y calidad de los cultivos (Rajarshi *et al.*, 2016).

El primer virus de plantas en descubrirse, estudiarse y cristalizarse fue el *Virus del mosaico del tabaco*, TMV por sus siglas en inglés *Tobacco mosaic virus*, Adolf Mayer en 1882 describió una condición de enfermedad mientras estudiaba plantas de tabaco a la cual denominó “enfermedad del mosaico” conociéndose actualmente que el agente causal es el virus TMV; él afirmó que excluía a enfermedades fúngicas y bacterianas como causantes y especuló un principio infeccioso basado en enzimas solubles implicado

(Rajarshi *et al.*, 2016). Iwanowski en 1892 basándose en los estudios de Mayer pasó extractos de plantas de tabaco enfermas con mosaico por filtros para bacterias y observó que la enfermedad continuaba transmitiéndose (Rajarshi *et al.*, 2016); en 1898 Beijerinck decide repetir el experimento de Iwanowski y denomina al agente causal como *contagium vivum fluidum* (latín para “Fluido vivo contagioso”) (Beinkerinck, 1898), término que se acuñó como virus diferenciándolo de bacterias y que es usado hasta la actualidad.

Hoy en día se conoce que al menos de los cuatro mil virus descritos en el mundo, mil corresponden a virus de plantas (Gergerich y Dolja, 2008). Las enfermedades virales presentan síntomas variables dependiendo del hospedero aunque el más común es el amarillamiento de las hojas, además de algunos síntomas como amarillamiento en forma de mosaico, ampollamiento (deformación), enrollamiento de las hojas, anomalías en las flores y frutos (Rajarshi *et al.*, 2016).

La transmisión puede darse mediante diferentes vectores como insectos, semillas infectadas, indumentaria contaminada e injertos de plantas enfermas (Morales *et al.*, 2006). Se ha demostrado que ciertos insectos como los áfidos (pulgones) y moscas blancas (*B. tabaci* y *T. vaporariorum*) son vectores de virus en cultivos de importancia económica; los virus transmitidos por *B. tabaci* generalmente son de la familia *Geminiviridae*, contagiando más de 150 virus del género *Begomovirus*, *Crinivirus*, *Carlavirus* e *Ipomovirus* (Morales *et al.*, 2006).

No todos los virus propagados mediante insectos son diseminados de la misma manera y para ello se han considerado dos divisiones: virus “no persistentes” y “semi-persistentes” (Morales *et al.*, 2006). Los primeros pueden adquirirse por el insecto al succionar la savia de una planta enferma y transmitir la enfermedad en cuestión de segundos a una planta sana, capacidad relatada a áfidos y que no es posible controlar mediante insecticidas; mientras que los “semi-persistentes” son transmitidos en su mayoría por moscas blancas donde el tiempo de adquisición y transmisión

del virus toma mayor tiempo desde minutos a horas haciendo posible un control con pesticidas (Morales *et al.*, 2006).

La concentración de las partículas virales es un factor a considerar, según Bawden, (1964) más de un millón de partículas virales son necesarias para la producción de una lesión local inclusive en hojas altamente susceptibles.

El control de enfermedades virales en plantas no ha tenido éxito alguno a nivel de campo donde la única solución del agricultor es exterminar la planta enferma para evitar su diseminación (Tamayo, 2011).

2.2.2 Virus de Plantas en Agua

Han pasado solo 30 años desde que los virus fitopatógenos fueron evidenciados por primera vez en ambientes acuáticos (Mehle y Ravnikar, 2012). Se aislaron partículas virales de ríos y lagos tanto de Inglaterra como de Alemania por Koenig y Lesemann (1984), quienes fundamentaron su existencia y supervivencia fuera del hospedero, proceso que se considera hasta la actualidad desconocido.

La cantidad de volumen de agua que se recolectaba era aleatorio y dependía de la capacidad de procesamiento, Koenig y Lesemann utilizaron entre doscientos y trescientos mililitros. Hong *et al.*, (2000) mencionan que para el análisis de Adenovirus y Enterovirus es necesario un volumen entre los setenta y trescientos litros, mientras que Gerba *et al.*, (1978) indican volúmenes entre los diez y mil litros. La técnica de filtrado y centrifugación es la más utilizada acompañada de microscopía electrónica, debido a que los métodos cuantitativos para la detección de virus en largos volúmenes de agua no fueron disponibles hasta después de 1970 cuando se desarrolló la técnica PCR (Polimerase Chain Reaction) para muestras de agua (Cerbo, 2007).

La determinación de la cantidad de virus infecciosos dilucida su riesgo en muestras ambientales (Hong *et al.*, 2000). Se ha comprobado que tratamientos terciarios de agua son incapaces de eliminar partículas virales y

si hablamos de virus fitopatógenos, el agua de riego al no considerarse de bebida solo pasa los tratamientos primarios y secundarios que no eliminan la carga viral (TULAS, S/A).

La transmisión de virus de plantas mediante medios acuáticos puede deberse a varios factores: la contaminación de aguas de riego con heces fecales de humanos y animales que hayan consumido plantas enfermas (Zhang *et al.*, 2006) o la distribución mediante raíces de plantas enfermas hacia el suelo y agua subterránea, logrando sobrevivir por largos periodos de tiempo (Koenig y Lesemann, 1985). Estudios realizados en purificados de los virus ToMV, TMV, CRSV, TBSV, CaRMV y PVX aislados de medios acuáticos demuestran que permanecen estables entre 50 a 3000 días en el agua (Brunt *et al.*, 1996).

La existencia de los virus fitopatógenos es un tema aún no descrito en su mayoría, debido a que no se comprende en su totalidad los procesos involucrados en su supervivencia. La vida del virus fuera del hospedero es un misterio si se considera que los mismos requieren de la maquinaria celular para realizar funciones vitales.

Gerba (2007) señala que los factores que afectan la supervivencia de virus entéricos son: temperatura, luz, pH, sales, materia orgánica, sólidos suspendidos o sedimentos, interfaces aire-agua y otros factores biológicos.

El factor temperatura se considera el más importante debido que afecta el rango al cual sucede la denaturación de proteínas y ácidos nucleicos así como también las reacciones químicas que en general pueden degradar la cápside (Gerba, 2007). Acorde a Kutz y Gerba, (1988) las temperaturas frías cercanas a la congelación permiten la supervivencia de virus por varios meses como se demostró en estudios de ToMV en hielo glacial (Castello *et al.*, 1995).

La mayoría de virus son estables al pH natural de las aguas ambientales (oscila entre 5-9), lo cual puede depender del espécimen. En cuanto a luz UV, los virus con doble cadena de ADN pueden sobrevivir a

estas condiciones extremas porque pueden utilizar las enzimas reparadoras del hospedero para restaurar el daño provocado (Gerba *et al.*, 2002). En relación a sales minerales en su mayoría los virus sobreviven mejor en agua fresca que en agua de mar (Gerba *et al.*, 2002).

La asociación para la supervivencia es un factor que puede favorecer o desfavorecer a los virus. Estudios han mostrado la adsorción de virus en arena, arcilla pura, células bacterianas, hongos, particulados, materia orgánica, limo, etc. (Smith *et al.*, 1978). Las arcillas de benonita son más adecuadas para la supervivencia de virus de ARN debido a su capacidad de adsorción de enzimas, evitando la inactivación por ribonucleasas (Singer y Fraenkel-Conrat, 1961).

La transmisión de virus por medios acuáticos se ha dejado de lado y con el incremento del uso de cultivos hidropónicos ha cobrado fuerza en los últimos años, los cultivos hidropónicos son una solución eficaz para agricultores que enfrentan problemas relacionados al suelo como nematodos, patógenos y deficiencia de nutrientes entre otros (Mehle y Ravnika, 2012).

Miembros del género *Tobamovirus* han sido previamente detectados en medios acuáticos, el *Virus del mosaico del tomate* (ToMV) se considera el más frecuente dado a su estabilidad y un alto rango de hospederos, que ha sido aislado tanto de plantas como de suelo, agua, nubes, niebla e inclusive hielo glacial (Castello *et al.*, 1999) (Castello *et al.*, 1995).

Los *Tobamovirus* sobreviven durante largos periodos de tiempo bajo condiciones favorables que permitan la conservación; el aislamiento de un *Tobamovirus* infeccioso (Kleger *et al.*, 1994 citado por Catello) sugiere que ToMV puede encontrarse en océanos y demás fuentes hídricas.

El género *Tombusvirus* ha sido aislado previamente de aguas superficiales, de los cuales se conocen los hospederos naturales; mientras que otros como *Neckar river virus* aislado por Koenig y Lesemann en 1985, *Lato river virus* aislado por Gallitelli y colaboradores en 1989 y el *Sikte*

waterborne virus (Li *et al.*, 1992) no tienen un hospedero específico descrito (Koenig *et al.*, 2003) pero provocan lesiones cloróticas en plantas modelo entre ellas *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana clevelandii* (Tomlinson y Faithfull, 1984).

En cuanto a miembros del género *Potexvirus* hay reportes de experimentos realizados por Mehle *et al.*, (2014) donde se colocó macerados de plantas infectadas con dos genotipos de *Virus del mosaico del pepino* (PepMV) en agua destilada que fue agitada por dos horas y luego incubada en condiciones de invernadero, mediante RT- qPCR se comprobó la supervivencia de PepMV por al menos tres semanas. Mehle y colaboradores (2014) también investigaron la transmisión mediante agua a plantas sanas, al pasar agua contaminada por cultivos hidropónicos y determinaron la presencia del virus en raíces y tubérculos de papa.

