

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Ocurrencia y variabilidad genética de *strawberry necrotic shock virus* (SNSV) en mora
(*Rubus glaucus*) en Ecuador

VIDA-359

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

María Lourdes Brito Coox

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mi hermana y mi madre, quienes con su amor y su apoyo incondicional me permitieron convertirme en lo que soy hoy en día.

Agradecimientos

Mis más agradecimientos a los miembros del laboratorio de Virología, sobre todo a Milenka Vera y a Raúl Cifuentes.

También quiero expresar mi agradecimiento al PhD. Diego Quito-Álava, por su guía en el transcurso del proyecto. Por último, agradezco a mis amigos de la carrera por acompañarme durante este trayecto, de inicio a fin.

Declaración Expresa

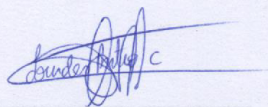
Yo María Lourdes Brito Coox acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 31 de mayo del 2024.



María Lourdes Brito Coox

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Diego Fernando Quito Avila

Tutor de proyecto

Resumen

El cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth) en la Sierra ecuatoriana, crucial para más de 12 mil productores, enfrenta desafíos por enfermedades virales como el *strawberry necrotic shock virus* (SNSV), un patógeno no reportado previamente en el país. La falta de programas de certificación fitosanitaria para material vegetal en Ecuador agrava la propagación de enfermedades. Este estudio busca determinar la ocurrencia y la variabilidad genética del virus *strawberry necrotic shock virus* (SNSV) a partir de material vegetal infectado de la región Sierra de Ecuador para la implementación de medidas de manejo. Para ello se utilizaron muestras de mora y frutilla de las provincias de Tungurahua, Azuay y Pichincha y se emplearon técnicas moleculares como HTS y RT-PCR, y análisis bioinformáticos para evaluar la diversidad genética de la cápside del virus. Los resultados mostraron que SNSV no presenta variantes recombinantes y que las secuencias ecuatorianas están estrechamente relacionadas con las secuencias estadounidenses (AY363238, AY363240, AY363241) con identidades de nucleótidos altas. SNSV parece estar limitado a la mora en Tungurahua, con una incidencia creciente en los últimos años. Estos hallazgos subrayan la necesidad de establecer medidas de manejo y programas de certificación para asegurar material de propagación libre de virus.

Palabras Clave: certificación fitosanitaria, diversidad genética, propagación vegetativa, recombinación genética

Abstract

The blackberry crop (*Rubus glaucus* Benth) in the Ecuadorian Sierra, crucial for more than 12 thousand producers, faces challenges due to viral diseases such as strawberry necrotic shock virus (SNSV), a pathogen not previously reported in the country. The lack of phytosanitary certification programs for plant material in Ecuador aggravates the spread of diseases. This study seeks to determine the occurrence and genetic variability of strawberry necrotic shock virus (SNSV) from infected plant material from the Sierra region of Ecuador for the implementation of management measures. For this, blackberry and strawberry samples from the provinces of Tungurahua, Azuay and Pichincha were used and molecular techniques such as HTS and RT-PCR, and bioinformatic analyzes were used to evaluate the genetic diversity of the virus capsid. The results showed that SNSV does not present recombinant variants and that the Ecuadorian sequences are closely related to the American sequences (AY363238, AY363240, AY363241) with high nucleotide identities. SNSV appears to be limited to defaults in Tungurahua, with an increasing incidence in recent years. These findings underscore the need to establish management measures and certification programs to ensure virus-free propagation material.

Keywords: phytosanitary certification, genetic diversity, vegetative propagation, genetic recombination

ÍNDICE GENERAL

Resumen	I
Abstract	II
Índice general	III
Abreviaturas.....	V
Índice de Figuras	VI
Índice de tabla	VII
CAPÍTULO 1	8
1. Introducción	9
1.1 Descripción del Problema.....	11
1.2 Justificación del Problema.....	12
1.3 Objetivos.....	13
<i>1.3.1 Objetivo general</i>	13
<i>1.3.2 Objetivos específicos</i>	13
1.4 Marco teórico	14
CAPÍTULO 2.....	19
2. Metodología.	20
2.1 Colección de la muestra	20
2.2 Preparación de la muestra	21
2.3 Diagnóstico viral: HTS y RT-PCR.....	22
2.3.1 RT-PCR.....	22

2.3.2	Secuenciación de alto rendimiento (HTS)	23
2.4	Diversidad genética y análisis filogenéticos del virus SNSV	24
2.5	Análisis bioinformático.....	24
CAPÍTULO 3		27
3.	Resultados y análisis	28
3.1	Secuencias del genoma de SNSV obtenidas de HTS	28
3.2	Análisis genómico, filogenia y patrones de recombinación de SNSV	29
3.3	Ocurrencia y distribución geográfica de SNSV en Ecuador.....	35
CAPÍTULO 4.....		38
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	39
4.1.1	Conclusiones.....	39
4.2	Recomendaciones.....	40
Referencias		42