Koenig y Lesemann (1985) además reportaron un virus fitopatógeno que denominaron como un nuevo *Potexvirus* aislado del río Sieg de Alemania, apelando a la estabilidad del virión en el agua (tras microscopía electrónica) y la infectividad activa al inocular plantas de *Chenopodium quinoa* y *Nicotiana clevelandii*.

Los tres géneros de virus de plantas que se analizarán en esta investigación se describen a continuación:

2.2.2.1 Género *Potexvirus*

Antecedentes del género

Potexvirus es un género de virus de plantas descrito en 1994, pertenece a la familia Flexiviridae y provoca síntomas de mosaico y manchas en forma de anillo (NCBI, 2016), recibieron el nombre de *Potexvirus* al ser descrito por primera vez el Virus X de la papa (Potato Virus X, PVX) (Koenig, 2012). Todos los *Potexvirus* son encontrados en el lugar donde crecen sus hospederos. Las plantas infectadas presentan mosaicos, necrosis, manchas en forma de anillo o enanismo y en ciertas ocasiones se presentan asintomáticos (Ryu y Hong, 2008 citado por Mahy y Van

Regenmortel, 2010). En su mayoría, los *Potexvirus* no son transmitidos por vertebrados, invertebrados o vectores fúngicos (Mahy y Van Regenmortel, 2010), razón por la cual se cree que su transmisión está relacionada con los medios acuáticos.

Taxonomía

Potexvirus es el noveno miembro de la familia *Alphaflexiviridae*, el género posee más de 30 miembros definitivos y otros posibles miembros, donde PVX es el miembro típico (ICTV, 1975); (Taylor, 1998). La clasificación taxonómica dada por el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), 2015 ubica a *Potexvirus* de la siguiente manera:

Reino: Virus

Orden: Tymovirales

Familia: *Alphaflexiviridae*

Género: *Potexvirus*

El género contiene alrededor de 28 virus de plantas con ssRNA (Park, Seo y Kim, 2013).

Expresión Genética

Cada partícula viral posee una cadena simple de sentido positivo de ARN de longitud de 5845-7015 nucleótidos, que está envuelta en alrededor de 1000-1500 moléculas de una especie simple de proteína de cápside (CP) (Foster y Taylor, 1998). La partícula tiene una estructura helicoidal con 8.75 subunidades de proteínas por vuelta, son flexibles y filamentosos (SIB, 2008), la figura 3 muestra la estructura del virión del *Potexvirus*.

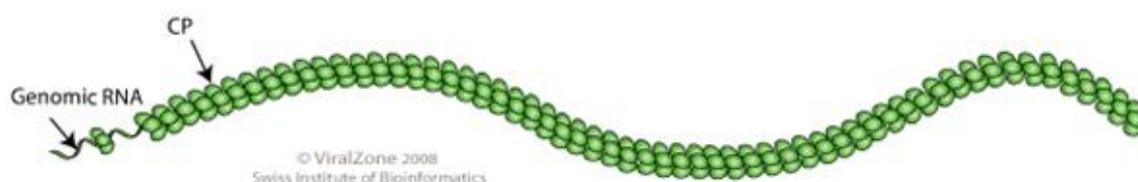


Figura 3: Virión de *Potexvirus*, sin envoltura, flexible y filamentoso (SIB, 2008).

El virión tiene alrededor de 13 nm de diámetro y 470-580 nm de longitud (Park, Seo y Kim, 2013). El ARN genómico consiste en una cadena simple de ARN con sentido positivo (ssRNA (+)) que contiene una envoltura en forma de tapa en el extremo 5' y es poliadenilado en el extremo 3', las regiones N- y C- terminal de las proteínas de cápside son variables (Foster y Taylor, 1998), además tiene un límite 5' y cola 3' poly (A) (Park, Seo y Kim, 2013).

En este género se han identificado cinco open reading frames (ORFs): ORF1 codifica una proteína que contiene tres motivos de aminoácidos característicos del dominio conservado de metiltransferasa, NTP-binding helicasas y ARN-dependiente de ARN polimerasas; ORFs 2-4 se sobrelapan entre ellas y son conocidas como el triple bloque de genes (triple gene block). Todos los productos de los tres ORFs son necesarios para la infección en la planta hospedera y se cree que pueden estar involucrados en el movimiento de célula a célula (Foster y Taylor, 1998). ORF 5 es el ORF 3' terminal y codifica la CP (Foster y Taylor, 1998). La figura 4 muestra la estructura del genoma viral de *Potexvirus*.

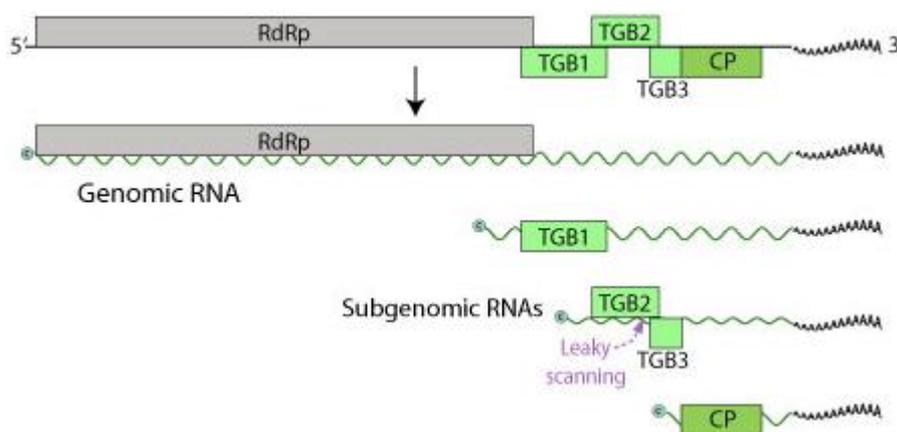


Figura 4: Genoma lineal ssRNA (+) de *Potexvirus* (SIB, 2008).

Replicación viral

La replicación se produce tras la penetración del virus en el hospedero, se inserta el ARN genómico en el citoplasma para ser traducido a mRNA (ARN mensajero) para producir RdRp, los factores virales producidos por la proteína TGB1 que transforma la cadena simple de ARN (+) (ssRNA (+)) en una doble cadena de ARN (dsRNA); al final se ensambla una nueva partícula viral y las proteínas en triple bloque de genes TGBp (Triple gene block proteins) permiten la transferencia del virus a otras células y movimiento en largas distancias (SIB, 2008).

Infección y Rango de Hospederos

En el genoma del *Virus X de la papa* (PVX) se ha demostrado que la proteína TGBp1 (Triple gen Block protein 1) funciona como un supresor de ARN de silenciamiento inhibiendo la ruta PTGS (ViralZone, S/A) (Park, Seo y Kim, 2013).

En cultivos de tomate de árbol se ha registrado *Potato aucuba mosaic virus* (PAMV, *Potexvirus*) (Jaramillo et al., 2011), donde la composición base del ARN es similar a PVX (Koenig y Lesemann, 1978, citado por Koenig, 2012).

Dentro de este género se encuentran especies que afectan a cultivos de bambú, cactus, narcisos, trébol, lechuga, papaya, pepino, papa, tulipanes, fresas, entre otros (ICTV, 2015).

2.2.2.2 Género *Tombusvirus*

Antecedentes del género

Tombusvirus es uno de los 16 grupos de virus de plantas establecido en 1971 (Foster y Taylor, 1998). Su nombre deriva de la sigla “tombus” de *Tomato bushy stunt virus*, es el miembro tipo del grupo y tras investigaciones se clasificó como género *Tombusvirus* y se colocó dentro de la Familia *Tombusviridae* junto al género *Carmovirus* acorde a lo aprobado por el ICTV en el Noveno congreso de Virología en Glasgow de 1993 (Foster y Taylor, 1998).

Taxonomía

Acorde al ICTV, 2015 la clasificación taxonómica de Tombusvirus se considera de la siguiente manera:

Reino: Virus

Orden: No asignado

Familia: *Tombusviridae*

Género: *Tombusvirus*

Expresión Genética

Los miembros de la Familia Tombusviridae se caracterizan por un genoma compuesto por una cadena simple de ARN con sentido positivo, ssRNA(+), no presentan envoltura y su cápside tiene forma icosaédrica (figura 5), el tamaño del virión oscila entre los 28-35 nm (King et al., 2012). El genoma de los miembros de esta familia puede ser un segmento lineal con un tamaño de 9.7 a 1.8 Kb y/o poseer dos segmentos lineales que pueden ser monopartidos: 3.7 a 4.8 Kb o bipartidos: 3.8 a 1.4 Kb (King et al., 2012).

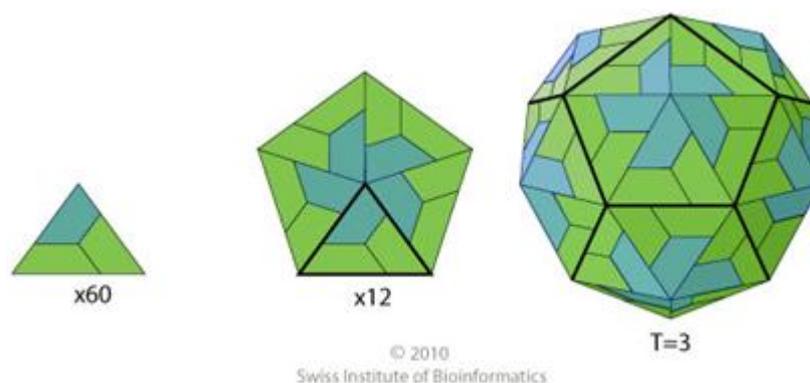


Figura 5: Cápside icosaédrica de *Tombusviridae* (SIB, 2010).

El virión de ARN es infeccioso y sirve al mismo tiempo como genoma y ARN mensajero viral. Dos ORFs del extremo 5' son directamente traducidos para generar los constituyentes virales del complejo de replicación. RdRp es traducido mediante la supresión del terminal de ORF1, los genes codifican el movimiento de las proteínas, la supresión del

silenciamiento de ARN y las proteínas de la cápside son traducidas a ARN subgenómico (SIB, 2010), como se observa en la figura 6.

Replicación viral

La replicación se produce en el citoplasma del hospedero, el ARN viral es traducido para fabricar las dos proteínas necesarias para la síntesis de ARN, tras la generación de dsRNA se produce nuevo mRNA y ssRNA(+). La RdRp reconoce los promotores sub genómicos internos en el ARN de sentido negativo y transcribe ARNs 3'coterminales que forman la cápside y las proteínas de movimiento (SIB, 2010). El ensamblaje del virus se produce en el citoplasma y se cree que las proteínas de movimiento probablemente intervienen en la transferencia de célula a célula (SIB, 2010).

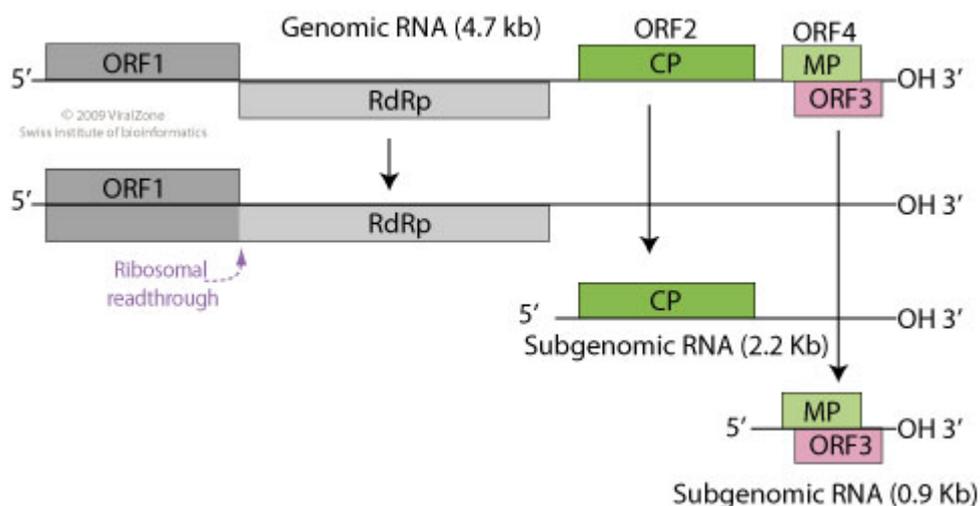


Figura 6: Genoma de *Tombusviridae*, monopartido lineal ssRNA (+) (SIB, 2010).

Infección y Rango de Hospederos

El rango de hospederos naturales es reducido y restringido a dicotiledóneas, aunque el rango de hospederos artificiales es amplio y compromete a varias especies de plantas entre ellas 20 diferentes dicotiledóneas y monocotiledóneas (Foster y Taylor, 1998). La mayoría de especies de *Tombusvirus* se encuentran en regiones templadas donde la partícula viral es estable, altamente infecciosa y fácilmente transmisible

mediante medios mecánicos; a menudo se encuentran en ambientes naturales como suelos y aguas superficiales de donde se cree que se transmiten hacia la planta hospedera sin la ayuda de un vector (Foster y Taylor, 1998).

Dentro de este género se encuentran 17 especies de virus patógenos que afectan a cultivos de pepino, uva, berenjena y ciertas especies de la familia Pelargonium (ICTV, 2015).

2.2.2.3 Género *Tobamovirus*

Antecedentes del género

El miembro tipo de *Tobamovirus* es el *Virus del mosaico del Tabaco* (*Tobacco mosaic virus*, TMV) y fue descrito por primera vez por Mayer en 1882 (ICTV, 2015).

El género se encuentra distribuido alrededor del mundo, se ha utilizado como un modelo útil para explorar la resistencia debido a que es estable en diferentes ambientes como suelo (descrito por Fillhart *et al.*, 1998), en niebla y nubes (Castello *et al.*, 1995) y agua fresca (Jacobi y Castello 1991).

Los miembros de este grupo producen síntomas característicos como mosaicos cloróticos o manchas en forma de anillo que se acompañan de distorsión de hojas y frutos (Foster y Taylor, 1998).

Taxonomía

El miembro tipo del grupo *Tobamovirus* es el *Tobacco mosaic virus* aceptado por el ICTV en el tercer congreso de 1975.

Reino: Virus

Orden: No asignado

Familia: *Virgaviridae*

Género: *Tobamovirus*

Expresión Genética

El genoma de TMV está compuesto por ARN de cadena simple de 6,395 nucleótidos que contienen cuatro ORFs (figura 7), las partículas rígidas y de forma redonda con dimensiones aproximadas de 300 x 18 nm. Se observa un virión en la figura 6 (Foster y Taylor, 1998).

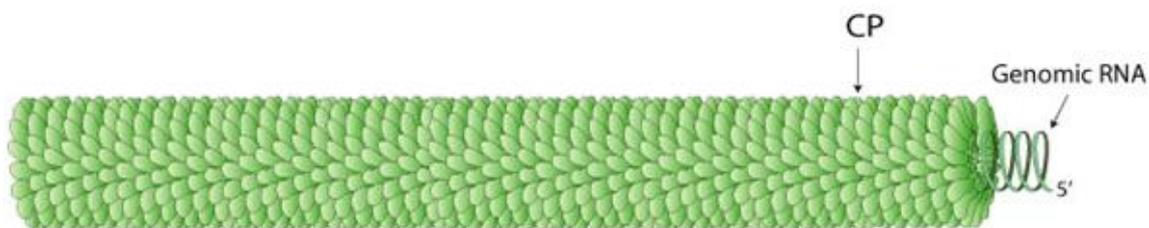


Figura 7: Virión de *Tobamovirus*, sin envoltura con simetría helicoidal (SIB, 2010).

Replicación viral

La replicación se produce en el citoplasma iniciando con el ingreso de la partícula viral a la célula hospedera (SIB, 2010).

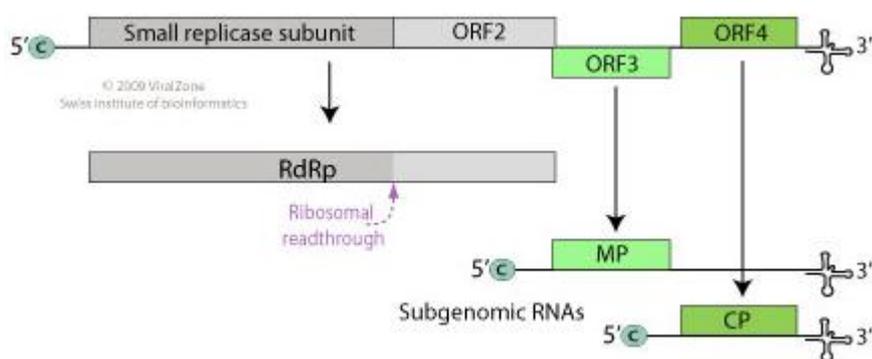


Figura 8: Genoma monopartido de *Tobamovirus*, ssRNA (+) (SIB, 2010).

Infección y Rango de Hospederos

La información sobre el rango de hospederos, la distribución y dispersión mediante medios de agua, suelo y aire son desconocidas para este género de virus, y se requiere mayor investigación en esta área (Jacobi et al., 1998).

Se ha descrito a *Tomato mosaic virus* (ToMV, *Tobamovirus*) como patógeno de cultivos de tomate de árbol (Jaramillo et al., 2011).

En el género *Tobamovirus* se encuentran 35 especies entre las cuales se encuentran virus patógenos de pimienta, cactus, pepinillo, maracuyá, paprika, tabaco, tomate, wasabi y zuquini, entre otros (ICTV, 2015).

2.3 Síntesis de ADN complementario mediante Transcripción Inversa de la Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

La Transcripción inversa de la Reacción en cadena de la Polimerasa conocida como RT-PCR por sus siglas en inglés Reverse transcription polymerase chain reaction, es una técnica de biología molecular utilizada para convertir ARN genómico en ADN complementario o cDNA, la técnica ha revolucionado la biología molecular y se aplica en variedad de ensayos, inclusive la industria alimentaria aplica RT-PCR para detectar patógenos en alimentos, productos modificados genéticamente y alérgenos (Sethi, 2011).