ABREVIATURAS

AA aminoácidos

ESPE Universidad de las Fuerzas Armadas

IASA Carrera Agropecuaria perteneciente a la ESPE

INIAP Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

HTS High-throughput sequencing/Secuenciación de alto rendimiento

JTT Jones Taylor Thornton

ML Maximum likelihood/Máxima verosimilitud

MP Proteína de movimiento

MSA Multiple Sequence Alignment/Alineamiento múltiple de secuencias

Msnm metros sobre el nivel del mar

NCBI National Center for Biotechnology Information

NCPN National Clean Plant Network

Nt Nucleótidos

RdRP ARN polimerasa dependiente de ARN

RBDV *Raspberry bushy dwarf virus*

RT-PCR Reverse transcription-polymerase chain reaction

SNSV *Strawberry necrotic shock virus*

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Mapa de las provincias muestreadas en Ecuador</i>	
.....	21
Figura 2 <i>Análisis filogenético de strawberry necrotic shock (SNSV) basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína de la cápside (CP)</i>	
.....	31

Índice de tabla

Tabla 1. <i>Provincia, localidad, sitio de muestreo, variedad y número de muestras del muestreo de 2024</i>	20
Tabla 2 <i>Resumen de los resultados de identificación de virus mediante secuenciación del alto rendimiento (HTS)</i>	28
Tabla 3 <i>Listado de los aislados de SNSV de Fragaria y Rubus sp. analizados en este trabajo</i>	33
Tabla 4 <i>Porcentaje de incidencia del virus SNSV en Ecuador (%)</i>	37

CAPÍTULO 1

1. Introducción

Las especies del género *Rubus*, familia *Rosaceae*, comúnmente conocidas como zarzas, se componen por aproximadamente 700 especies de moras y frambuesas ampliamente distribuidas en todo el mundo, desde zonas templadas del hemisferio norte hasta el hemisferio sur. Las zarzas son un alimento valioso ampliamente cultivado alrededor del mundo debido a sabor, nivel nutricional y compuestos fitoquímicos bioactivos con actividades biológicas antioxidantes, antiinflamatorias, quimiopreventivas y actividad antimicrobiana (Schulz & Chim, 2019).

En Ecuador, la mora andina (*Rubus glaucus* Benth), nativa de los Andes, es la especie con mayor uso agroindustrial del género *Rubus*, la cual prospera principalmente en climas fríos y templados de América del Sur (Salazar-Yepes et al., 2007). Su cultivo se compone de diferentes cultivares: Castilla, Brazos, Colombiana/San Antonio, y la variedad INIAP Andimora-2013 (Viteri D. et al., 2016).

Actualmente, en el país la producción de mora se distribuye a lo largo del callejón interandino y en las estribaciones de la región Sierra, principalmente en las provincias de Bolívar, Cotopaxi, Tungurahua, Carchi, Chimborazo e Imbabura, representando el rubro principal y permanente de aproximadamente 12 000 pequeños y medianos productores. Las zonas más productivas de mora en Ecuador son las provincias de Bolívar y Tungurahua, que juntas conforman cerca del 72% de la participación total de la producción de mora (Barrera et al., 2017). Se estima que en Ecuador existen aproximadamente 5 247 ha de superficie cultivada, distribuidas en 14 546 unidades de producción (UPA) con una superficie menor o igual a una hectárea y con una producción anual de 11 494 t (Galarza et al., 2016).

La planta de mora es perenne y de porte arbustivo, con crecimiento semi-erecto y semitrepador. Se caracteriza por su vigor, con varios tallos espinosos que pueden llegar a medir tres metros de altura (Agropecuaria, 2005). Tiene una vida productiva de 10 o más años de producción, que aumenta con relación a la edad del cultivo. El cultivo de mora es rentable, si existe un manejo y cuidado óptimo, cada planta puede llegar a producir hasta 12 kg/planta/año con una densidad de siembra de 3 x 2 m, alcanzando una producción de hasta 18 toneladas ha/año (Martínez et al., 2013).

El cultivo de mora enfrenta grandes desafíos relacionados a problemas fitosanitarios que disminuyen la calidad del fruto y reducen el volumen de la producción. Entre los cuales destacan enfermedades como la pudrición del fruto, mildew polvoso, antracnosis del fruto, agalla de la corona, causadas principalmente por hongos y bacterias (Benavides et al., 2021). Estas enfermedades pueden ser controladas satisfactoriamente con tratamientos químicos y biológicos; a diferencia de infecciones de origen viral que carecen de tratamientos curativos y son difíciles de erradicar una vez establecidos en los cultivos (Hernández Pachón et al., 2018).

Diagnosticar infecciones virales basadas en la sintomatología presenta desafíos para los productores debido a la variabilidad de síntomas influenciada por factores como el hospedero (especie y cultivar), la cepa del patógeno, el ambiente y la presencia de infecciones mixtas con otros virus (Yurtmen, 2023). En el género *Rubus*, muchos virus pueden ser leves o incluso asintomáticos en infecciones simples, pero los efectos negativos pueden amplificarse en infecciones complejas, a veces resultando en la muerte de la planta. Además, las plantas pueden mostrar síntomas similares a los de infecciones virales debido a deficiencias nutricionales, daños por insectos o herbicidas.

Algunos estudios sobre el viroma de la mora han surgido en el país. Quito-Avila et al. (2013) documentó la existencia de *raspberry bushy dwarf virus* (RBDV; género *Idaeovirus*), un virus isométrico transmitido por polen y semillas que naturalmente infecta al género *Rubus*. RBDV ha sido reportado en plantas de mora asintomáticas como sintomáticas en Ecuador, lo que podría indicar la presencia de otros virus como agentes causales.

1.1 Descripción del Problema

En el país, el cultivo de mora es un rubro de importancia socioeconómica, ya que contribuye a la generación de recursos económicos y al mejoramiento de vida de los productores de la Sierra ecuatoriana.

Su producción se encuentra amenazada por numerosos patógenos, incluidos los virus, para los cuales no existen remedios efectivos una vez que el cultivo se infecta, ni son fáciles de identificar por medio de la sintomatología. Se han reportado más de 40 virus y patógenos similares que infectan al género *Rubus*, causando la reducción de la producción, calidad del fruto, y el ciclo de vida de las plantaciones de *Rubus* en todo el mundo (Martin et al., 2013). Entre ellos destaca *strawberry necrotic shock virus* (SNSV, género *Ilarvirus*), un patógeno viral económicamente relevante transmitido por semilla, polen y trisps que infecta a los géneros *Fragaria* y *Rubus spp* (I. E. Tzanetakis, 2012).

La producción comercial de mora se realiza principalmente mediante propagación vegetativa, por acodos o estacas, lo cual ha generado que los productores y viveros propaguen material vegetal sin ninguna norma de calidad fitosanitaria. Esta situación representa un peligro latente para la sanidad de los cultivos, dado que la mayoría de los virus se transmiten mediante propagación vegetativa. Por lo cual, como parte de un sistema de producción óptimo es importante que se implementen programas de producción de plantas libres de virus

para controlar la propagación de virus, permitir el intercambio de germoplasma y cultivares entre países, y detener el daño económico causado por enfermedades virales.

Existen programas de certificación en varios países que producen material vegetal libre de virus conocidos, patógenos sistemáticos, insectos y nemátodos (Martin et al., 2013). Tal es el caso del National Clean Plant Network (NCPN), ubicada en Estados Unidos, cuyo objetivo es salvaguardar y apoyar cultivos especializados proporcionando una fuente sostenible de material vegetal limpio. Previo a la implementación de un programa de certificación de mora en el país, se requieren de estudios sobre la incidencia y la variabilidad genética de los virus que impactan negativamente al cultivo, así como herramientas efectivas para detectar los virus. De esta forma, se potencia la producción de la mora en Ecuador.

1.2 Justificación del Problema

La mora andina es altamente demandada en el mercado ecuatoriano debido a su valor nutricional y su importancia agroindustrial. En la Sierra ecuatoriana, juega un papel socioeconómico crucial al generar ingresos y empleo para numerosos agricultores. En 2022, participaron 11,938 personas en su producción, siendo el 83% mano de obra familiar. Económicamente, la mora contribuyó significativamente con exportaciones de 173 toneladas valuadas en USD 446 mil, representando un 0.3% del Valor Agregado Bruto (VAB) (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2022).

Debido al largo ciclo de vida de las plantas de mora, que puede exceder los 10 años en el campo, son susceptibles a numerosas enfermedades virales. Tanto los cultivos comerciales como las moras silvestres y malas hierbas pueden actuar como reservorios y vectores de

virus, afectando tanto a plantas cultivadas como las comunidades de plantas silvestres en sistemas agrícolas no gestionados (Hasiów-Jaroszewska et al., 2021).

La identificación de la presencia y variabilidad genética del virus del shock necrótico de la fresa (SNSV, género *Ilarvirus*) en las moras de la Sierra ecuatoriana es crucial para desarrollar programas de certificación de plantas libres de virus. Esto no solo ayuda a mitigar los desafíos fitosanitarios que limitan la producción de mora, sino que también apoya los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU: 2 Hambre cero y 15 Vida de ecosistemas terrestres.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la ocurrencia y la variabilidad genética del virus *strawberry necrotic shock virus* (SNSV) a partir de material vegetal infectado de la región Sierra de Ecuador para la implementación de medidas de manejo.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Conocer la prevalencia de *strawberry necrotic shock virus* (SNSV) en cultivos de mora mediante RT-PCR y secuenciación de alto rendimiento (HTS).
2. Analizar la variabilidad genética del virus SNSV en diferentes aislados ecuatorianos mediante tecnologías bioinformáticas.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Cultivo de mora

La mora andina es una baya ampliamente cultivada y apreciada tanto por su valor comercial como por sus características botánicas distintivas dentro del género *Rubus*, subgénero *Eubatus*, conocido por su diversidad morfológica y genética en numerosas especies silvestres y cultivadas. Estas plantas se desarrollan principalmente en la región interandina de Ecuador, a altitudes que oscilan entre los 2000 y 3100 metros sobre el nivel del mar (msnm). La temperatura óptima para este cultivo fluctúa entre los 11 y 12 grados centígrados, con condiciones de lluvia que oscilan entre 1500 y 2300 milímetros de lluvia al año (mm).