La técnica utiliza la enzima transcriptasa reversa (reverse transcriptase) que es dependiente de la ADN polimerasa y realiza las siguientes reacciones: síntesis de ADN a partir de un molde de ARN, remoción de los restos de ARN (actividad RNasa) y síntesis de una segunda hebra de ADN complementario (Gerrit et al, 2005). Dicha enzima se descubrió en el ciclo de replicación de los Retrovirus que convierten su ARN genómico en ADN que puede integrarse dentro del genoma de la célula hospedera; los reactivos comerciales que se usan comúnmente provienen de retrovirus AMV (*Avian myeloblastosis virus*) y M-MuLV (*Moloney murine leukemia virus*), además se utiliza la Tth polimerasa que es una enzima aislada de la bacteria *Thermus thermophilus* la cual es lábil a altas temperaturas permitiendo que se realice la RT-PCR (Gerrit et al., 2005).

Esta técnica presenta la ventaja de amplificar copias específicas de ARN mensajero (mARN) de pequeñas cantidades de muestras biológicas sin la necesidad de un riguroso proceso de extracción, siendo un método rápido, preciso y simple de realizar (Walker y Raply, 2009).

2.4 Hipótesis

Los afluentes de aguas de riego de tomate de árbol contienen virus patógenos de plantas y son una potencial fuente de contaminación de los cultivos.

2.5 Cuadro de operacionalización de las variables

La operatividad de las variables y sus factores a determinar se indican en la siguiente tabla.

Tabla 1.

Variables y factores a determinar.

Variables		Factor a determinar
Independiente	Virus patógenos de plantas	Especies de virus patógenos de plantas determinados.
	Secuencias Amplificadas	Número de amplicones obtenidos.
Dependiente Biomasa seca	Presencia de enfermedad	Síntomas de virosis.
	Secuencias alineadas	Género de virus y especie.

CAPÍTULO III

3 METODOLOGÍA

3.1 Zona de estudio

3.1.1 Obtención de muestras

Se recolectaron plantas con síntomas de virosis y agua de riego en dos zonas de cultivo de Pichincha: en la Granja Experimental Tumbaco del

Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Programa Nacional de Fruticultura (Av. Interoceánica km 14 1/2, Tumbaco, 00°12'56" Sur 78°24'44" Oeste) denominado Reservoirio 1 y de la Granja La Morita de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central del Ecuador, denominado Reservoirio 2.



Figura 9: Reservoirio 1 de la Granja Experimental Tumbaco INIAP.

Las muestras de plantas con síntomas de virosis se colectaron en sobres de papel y se almacenaron discos de cada hoja (aprox. 5 mm) en tubos falcon de 15 ml con sílica gel indicador naranja (para evitar humedad) y papel filtro estéril. Los tubos fueron almacenados a -80°C .

3.1.2 Trabajo de laboratorio

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE ubicado en la Av. General Rumiñahui S/N y Sector Santa Clara, con coordenadas: $0^{\circ}18'53''\text{S } 78^{\circ}26'36''\text{O}$.

3.2 Período de Tiempo de Investigación

La recolección y procesamiento de muestras se llevó a cabo desde agosto del 2016 hasta febrero del 2017.

3.3 Técnicas de Concentrado Viral

Se realizaron cinco muestreos de agua de riego y dos de muestras de plantas de tomate de árbol durante los meses de agosto a febrero, se midieron las condiciones de temperatura y pH del agua, y se utilizaron dos técnicas de concentración viral:

3.3.1 Método de Floculación con Leche Descremada (Skimmed Milk, SKM):

La concentración de virus se realizó siguiendo el método expuesto por Calgua *et al.*, (2008), adaptado para detección de virus fitopatógenos.

Se colectaron diez litros de agua y se midió *in situ* parámetros como temperatura y pH; en el laboratorio se ajustó el pH a 3,5 (± 1), con la adición de HCl concentrado usando agitación para después colocar el pre-flóculo elaborado a base de sal marina y leche descremada al 1% (Anexo 3).

Las muestras se agitaron por 8 h a temperatura ambiente, seguidas de un período de decantación de los sedimentos durante toda la noche. El sobrenadante se removió procurando no agitar el sedimento, se colectó en tubos falcón de 50 mL y se centrifugó a 6000 x *g* por 30 min a 4°C. El pellet se diluyó en buffer fosfato 0,2 M a pH 7,5, hasta alcanzar un volumen final de 10 mL. El concentrado fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento.



Figura 10: Contenedores de 10 litros con pre-flóculo de leche descremada en agitación por 8 horas a temperatura ambiente.

3.3.2 Método de Precipitación con Polietilenglicol (PEG):

Se adaptó el método de Li *et al.*, (1998) para virus fitopatógenos. Mediante bomba de agua se colectaron sesenta litros de agua de riego en recipientes plásticos que se colaron en un filtro casero de 0,1 a 10 micrones (para eliminar sólidos finos y ciertas bacterias), el filtrado se colectó en recipientes plásticos y se ajustó el pH del mismo a 6,5 (± 1).

Se adaptó un filtro casero rellenándolo con lana de vidrio sin cobertura, la lana de vidrio fue previamente remojada en buffer PBS pH 6,5 un día anterior al muestreo.

El agua filtrada con pH ajustado pasó nuevamente por el filtro de lana de vidrio (que tiene la función de atrapar las partículas virales) y fue desechada. La lana de vidrio se almacenó a 4°C hasta su procesamiento.

En el laboratorio se colocaron 7 mL de Polietilenglicol por cada 100 ml de buffer PBS (Buffer Fosfato Salino) a pH 10. Se agitó por dos horas para homogeneizar la mezcla y se agregó la lana de vidrio dejando remojar por media hora. Se comprimió la lana de vidrio para expulsar el buffer absorbido y se colectó en tubos falcón de 50 mL. Se centrifugó a 6000 x *g* por 30 min a 4°C y el pellet fue re suspendido en buffer PBS a pH 10, hasta alcanzar un volumen final de 10 mL.

El concentrado viral fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento.

3.4 Extracción de ácidos nucleicos (ARN):

3.4.1 Extracción de ARN de muestras vegetales:

Se pulverizó alrededor de 100 mg de hoja (alrededor de 10 discos de 5 mm) y se siguieron los pasos descritos por el kit comercial Plant Total RNA Extraction Miniprep System de DNALand Scientific Green Bioresearch (ver anexos).

Seguida la extracción de ARN se almacenaron las muestras a -80°C.

3.4.2 Extracción de ARN de Concentrado viral:

Se utilizaron 600 μ l de concentrado viral (basándose en lo expuesto por Kobs, (1998) para la extracción de ARN y se trabajó acorde al kit comercial Plant Total RNA Extraction Miniprep System de DNALand Scientific Green Bioresearch.

Para evitar la degradación de la muestra, el ARN obtenido fue colocado en hielo para ser transformado inmediatamente a ADN complementario (cDNA).

3.5 Síntesis de ADN complementario mediante Transcripción Inversa (RT-PCR)

Se empleó el kit M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen® para la síntesis de ADN complementario y se utilizó un volumen de reacción de 20 μ l. Acorde al kit se puede usar entre 1 ng-5 μ g de ARN total o 1-500 ng de ARNm.

Se prepararon dos buffers A y B para la síntesis de la cadena simple de ADN complementario, se describe en tabla 2.1 y 2.2

Tabla 2.

Concentraciones de Buffer A para RT-PCR.

Reactivo	Cantidad 1Rx (μl)
50-250 ng Random primers	0.5
10 mM dNTP Mix (10 mM cada dATP, dGTP y dTTP a pH neutro)	1
Agua destilada RNase free	5.5
Total ARN	5

Los componentes del Buffer A se agregaron a un tubo libre de nucleasas y se incubó la mezcla a 65°C por 5 min, transcurrido el tiempo se

hizo choque térmico en hielo, se centrifugó brevemente para colectar los contenidos y se añadió el Buffer B.

Tabla 3

Concentraciones de Buffer B para RT-PCR.

Reactivo	Cantidad 1Rx (µl)
5X First- Strand Buffer	4
0.1 M DTT	2
RNaseOUT (40 unidades /ul)	1

Se mezclaron gentilmente los contenidos y se incubó por 37°C por 2 min, se agregó 1 µl (200 unidades) de M-MLV RT mezclando por pipeteo y se incubó de nuevo por 25°C por 10 min. Se incubó por 50 min a 37°C para activar la enzima y se inactivó la reacción incubando a 70°C por 15 min.

La calidad y cantidad del ADN complementario se evaluaron mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 8000 Thermo Scientific® y fue almacenado a -20°C para ser utilizado posteriormente como molde para amplificación en PCR.

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

La preparación de la reacción para PCR y las condiciones para la amplificación de los tres géneros de virus se basaron en el protocolo descrito por Olmedo-Velarde & Ochoa-Corona, 2016 y se detallan en la tabla 4 y 5

Tabla 4

Master Mix para los tres géneros de virus.

Reactivo	Concentración final	Cantidad 1Rx (µl)
H₂O ultra pura	-	3
GoTaq® Green Master Mix	2X	12.5

Continua.

Primer Forward	10 μ M	1.5
Primer Reverse	10 μ M	1.5
MgCl₂	25Mm	1.5
cDNA	40 ng/ul	5
Volumen Total		25

Las condiciones para cada par de primers variaron acorde al género como se observa en la tabla 5

Tabla 5

Condiciones de Amplificación.

Género	“Forward”	“Reverse”	Condiciones	Tamaño (pb)
<i>Potexvirus</i>	GAYGGIGCIATGCTICA ITT	TCIGTRTTIGCRTCAA IGT	97°C / 2 min	169
			47°C / 30	
			seg	
			72°C / 30	
			seg	
<i>Tombusvirus</i>	TGGATATTIATGGTTG CIGGTT	GTAGGTTGTGGAGTG CGAG	97°C / 2 min	143
			47°C / 30	
			seg	
			72°C / 30	
			seg	
<i>Tobamovirus</i>	GGWGAYGTNACIACIT TIAT	ARYTTIGCYTCIAARTT CCA	97°C / 2 min	191
			52°C / 30	
			seg	
			72°C / 30	
			seg	
			35 ciclos	

Diseño de los primers Ochoa-Corona, 2016.

Adicional a las muestras de agua, se amplificaron muestras de plantas enfermas con virosis de babaco (*Vasconcella x heilbornii*), aquellas positivas para los tres géneros fueron usadas como controles positivos.

Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 2% con buffer SB 1X (anexo 3) que se dejaron correr a 200V por 25 minutos.

Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder, Low DNA mass ladder Invitrogen® y el buffer de carga Blue Juice 10X Invitrogen®.

3.7 Identificación de virus mediante Secuenciación de ADN complementario

Se enviaron alrededor de 20 µl de productos amplificados para la secuenciación mediante el método de Sanger en MacroGen-Humanizing Genomics®. Los resultados de las secuencias obtenidas se analizaron mediante un software especializado (Geneious) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparando las secuencias obtenidas con organismos ya descritos en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Análisis de resultados

4.1.1 Recolección de muestras y Técnicas de concentrado viral.

Se realizaron 5 recolecciones de muestras de agua de riego y dos de muestras de plantas de tomate de árbol. Las temperatura del reservorio 1

osciló entre los 18 - 20°C, el pH fue alrededor de 7-9, mientras que para el reservorio 2 la temperatura fue de 19-20°C con pH entre 7-8.

Las dos técnicas de concentrado viral permitieron la identificación de dos géneros de virus (*Potexvirus* y *Tombusvirus*), la técnica de floculación con leche descremada (SKM) se observa en la siguiente figura.



Figura 11: Flóculo formado tras precipitación durante toda la noche con leche descremada y el precipitado obtenido (*pellet*) tras centrifugación a alta velocidad.

Las hojas y frutos de tomate de árbol recolectadas aleatoriamente presentaron síntomas de virosis (clorosis en forma de mosaico, deformación foliar y endurecimiento de fruto), figuras 12 y 13.

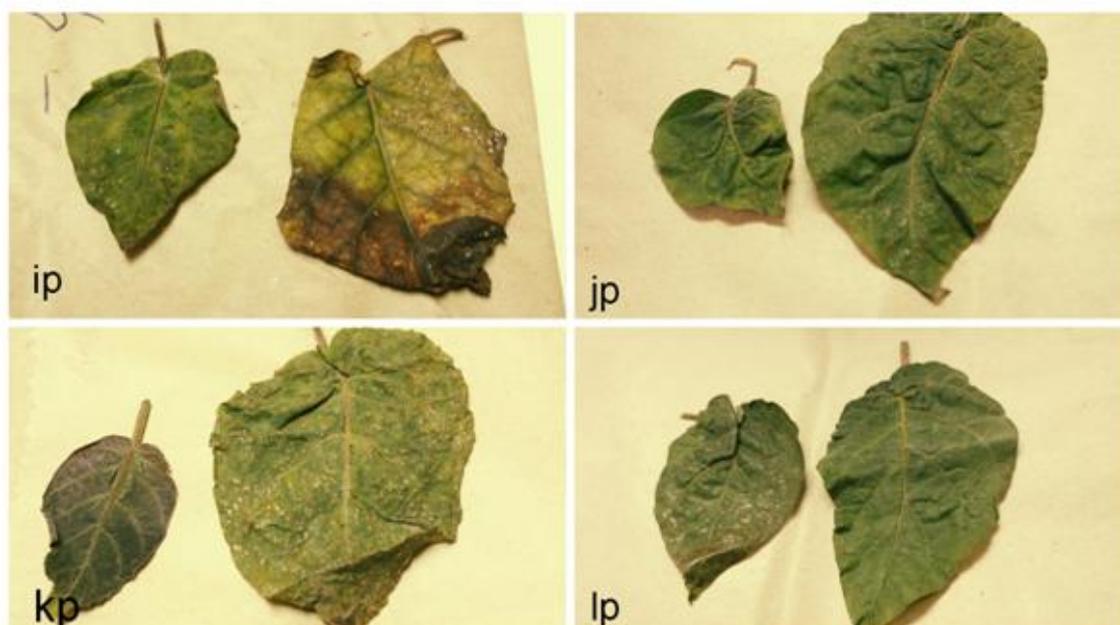


Figura 12: Hojas de tomate de árbol recolectadas en La Morita, fue asignado un código para cada planta: ip (planta 4), jp (p-6), kp (p-7) y lp (p-10).

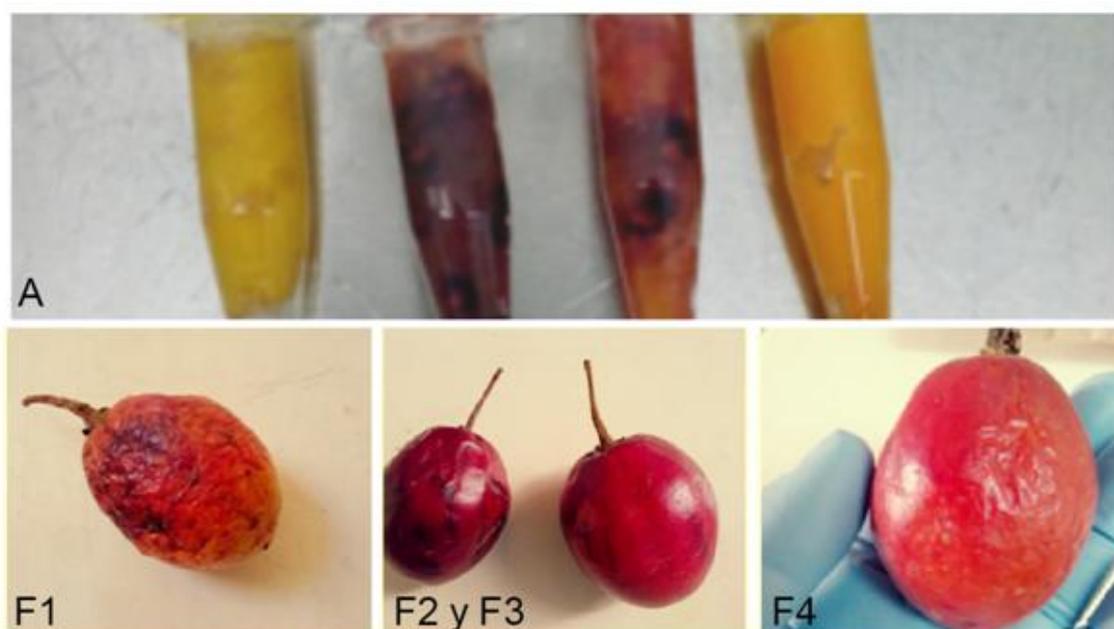


Figura 13: Frutos de tomate de árbol recolectados en la Granja experimental Tumbaco, fue asignado un código para cada planta: F1, F2, F3 y F4; en A se observa el cambio de coloración entre cada muestra empezando desde F1 hasta F4.

4.1.2 Síntesis de ADN complementario

El cDNA fue evaluado por espectrofotometría en el equipo Nanodrop 8000 (Thermofisher) donde los resultados en cuanto a calidad y cantidad se detallan en la tabla 6

Tabla 6.

Cantidad y Calidad de ADN complementario.

Tipo de muestra	Etiqueta de la Muestra	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230	Cantidad (ng/μl)
Hojas de tomate de árbol	ip	1,75	1,42	620
	jp	1,75	1,88	797,1
	kp	1,74	1,61	704,2
	lp	1,76	1,70	733,4
Frutos de tomate de árbol	F1	1,87	1,9	761,3
	F2	1,8	1,82	753
	F3	1,79	1,8	803,4
	F4	1,7	1,84	720,5
Reservorio 1 Granja experimental Tumbaco	SKM R1 31/10	1,66	1,64	698,9
	PEG FR1 31/10	1,71	1,85	785,1
	SKM R1 23/12	1,73	1,78	654,4
	PEG R1.1 06/02	1,74	1,6	745,6
Reservorio 2 La Morita	SKM R2S	1,78	1,64	698,8
	PEG R2S	1,68	1,6	568,3
	SKM R2E	1,82	1,78	569,6
	PEGR2E	1,8	1,76	688,3

4.1.3 Amplificación mediante Reacción en cadena de la Polimerasa

El cDNA de plantas de babaco fue usado como control positivo para el género *Potexvirus* tras amplificar con los primers degenerados para el género (figura 14) y ser comprobado mediante secuenciación.