La mora puede reproducirse tanto sexual como asexualmente. Las principales técnicas de reproducción asexual incluyen el uso de estacas, acodos y el cultivo in vitro. La micropropagación, también conocida como propagación clonal, es una de las técnicas in vitro más comunes en la agricultura de la mora, ya que permite obtener plantas de primer nivel de manera rápida, eficiente y en grandes cantidades.

El ciclo de cultivo de la mora puede ser descrito de manera sistemática y detallada, comenzando con el proceso de establecimiento. La propagación se produce preferentemente mediante hijuelos enraizados o estacas (Franco et al., 2020), siendo esenciales condiciones específicas de suelo y clima para su éxito inicial. El suelo óptimo debe ser bien drenado, con adecuado contenido de materia orgánica y un pH en el rango de 5.5 a 6.5. Asimismo, las condiciones climáticas ideales abarcan temperaturas moderadas entre 12-18°C y una precipitación anual de 1000 a 2000 mm.

Las moras se distinguen por sus tallos espinosos y hojas compuestas con folíolos lanceolados, lo que facilita su identificación y manejo en los cultivos (Iza et al., 2020).

En cuanto a variedades, Yunda y David (2019) señalan una diversidad significativa. Los cultivares comerciales populares incluyen Adimora, Castilla, Brazos y Colombiana o San Antonio, cada uno con características morfológicas, fenológicas y pomológicas distintivas.

Los cultivares Andimora y Colombiana se diferencian morfológicamente por la ausencia de espinas, a diferencia de Castilla y Brazos. En cuanto a la fenología, Colombiana tiene un ciclo más corto de 161 días desde la brotación hasta la cosecha, mientras que Castilla es más tardía, con 186 días. En términos de pomología, Brazos destaca por su mayor peso de fruto, alcanzando 5,85 gramos por fruto, mientras que Andimora se distingue por su alto contenido de sólidos solubles medido en 11,86 °Brix, además de frutos firmes. En la región específica de Guantug Cruz, las variedades predominantes incluyen la Mora de Castilla (85,2%), la Colombiana con espinas (11,5%) y la Colombiana sin espinas (3,3%). Estas características determinan la idoneidad de cada variedad para diferentes condiciones de cultivo y preferencias de mercado.

Los rendimientos promedio reportados varían significativamente, con cifras que oscilan entre 8-15 toneladas por hectárea al año, dependiendo de las prácticas de manejo y las condiciones ambientales específicas del cultivo (González-Castro, 2019).

1.4.2 *Strawberry necrotic shock virus (SNSV)*

SNSV es un virus importancia agrícola que infecta a los géneros *Fragaria* y *Rubus* spp. SNSV es un miembro del subgrupo 1 del género *Ilarvirus* de la familia *Bromoviridae* (I. E. Tzanetakis et al., 2004).

Los *llarvirus* se distinguen por tener un genoma de ARN tripartito, monocatenario positivo de aproximadamente 8 kb en total (Simkovich et al., 2021). Cada segmento genómico está cubierto por la proteína de cubierta (CP) para formar partículas quasi-isométricas de 27 a 35 nm. El segmento ARN 1 es traducido en una poliproteína con dominios helicasa y metiltransferasa. El ARN 2 codifica para la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y un supuesto supresor de silenciamiento de ARN. Por último, el segmento ARN 3 codifica para proteínas de movimiento entre célula y célula (MP), y proteína de cubierta estructura (CP) con una masa molecular de 31.7 kDa y 26.2kDa respectivamente. Esta última se expresa a través del ARN subgenómico 4 (EastWell, 2008).

SNSV ha sido reportado en los continentes de Asia, América y Oceanía, aunque no se descarta su presencia en países de la Unión Europea (Health (PLH) et al., 2020).

La infección por el virus SNSV en plantas de fresa indicadoras puede causar necrosis severa en nuevas hojas, visible entre 6 y 14 días después de la infección, aunque los síntomas son temporales y las nuevas hojas tienden a desarrollarse normalmente. Sin embargo, en cultivares de fresa y especies de *Rubus*, los síntomas de SNSV son poco comunes cuando la infección es única; se hacen más prominentes en infecciones mixtas con otros virus que afectan a estas plantas (I. Tzanetakis, 2022).