Tras la amplificación con primers degenerados y revelación mediante geles de agarosa al 2% con buffer SB 1X, se detectaron miembros de los géneros *Potexvirus* y *Tombusvirus* en agua de riego del reservorio 1 (figuras 15, 16 y 17). En el reservorio 2 en la muestra PEG R2S se detectó mediante PCR un miembro del género *Potexvirus* del cual no se obtuvo secuencia

El género *Tobamovirus* no fue detectado tanto en muestras de agua de riego como plantas de tomate de árbol.

Las muestras jp y F3 de tomate de árbol resultaron positivas para *Tombusvirus* pero la baja calidad de las mismas no permitió la obtención de secuencias, en el resto de muestras no se detectó miembros de los tres géneros.

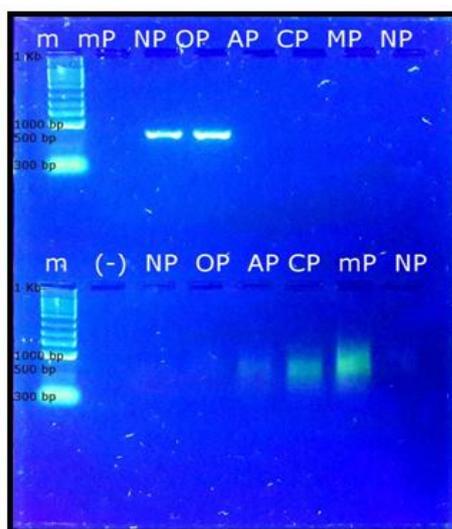


Figura 14: Amplificación de muestras de planta de babaco mediante PCR *Potexvirus*, en el primer piso se observan bandas positivas en NP y OP superiores al tamaño de fragmento esperado (169 pb). En el segundo piso se observa mayor cantidad de fragmentos de cDNA en AP, CP y mP.

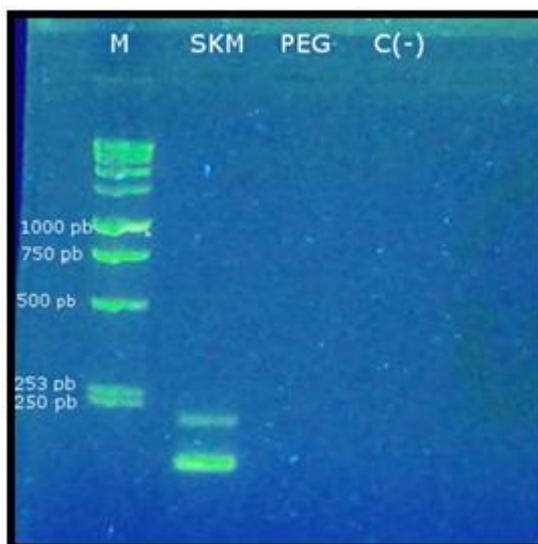


Figura 15: Amplificación de muestras del reservorio 1 mediante PCR *Potexvirus*, se observan bandas marcadas por debajo de los 250 pb en SKM (cDNA obtenido por Floculación con leche descremada) y ninguna banda en PEG (Precipitación con Polietilenglicol) y C (-).



Figura 16: Amplificación de muestras del reservorio 1 mediante PCR *Tombusvirus*, se observan bandas tenues por debajo de los 250 pb en PEG (Precipitación con Polietilenglicol sin filtrar) y SKM (Floculación con leche descremada). Presencia de banda alrededor de los 600pb para PEGF (Precipitación con Polietilenglicol filtrado) y C(-).

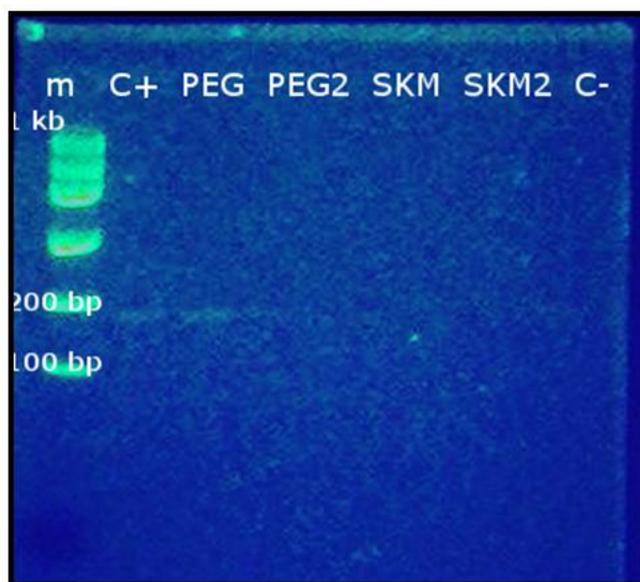


Figura 17: Amplificación de muestras del reservorio 1 mediante PCR *Potexvirus*. Se observan bandas tenues entre los 100 y 200 pb en la muestra PEG y C+ (babaco), ninguna banda en PEG2, SKM, SKM2 y C (-).

4.1.4 Identificación de virus mediante Secuenciación.

En las muestras jp y F3 (positivas para *Tombusvirus*) y la muestra PEG R2S (positiva para *Potexvirus*) la mala calidad de los amplicones no permitió la obtención de secuencias.

La búsqueda de secuencias mediante el programa Blast en la base de datos del NCBI para muestras de agua de riego reveló la presencia de tres géneros distintos de virus (Tabla 4.2).

Tabla 7

Resultados de Secuenciación.

Muestra	Género (NCBI)	Especie (NCBI)	Identidad NCBI nivel nucleótidos	Identidad NCBI nivel aa
Reservorio 1	<i>Mandarivirus</i>	<i>Indian citrus rinspot</i>	66%	81%

Continúa

SKM	s	<i>virus</i>		
Reservorio 1	<i>Tombusviru</i>	<i>Neckar river virus</i>	99%	98%
SKM	s			
Reservorio 1	<i>Tombusviru</i>	<i>Neckar river virus</i>	97%	93%
PEG	s			
Reservorio 1	<i>Potexvirus</i>	<i>Lagenaria mild mosaic</i>	76%	78%
PEG		<i>virus</i>		

SKM: Floculación con Leche descremada, PEG: Precipitación con Polietilenglicol.

4.2 Discusión de los resultados

Se recolectaron 10 litros de agua para el método de Floculación con leche descremada siguiendo el protocolo de Calgua *et al.*, (2008) y 60 litros de agua para el método de Precipitación con polietilenglicol sustentado con lo expuesto por Hong *et al.*, (2000) que utilizó entre 70 y 300 litros de agua del río Han para la detección de Adenovirus y Gerba *et al.*, (2007) que asevera que los virus son usualmente concentrados desde volúmenes que oscilan entre los 10 a 1000 litros.

El volumen de muestra puede ser inclusive menor a un litro, como lo demostró Koenig *et al.*, (2003) al aislar *Tombusvirus* solo con 500 mL de agua del río Han (Alemania) y con 200 a 300 mL de agua de varios ríos de Alemania (Koenig y Lesenmann, 1985).

En cuanto a la técnica de concentrado viral se contempló mayor facilidad de manejo con el método de Floculación con leche descremada, método que ha sido utilizado previamente para concentrar Adenovirus y demás Enterovirus (Calgua *et al.*, 2008) y que en la presente investigación fue usado para concentrar virus de plantas, demostrándose efectivo al permitir la detección de dos géneros *Mandarivirus* y *Tombusvirus* en el primer reservorio de agua.

El mismo método de floculación fue utilizado por Hong *et al.*, (2000) quien usó un pre-flóculo realizado a base de glicina y extracto de carne, el

extracto de carne fue descrito por Calgua *et al.*, (2008) como una matriz opcional a la leche descremada.

El uso de polietilenglicol para concentrar virus no es nuevo, fue expuesto en un inicio por Li *et al.*, (1998) en el aislamiento de virus entéricos. Posiblemente, fue utilizado en Adenovirus (Hong *et al.*, 2000) y adaptado para virus fitopatógenos por Gosalvez *et al.*, (2003).

Esta técnica resultó ser complicada de aplicar en campo al requerir bomba de agua, filtros, contenedores de 60 litros, medidor de pH y soluciones estabilizadoras de pH. Debido a la necesidad de acceso a conexión eléctrica para la bomba, en el caso del reservorio 1 hubo que trasladar los 60 litros de muestra. La precipitación con polietilenglicol permitió la detección de dos géneros *Potexvirus* y *Tombusvirus*.

Se realizó transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de las muestras de concentrado viral y planta pues los tres géneros de virus son de cadena simple en sentido positivo de ARN. Una vez extraído el ARN de las muestras se sometió inmediatamente a síntesis de cadena simple de ADN complementario para evitar degradación de la muestra, no se realizaron geles de agarosa para evitar contaminación ambiental.

Aunque el kit comercial utilizado para la extracción de ARN no contenía DNAsa como enzima inhibidora de ADN y no se realizó la purificación del ARN obtenido, se procedía a utilizar 5 µl de ARN (lo recomendado) en la reacción de síntesis de cDNA. Las mediciones en nanodrop 8000 para calidad y cantidad de ADN complementario se encontraban en los rangos ideales de absorbancia, para 260 nm y 280 nm entre 1,8–2 y de 2,0-2,2 para 260 nm y 230 nm (ThermoScientific, 2008).

En la PCR convencional se usó 40 ng/µl de cDNA de acuerdo a lo recomendado por Olmedo-Velarde & Ochoa-Corona, 2016 y tomando en cuenta que el añadir mayor cantidad de ADN complementario no incrementó

la amplificación provocando la reducción de producto amplificado (Invitrogen, 2015).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificación de virus se considera sensible, de bajo costo y eficaz al proporcionar menor tiempo de ensayo comparado con técnicas serológicas y de microscopía electrónica (Sethi, 2011). Además de ser usada para virus en muestras clínicas (Hong *et al.*, 2000) permite la detección de la mayoría de virus en agua, pero sufre de un número de limitaciones incluyendo entre estas: la presencia de sustancias que interfieren en la reacción (Gerba *et al.*, 2007) y que detecta solo las partículas genómicas del virus sin determinar el estado infeccioso que solo se comprueba mediante cultivo celular (Hong *et al.*, 2000). Mediante el uso de PCR convencional y primers degenerados para los tres géneros fue posible identificar *Mandarivirus*, *Tombusvirus* y *Potexvirus* en muestras de agua de riego del primer reservorio, el género *Tobamovirus* no fue detectado ni en agua ni en plantas de tomate de árbol.

Los dos virus del género *Tombusvirus* fueron identificados como *Neckar river virus* con porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos de 99% y 97% de la base de datos de NCBI. *Neckar river virus* fue reportado en primera instancia por Koenig y Lesemann en 1985 al ser aislado del río Neckar de Alemania, y a pesar de que los porcentajes de identidad son altos es necesario considerar que los primers degenerados utilizados en la presente investigación fueron diseñados para amplificar la secuencia de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) mientras que el VII reporte del ICTV establece como criterio de demarcación de especie un porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos para proteína de cápside menor al 87%. Esto sugiere que el virus obtenido debe considerarse como un aislado del virus conocido como *Neckar river virus*.

Con 76% de identidad a nivel de nucleótidos se detectó un *Potexvirus* que se identificó como *Lagenaria mild mosaic virus*, virus descrito por primera vez en Myanmar (Asia) por Kim y Mizutani, 2010 nombrado acorde al hospedero: la calabaza peregrina (*Lagenaria siceraria*) una cucurbitácea

que difiere del rango del hospederos comunes de *Potexvirus*. Basándose en las distribuciones y análisis de datos Adams *et al.*, 2004 concluyó que como regla general los miembros de la Familia ahora denominada Alphafliviridae (a la cual pertenece *Potexvirus*) son especies distintas cuando tienen un porcentaje menor al 72% de identidad a nivel de nucleótidos o 80% de identidad a nivel de aminoácidos entre las proteínas de cápside o genes de proteínas de replicación. Se presume entonces que el miembro encontrado en agua de riego es posiblemente un aislado de *Lagenaria mild mosaic virus*.

Mediante primers degenerados para *Potexvirus* se identificó con 66% de identidad a nivel de nucleótidos *Indian citrus ringspot virus* del género *Mandarivirus*, resultado que se atribuye a las similitudes que posee la especie con *Potexvirus* (Rustici *et al.*, 2000). Esta especie fue colocada en el género *Mandarivirus* en el 2004 (Adams *et al.*, 2004) y acorde al IX reporte del ICTV no hay criterio aplicable para la demarcación de especies del género. Se desconoce la transmisión por vectores y la distribución natural, atribuyendo a la propagación del virus mediante el uso de estacas de plantas infectadas (Pant y Ahlawat, 1998).

Al realizar búsqueda en Blast con los primers diseñados para el género *Potexvirus* con la secuencia del genoma completo de *Indian citrus ringspot virus* se obtiene 100% de identidad con el organismo, comprobando que los primers pueden amplificar miembros de otros géneros y habría que optimizarlos para *Potexvirus*.

Ningún género de los tres virus objetivo fue detectado en las muestras de plantas de tomate de árbol, indicando que los síntomas de virosis probablemente son provocados por virus descritos en otros estudios: *Tamarillo mosaic virus* (TaMV, Potyvirus), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, Tosposvirus) (Revelo *et al.*, 2008), *Virus Y de la papa* (PVY, Potyvirus), *Virus V de la papa* (PVV, Potyvirus), *Potato leaf roll virus* (PLRV, Polerovirus) y *Virus peruano del mosaico del tomate* (PTV, Potyvirus) (Sivaprasad *et al.*, 2015).

Las condiciones en las que sobreviven los virus encontrados en agua de riego son inciertas al no tener un ambiente cerrado y controlado. En la toma de muestras del primer reservorio la temperatura osciló entre 18 -20°C y el pH fue 7 -9, factor que puede analizarse para la supervivencia viral. No se determinó la cantidad de sólidos suspendidos y sales minerales, además de microorganismos asociados al agua que según Gerba *et al.*, (2007) son factores que afectan la estabilidad termal de los virus.

Además se notó mayor cantidad de sedimentos en el reservorio 1 comparado con el reservorio 2, que pudo afectar al concentrado viral. Estudios de infectividad y estabilidad de ARN de *Virus del* mosaico del tabaco demostraron supervivencia en sedimentos de arcilla de benonita actuando como inhibidor de ribonucleasas (Singer y Fraenkel-Conrat, 1961). Gerba *et al.*, (2007) por su parte atribuye la supervivencia de virus en la mayoría de ambientes a la temperatura; incidiendo en las proteínas, ácidos nucleicos y demás reacciones químicas degradadoras de cápside. En la recolección de muestras se consideró el factor temperatura y se procuró tomar agua del fondo del reservorio al considerarse con menor temperatura que la superficie.

Aunque no se demostró mediante ensayos *in vitro* los virus detectados en el reservorio de la Granja Experimental Tumbaco son infectivos, es posible realizar como medida de prevención la remoción de virus. Hay pocas investigaciones sobre la remoción de virus por tratamientos convencionales o procesos fisicoquímicos (Mena y Gerba, 2009), para ello Berlanga (2010) asevera que los virus sobrepasan los tratamientos terciarios del agua y pueden removerse mediante métodos de coagulación, sedimentación, floculación y filtración incluyendo también la inactivación con cloro, cloramidas y radiación UV.

4.3 Comprobación de hipótesis

Los afluentes de aguas de riego de tomate de árbol contienen virus identificados como patógenos de plantas que no poseen hospedero específico y no son considerados como potencial fuente de contaminación de los cultivos.

CAPÍTULO V

5.1 Conclusiones

- Mediante RT-PCR, PCR convencional con primers degenerados para los tres géneros de virus y secuenciación Sanger, fue posible identificar virus de muestras de agua.
- Se detectaron los géneros *Potexvirus*, *Tombusvirus* y *Mandarivirus* que se identificaron como *Lagenaria mild mosaic virus*, *Neckar river virus* e *Indian citrus ringspot virus* respectivamente mediante secuenciación en el reservorio de agua de la Granja Experimental Tumbaco del Programa de Fruticultura del INIAP, mientras que en el reservorio de la Granja La Morita de la Universidad Central del Ecuador ninguno.
- Ambos métodos de concentrado viral fueron efectivos para la detección de virus fitopatógenos, la floculación con leche descremada permitió detectar *Mandarivirus* y *Tombusvirus* mientras que la precipitación con polietilenglicol *Tombusvirus* y *Potexvirus*.
- Los porcentajes de identidad de las especies de *Tombusvirus* y *Potexvirus* sugieren que los virus encontrados en agua de riego pueden ser aislados de *Neckar river virus* y *Lagenaria mild mosaic virus*, para el caso de *Mandarivirus* no hay criterios de demarcación aplicables para discriminar a *Indian citrus ringspot virus*.
- Al no encontrar los mismos géneros de virus en agua de riego y cultivos de tomate de árbol se infiere que el agua del primer reservorio

no actúa como posible fuente de contaminación de las plantas con síntomas de virosis.

5. 2 Recomendaciones

Para la continuación del presente Proyecto de Titulación se recomienda realizar los siguientes ensayos:

- Infección de plantas sanas con muestras de agua de riego para determinar si en realidad el agua actúa como vector de transmisión de virus, la infección podría realizarse mediante vías mecánicas (raspado de tejido) o en dos modalidades de riego (riego manual o cultivo hidropónico).
- Utilizar técnicas de Secuenciación de nueva generación (NGS) para identificar otros géneros de virus que se encuentran en el agua.
- Para reportar la ecología e incidencia de virus fitopatógenos en agua se recomienda recolectar mayor cantidad de datos alrededor del país.
- Se recomienda probar la filtración del concentrado viral para eliminar posibles organismos que puedan interferir con la detección de virus.

Referencias Bibliográficas

Adams M. J., Antoniw J. F., Bar-Joseph M., Brunt A. A., Candesse T., Foster G. D., Martelli G. P., Milne R. G., Fauquet C. M. (2004). The new plant virus family *Flexiviridae* and assesment of molecular criteria for especies demarcation. *Arch. Virol.* 149: 1045-1060.

Beijerinck M. W. (1898). Concerning a contagium vivum fluidum as a cause of the spot-disease of tobacco leaves. *Verh Akad Wet Amster* 6:33–55.

Berlanga M. (2010). Book review of Human viruses in water (Perspectives in medical virology, vol. 17) from Albert Bosch. *Int. Microbiol.* 11: 69-70.