Muchos miembros del género *llarvirus*, incluido SNSV, se transmiten verticalmente a través de semillas, polen y propagación vegetativa de una planta madre infectada a la progenie. También, SNSV puede transmitirse horizontalmente a través de inoculación mecánica e incluso los trips (*trypanoptera*) facilitan la transmisión por abrasión mecánica de las células a la hoja (EastWell, 2008).

1.4.3 Técnicas moleculares de diagnóstico: HTS y RT-PCR

1.4.3.1 RT-PCR

La técnica de biología molecular más utilizada para el diagnóstico de virus en plantas es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) debido a su capacidad para detectar virus en bajas concentraciones (Wang et al., 2022). Esta técnica permite amplificar una sola cadena de ADN hasta 10^9 veces después de múltiples ciclos de amplificación, utilizando primers o cebadores para amplificar segmentos de interés.

RT-PCR consta de dos etapas fundamentales: primero, la retrotranscripción convierte una cadena de ARN viral en ADN complementario (ADNc) mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente, la PCR convencional amplifica el segmento de interés usando primers específicos a partir del ADNc generado en la retrotranscripción. Finalmente, los productos de PCR resultantes se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en un buffer TAE 1x teñidos con un agente intercalante de ácidos nucleicos como Tiazole Orange, Syber Safe, o bromuro de etidio, permitiendo la visualización de los fragmentos amplificados bajo luz ultravioleta o luz azul.

1.4.3.2 Secuenciación de alto rendimiento (HTS)

La secuenciación de nueva generación (NGS), también conocida como secuenciación de alto rendimiento (HTS), es un conjunto avanzado de técnicas de secuenciación genética que superan las limitaciones de la secuenciación de primera generación Sanger al permitir la generación simultánea de miles o millones de secuencias. Las principales plataformas incluyen Roche/454, Illumina/Solexa y ABI/SOLiD, siendo Illumina la más dominante en el mercado actual (Qiang-long et al., 2014). HTS se utiliza extensamente en estudios de virología vegetal, facilitando la secuenciación del genoma viral, análisis de diversidad y

evolución viral, estudios ecológicos y epidemiológicos, así como la detección de virus nuevos y conocidos en hospederos (Nehra et al., 2022). Esta tecnología es preferida sobre métodos convencionales como PCR y ELISA debido a su capacidad para detectar y caracterizar virus sin necesidad de información previa sobre los patógenos (Maina et al., 2024).

CAPÍTULO 2

2. Metodología.

2.1 Colección de la muestra

Durante 2018, se realizaron visitas para identificar enfermedades virales de la mora en plantaciones comerciales en la provincia de Tungurahua y se recolectaron cinco muestras foliares de mora Castilla con síntomas de amarillento en las hojas, presumiblemente asociado a enfermedades virales. Estas muestras fueron procesadas y utilizadas para el análisis de su viroma mediante HTS. Posteriormente para investigar la prevalencia de SNSV en mora en Ecuador, un total de noventa muestras de material vegetal de mora fueron colectadas entre 2021 y 2023 en diferentes plantaciones comerciales en la provincia de Tungurahua y un vivero en la provincia de Azuay. Además, durante un muestreo de campo de mora en Tungurahua, se tomaron muestras y se analizaron cincuenta plantas de fresa (Albión) que mostraban hojas rojas o amarillentas. En 2023, ocho de las muestras que fueron recolectadas durante 2023 se enviaron para HTS. En 2024, también se realizó un muestreo dirigido por observación, en el cual se inspeccionaron hojas jóvenes provenientes de plantas que presentaban síntomas típicos virales en la provincia de Tungurahua y Pichincha.

En la provincia de Tungurahua se muestrearon tres sitios: el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador (INIAP) y dos haciendas de la localidad de Huachi. Mientras que en la provincia de Pichincha se muestrearon plantas de mora de Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) y de la carrera Agropecuaria (IASA) perteneciente a la ESPE (Tabla 1).

Tabla 1

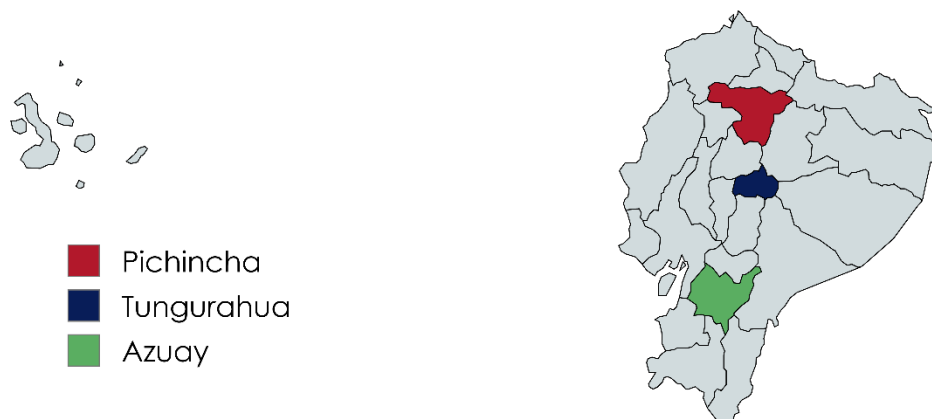
Provincia, localidad, sitio de muestreo, variedad y número de muestras del muestreo de 2024