Brody J. R., Kern S. E. (2005). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electroforesis. *Biotechniques*, 36(2): 21 4-6.

Cann, A. J. (2005). Principios de Virología Molecular. Elsevier Inc. Zaragoza, España.

Calgua B., Mengewein A., Grunert A., Bofill-Mas S., Clemente-Casares P., Hundensa A., Wyn-Jones A., López-Pila J., Girones R. (2008). Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*, 167-178.

Castello J .D., Rogers S. O., Starmer W. T., Catranis C. M., Bachand G.D., Zhao Y., Smith J. (1999). Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. *Polar Biol*, 22: 207-212.

CICO. (2009). Perfil de Tomate de Árbol, Perfiles de Producto. CORPEI. Quito.

Castello J. D., Lakshman D. K., Tavantzis S. M., Rogers S. O., Bachand G. D., Jagels R., Carlisle J., Liu Y. (1995). Detection of Infectious Tomato mosaic Tobamovirus in Fog and Clouds. *The American Phytopathological Society*. Vol 85, 11: 1409- 1412

Eagles R. M. (1994). *Tamarillo mosaic potyvirus*: characterization and resistance. Thesis PhD, Plant Sciences, School of Biological Sciences. University of Auckland.

Foster G. D., Taylor S. C. (1998). Plant Virology Protocols, from Virus Isolation to Transgenic Resistance. *Methods in Molecular Biology*, Vol 81, 123-129.

Gergerich R. C., Dolja V. V. (2008). Introduction to Plant Viruses, the invisible Foe. Trans. Giammaría S.. 2008. The Plant Health Instructor. APS.

Recuperado el 05/02/2017 de:

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/plantviruses espanol.aspx>.

Gerba C. P., Gramos D. M. (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol*, 68:5167-5169.

Gerrit J., Louis H., John R. (2005). Molecular Diagnostic PCR Handbook. *Springer*. USA.

Gosalvez B., Navarro J., Lorca A., Botella F., Sánchez-Pina M., Pallas V. (2003). Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *Elsevier*, 87-93.

Jacobi V., Bachand G., Hamelin R., Catello J. (1998). Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *Elsevier*, 167-178.

Jaramillo M., Gutiérrez P., Cotes J., González E., Marín M. (2011). Detección de los Virus AMV, CMV y PLRV en Cultivos de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en Antioquia, Colombia. *SciELO*, 5831-5844.

King A., Adams M., Carstens E., Lefkowitz E. (2012). Virus Taxonomy, Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier*. Londres.

Kobs G. (1998). Isolation of RNA from plant, yeast and bacteria. *Promega notes*: 68, 28-9.

Koenig, R. (2012). *The Plant Viruses: Polyhedral Virions with Monopartite RNA Genomes*. *Plenum Press*. Braunschweig, Alemania.

Koenig R., Pfeilstetter E., Kegler H., Leseman D.E. (2003). Isolation of two strains of a new *Tombusvirus* (*Havel river virus*, HaRV) from surface waters in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 110: 429-433.

Kutz S.M., Gerba C.P. (1988). Comparison of virus survival in fresh water sources. *Water Sci Technol*. 20:467-471.

León F. J., Viteri D. P., Cevallos A. G. (2004). Manual del cultivo de tomate de árbol. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Fruticultura. (Manual no. 61). Quito, Ecuador.

Li J. W., Wang X. W., Rui Q. Y., Song N., Zhang F. G., Ou Y. C., Chao F. H. (1998). A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *Virology Methods* 74, pp 99-108.

Mandal, A. (2012). Historia de Virus. *News-Medical*.

Martínez A. (2001). Estudio de la condición nutricional en cuatro provincias (Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Azuay) y caracterización del sistema radicular del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Tesis Ing. Agr. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas.

Mehle N., Ravnikar M. (2012). Plant Viruses in aqueous environment - Survival, mediated transmission and detection. *Elsevier Review*, 4903-4907.

Mehle N., Gutiérrez-Aguirre I., Prezelj N., Delic D., Vidic U., Ravnikar M. (2014). Survival and Transmission of Potato Virus Y, Pepino Mosaic Virus and Potato Spindle Tuber Viroid in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 1455-1462.

Mena K., Gerba C. (2009). Waterborne Adenovirus. *Rev. Environmental Toxicology*, 133-67.

Melnick J. L. (1947). Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and non epidemic times. *Am. J. Hyg.* 45:240-53.

Metcalf T., Melnick J. L., Estes M. K. (1995). From Detection of virus in Sewage and Water by Isolation to identification by Molecular Biology - A trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiology*, 462-479.

Morales F. J., Cardona C., Bueno J. M., Rodríguez I. (2006). Manejo Integrado de enfermedades de plantas causadas por Virus transmitidos por moscas blancas. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Colombia.

Nagy P. D., Pogany J. (2000). Partial Purification and Characterization of *Cucumber necrosis virus* and *Tomato bushy stunt virus* RNA-dependent RNA Polymerases: Similarities and Differences in Template Usage between

Tombusvirus and *Carmovirus* RNA- Dependent RNA Polymerases. *Virology*. 279-288.

Olmedo-Velarde A., Ochoa-Corona F. (2016, julio). Discriminating *Potexvirus* species by RT-PCR coupled to High Resolution Melting. Poster: Diseases of Plants: Disease Detection & Diagnosis presentado en el APS Annual Meeting, Florida, USA.

Olmstead G., Palmer D. (1992). A chloroplast DNA Phylogeny of the Solanaceae: Subfamilial Relationships and Character Evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 79, 346-360

Pant R. P., Ahlawat Y. S., (1998). Partial characterization of a filamentous virus associated with ringspot disease of citrus. *Indian Phytopathology*, 51(3):225-232

Regenmortel B., Mahy B., Van B. (2010). Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. *Elsevier*. España.

Revelo J., Mora E., Gallegos P., Garcés S. (2008). Enfermedades, Nematodos e Insectos plaga del Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Una guía para su identificación en el campo. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*, 19.

Revelo J., Pérez E., Maila M. (2004). Manual guía de capacitación del cultivo ecológico de Tomate de Árbol en Ecuador. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*. Quito.

Rivera, G. (2007). Conceptos Introductorios a la Fitopatología. Editorial Universitaria Estatal a Distancia, EUNED. San José, Costa Rica.

Rustici G., Milne R. G., Accotto G. P. (2002). Nucleotide sequence, genome organisation and phylogenetic analysis of Indian citrus ringspot virus. *Archives of Virology*, 147(11):2215-2224.

Sethi M. (2011). qPCR y RT-qPCR con garantía de éxito. Thermo Scientific Nanodrop Products. 63-65.

Sherwood J. L., German T. L., Moyer J. W., Ullman D. E. (2003). Tomato spotted wilt. *The Plant Health Instructor*. Uploaded 2009.

Singer B., Fraenkel-Conrat H. (1961). Effects of Benonite and stability of TMV-RNA. *Virology*. 14: 59-65.

Sivaprasad Y., Viera W., Patricia G., Orbe K. (2015). First report of Potato Virus Y in tree tomato in Ecuador. *Journal of Plant Pathology*. 97, S67-S77.

Invitrogen (2015). M-MLV Reverse Transcriptase Product Information Sheet, PCR Reaction. *Thermo Scientific*, 1-4.

Sivaprasad Y., Viera W., Buitron J., Orbe K., Ayala L. (2015). First report of *Potato leaf roll virus* in tree tomato in Ecuador. *Journal of Plant Pathology*.

Smith E. M., Gerba C. P., Melnick J.L. (1978). Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Appl Environ Microbiol*. 35: 685-689.

Tamayo, P. (2011). *Principales enfermedades del Tomate de árbol, la Mora y el Lulo en Colombia*. Antioquia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica.

Taylor G., Foster S. (1998). *Plant Virology Protocols, from Virus Isolation to Transgenic Resistance*. Humana Press. New, Jersey.

Tomlinson J., Webb M., Fraser R., Seeley N. (1983). *Chenopodium necrosis*: a distinctive strain of tobacco necrosis virus isolated from river water. *Ann. appl. Biol.* 102, 137-147.

Tomlinson J.A & Faithfull E.M. (1984). Studies on the occurrence of tomato bushy stunt virus in English rivers. *Ann. Appl. Biol.* 104, 485-495.

Tosic M., Tosic D. (1984). Occurrence of *Tobacco mosaic virus* in water of the Danube and Sava Rivers. *Phytopath. Z.* 110, 200-202.

Texto Unificado de legislación secundaria del Ministerio de Ambiente (TULAS) (S/A). Norma de Calidad ambiental y de descarga de efluentes:

Recurso Agua, Anexo I del Libro VI. pp 15-16. Recuperado el 26/01/2017 de:
<http://www.industrias.ec/archivos/CIG/file/CARTELERA/Reforma%20Anexo%2028%20feb%202014%20FINAL.pdf>

Zhang Z., Schawartz S., Wagner L., & Miller W. (2000). "A greedy algorithm for aligning DNA sequences" *J. Comput Biol* 2000; 7(1-2): 203-14).

Van der Vlugt RAA. 2009. *Pepino mosaic virus*. *Hell. Plant Prot. J.* 2:47–56.

Walker J.M, Raply R. (2009). *Moleculr Biology and Biotechnology*, 5th Edición. Cambridge.