Provincia	Localidad	Sitio de muestreo	Variedad	Número de muestras
------------------	------------------	--------------------------	-----------------	---------------------------

Tungurahua	Píllaro	Hacienda 1- Huachi	Andimora	15
		Hacienda 2- Huachi	Andimora	10
		INIAP	148	6
		IASA	Mora silvestre	8
Pichincha	Quito	ESPE	Brazos	10
			Colombiana sin espinas	10
			Colombiana con espinas	10
Total				69

Figura 1

Mapa de las provincias muestreadas en Ecuador



Nota. Mapa realizado con Mapchart (<https://www.mapchart.net/>).

2.2 Preparación de la muestra

La extracción de ARN total se realizó a partir de 100 mg de tejido foliar joven empleando un protocolo de extracción de ARN descrito por Halgren et al., (2007). La calidad y concentración del ARN se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Las muestras de ARN enviadas para HTS fueron tratadas previamente con DNase I (Applied Biological Materials), una endonucleasa que digiere ADN residual de la extracción de

ARN. Posteriormente, la depleción del ARN ribosómico y la preparación de las librerías de ADc se realizaron empleando el kit TruSeq Stranded Total RNA sample preparation kit con Plant Ribo-Zero (Illumina)

2.3 Diagnóstico viral: HTS y RT-PCR

2.3.1 RT-PCR

La retrotranscripción se realizó con la enzima transcriptasa reversa M-MLV de Invitrogen en un volumen de 15 ul para sintetizar ADNc de primera cadena a partir de ARN. El volumen de reacción final contenía 3 ul de Buffer (5X), 1.5 ul de ditioneitol (dTT), 0.5 ul de desoxinucleótidos trifosfato (10 mM de cada dNTP), 0.5 ul de random primers (40 μ M), 0.2 ul de M-MLV reverse transcriptasa (200 U/ul), 1 ul de ARN y 8.3 ul de agua destilada UltraPure sin ADNasa/ARNasa. La reacción en transcriptasa inversa se hizo en el equipo MiniAmp Plus Thermal Cycler de la compañía Thermo Fisher Scientific con las siguientes condiciones: 25 °C por 5 min, 42 °C por 1 h y 80°C por 10 min.

El ADNc sintetizado fue empleado como molde para la ampliación del segmento que codifica para la cápside (CP) del virus SNSV, ampliamente utilizado en estudios taxonómicos del género *Ilavirus*, debido a que presenta una mayor abundancia y existe más información sobre la variabilidad de su secuencia en las bases de datos en comparación con cualquier otro gen codificado para SNSV.

La PCR se efectuó utilizando cebadores específicos en un volumen total de 10 μ l, compuesto por 1 μ l de buffer (10X), 0.3 μ l de MgCl₂, 0.2 μ l de dNTPs (concentración de 10 mM para cada dNTP), 0.5 μ l del cebador forward (40 μ M) y 0.5 μ l del cebador reverse (40 μ M), 0.1 μ l de la enzima Platinum Taq DNA polimerasa (5

U/ μ l), 1 μ l de ADNc y 6.4 μ l de agua destilada UltraPure libre de ADNasa/ARNasa. Las reacciones de PCR se realizaron en un equipo MiniAmp Plus Thermal Cycler de Thermo Fisher Scientific. El programa de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos que consistieron en desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con Tiazole Orange, y se visualizaron en un transiluminador de luz azul (FastGene FAS-DIGI Compact, NIPPON Genetics EUROPE). Además, se incluyó un control negativo sin ácidos nucleicos en la mezcla de PCR y un control positivo para SNSV, utilizando tejido foliar infectado. El tamaño de los amplicones fue confirmado usando un marcador de peso molecular (FastGene 100 bp DNA Marker, NIPPON Genetics EUROPE).

2.3.2 Secuenciación de alto rendimiento (HTS)

HTS ha demostrado ser confiable y altamente sensible al descubrimiento y la detección de los virus. Cinco muestras de mora recolectadas en 2018 y 8 muestras de 2023 se enviaron para la secuenciación masiva de un único extremo de 75 pb en un equipo Illumina NextSeq 500/550 system.

La presencia de los virus detectados por HTS se verificó mediante amplificación por RT-PCR del gen CP utilizando cebadores para SNSV CPbeg F:

GAGTATTTCTGTAGTGAATTCTTGGA y CPend R:

ATTATTCTTAATGTGAGGCAACTCG descritos por Tzanetakis et al., (2004).

Después, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Los amplicones de tamaño esperado fueron extraídos del gel y purificados para su secuenciación con

el kit de purificación Quick PCR Purification Kit (Invitrogen). La secuenciación Sanger se ejecutó en ambos sentidos utilizando los mismos cebadores que en la PCR. Las secuencias obtenidas con cada cebador se editaron con el software Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>). Se generaron secuencias consenso y se verificó su identidad comparándolas con la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando el programa Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

2.4 Diversidad genética y análisis filogenéticos del virus SNSV

Fragmentos amplificados del gen CP de cinco aislados de 2021, cinco aislados de 2023, tres aislados de la variedad Andimora de la hacienda 1, tres aislados de la variedad Andimora de la hacienda 2 de la localidad Huachi y tres aislados del INIAP de la variedad 148 fueron clonados (pGEM®-T easy vector system, Promega) y secuenciados en ambos sentidos, por el método Sanger (Compañía Macrogen, Corea del Sur).

2.5 Análisis bioinformático

El procesamiento de secuencias y la búsqueda de virus de los conjuntos de ilumina se realizaron utilizando VirFind (<http://virfind.org>), una herramienta bioinformática automatizada para la detección y el descubrimiento de virus utilizando datos de secuenciación de próxima generación (NSG) (Ho & Tzanetakis, 2014). También, se utilizó una canalización personalizada con herramientas implementadas en Geneious Prime 2022-2023 de la siguiente manera: las lecturas duplicadas y de baja calidad se eliminaron usando Dedupe y BBDuk, respectivamente. Las lecturas se sometieron a un ensamblaje de novo utilizando SPAdes v. 3.15.5. Los contigs ensamblados se sometieron a BLASTn utilizando la función megablast (valor e 1e-10, tamaño de palabra 28). Se eliminaron todos los contigs con $\geq 95\%$

de identidad nt (cobertura de consulta $\geq 35\%$) con genes relacionados con plantas. Los contigs restantes se analizaron mediante BLASTx (valor e 0,01, tamaño de palabra 3) utilizando la base de datos de proteínas no redundante (nr). Los contigs de más de 600 nucleótidos de longitud con accesos BLASTx a proteínas virales que mostraban identidades de aminoácidos $\geq 25\%$ (valor e 0,01, cobertura de consultas $\geq 35\%$) se consideraron secuencias “relacionadas con virus”. Los análisis BLAST se realizaron utilizando el grupo de computación de alto rendimiento (HPC) del Centro de Ciencias Cuantitativas de la Vida (CQLS) de la Universidad Estatal de Oregón.

A las secuencias Sanger de los aislados ecuatorianos de SNSV, se determinó su calidad y los extremos con calidad deficiente fueron eliminados empleando el programa Geneious Prime. Las secuencias en ambos sentidos de la misma muestra fueron ensambladas con la función de Novo Assembly para construir secuencias consenso. Luego, con base en las secuencias de nucleotídicas generadas de los aislados ecuatorianos se recuperaron secuencias homólogas de aislados internacionales de GenBank, los cuales se usaron para análisis filogenéticos. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias (MSA) de nucleótidos utilizando MUSCLE en Geneious Prime, el cual se exportó en formato FASTA. El alineamiento múltiple se importó al programa Recombination Detection Program 4 (RDP4) (<http://web.cbio.uct.ac.za/~darren/rdp.html>), un programa utilizado para detectar y analizar recombinación y/o señales de reordenamiento genómico en un conjunto de secuencias de ADN alineadas. Una vez sometido el alineamiento múltiple a análisis de eventos de recombinación, se aceptaron los eventos con 4 de 7 métodos de detección positivos implementados en RDP versión 4. Luego, se exportó el alineamiento con las secuencias recombinantes removidas en formato FAS al software MEGA11 (<https://www.megasoftware.net>). Se seleccionó el modelo de sustitución más adecuado con

base en las secuencias traducidas de nucleótidos a proteínas y se construyó un árbol filogenético para entender las relaciones evolutivas entre los diferentes aislados obtenidos en Ecuador y sus homólogos de origen internacional de GenBank, utilizando el método Máxima verosimilitud (ML), con 100 réplicas bootstraps. El árbol filogenético resultante fue exportado en formato Newick a Split tree (<https://software-ab.cs.uni-tuebingen.de/download/splitstree6/welcome.html>) para darle formato.

CAPÍTULO 3

3. Resultados y análisis

3.1 Secuencias del genoma de SNSV obtenidas de HTS

Las cinco muestras de mora Castilla de 2018 sometidas a HTS arrojaron aproximadamente 10 millones de lecturas por muestra, mientras que las ocho muestras de 2023 arrojaron entre 20-34 millones de lecturas por muestra (Tabla 2). Los resultados de VirFind y BLASTx revelaron la presencia de RBDV en todas las muestras. Además, la secuenciación ilumina arrojó segmentos del genoma casi completos correspondientes a SNSV en tres y cinco muestras de 2018 y 2023 respectivamente. Las pruebas positivas de RT-PCR confirmaron la presencia de SNSV y RBDV en las muestras de *R. glaucus*.

Las secuencias genómicas casi completas de los aislamientos ecuatorianos (SNSV-Rubus-Ec1, 2 y 3, números de acceso PP555258, PP555259, PP555260) comparten un 99% de identidad de nucleótidos entre sí y un 89%, 88% y 94% de identidad para los segmentos de ARN 1, 2 y 3, respectivamente, con los aislamientos de EE. UU. (DQ318818, AY743591, AY363228).

Tabla 2

Resumen de los resultados de identificación de virus mediante secuenciación del alto rendimiento (HTS)

Fecha de colecta	Número de muestra	Lecturas totales de HTS	BLASTx		Número total de lecturas ensambladas en el genoma del virus	Cobertura promedio (X per nt)	Número de acceso		
			closest virus hit				RNA 1	RNA 2	RNA 3
			Abreviación del virus	Promedio de identidad de aminoácidos					
	1 (10)	11,521,632	RBDV	81,56	1,130,709	8333.65	PP693289	PP693290	-
			SNSV				-	-	-
	2 (11)	10,084,002	RBDV				-	-	-
	3 (12)	9,386,608	RBDV	99,56	1,110,341	7228.78	PP693291	PP693292	

2018	4 (13)	10,955,928	RBDV				-	-	-
			SNSV				-	-	-
	5 (14)	10,651,696	RBDV	99,05	2,270,119	14781.35	PP693293	PP693294	-
			SNSV						
2023	1 (field_1)	20,312,388	RBDV	99,40	55,721	542.46	PP555253	PP555254	-
			SNSV		12,054	106.69	-	-	
	2 (field_2)	20,906,574	RBDV	80,15	194,813	1883.59	PP595781	PP595789	-
			SNSV		208,082	1810.88	-	-	
	3 (field_3)	20,820,842	RBDV	80,15	83,572	810.12	PP595782	PP595790	-
			SNSV		48,835	428.98	-	-	
			RBDV	80,15	83,625	807.92	PP595783	PP595791	-
	4 (field_15)	20,041,966	SNSV		34,726	306.66	-	-	
	5 (inv_1)	23,139,040	RBDV	99,75	729,735	7039.24	PP595784	PP595792	-
	6 (inv_2)	25,377,500	RBDV	79,95	166,131	1637.94	PP595785	PP595793	-
	7 (inv_3)	24,451,778	RBDV	99,75	1,152,391	11130.63	PP595786	PP595794	-
	8 (inv_4)	34,369,072	RBDV	89,11	762,744	7449.16	PP595787	PP595795	-
SNSV			94,03	409,875	3567.03	PP555258	PP555259	PP555260	

Nota. Acrónimo de los virus: *raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) y *strawberry necrotic shock virus* (SNSV).

Para fines prácticos, se muestra la identidad aminoácidos que representa el promedio de la polimerasa, la proteína de movimiento y la proteína de la cápside. Los análisis detallados de cada virus/proteína se abordan en diferentes secciones de este trabajo.

& Cuando el porcentaje de identidad entre los aislados fue superior al 99 %, se envió un solo aislado a GenBank.

3.2 Análisis genómico, filogenia y patrones de recombinación de SNSV

Este estudio utilizó 41 secuencias (este estudio=17, GenBank=24) del gen (CP) que oscilan entre 649 a 841 nucleótidos para analizar la relación filogenética de los aislados geográficamente distintos. Se recuperaron 24 secuencias de SNSV de seis países (Estados Unidos, China, México, Japón, Australia y Filipinas) de GenBank para obtener una imagen completa de su diversidad global y distribución geográfica (Tabla 3). Los huéspedes fueron *Rubus glaucus*, *Rubus ursinus*, *Rubus hybrid*, *Rubus occidentalis*,

Rubus idaeus, *Fragaria x ananassa*, *Fragaria vesca* y algunos huéspedes no se identificaron.

El análisis de recombinación no mostró eventos de recombinación significativos entre las secuencias de SNSV que sugirieran la aparición y propagación global de nuevas variantes/cepas o aislados recombinantes con una amplia gama de hospederos y propiedades novedosas. La recombinación implica el intercambio de material genético entre diferentes genomas virales y es un mecanismo que contribuye a la diversidad genética observada en poblaciones de virus de plantas facilitando su adaptación a entornos cambiantes. De hecho, la recombinación se ha asociado con la expansión de la gama de huéspedes, la aparición de nuevos virus, aumento de virulencia, la evasión de la inmunidad del huésped (Pérez-Losada et al., 2015). Por lo tanto, se procedió con el análisis filogenético sin remover ninguna secuencia recombinante que pudiera generar estimaciones filogenéticas engañosas en las relaciones, la ascendencia de los individuos, y el número de sustituciones en los linajes (Jaya et al., 2023).

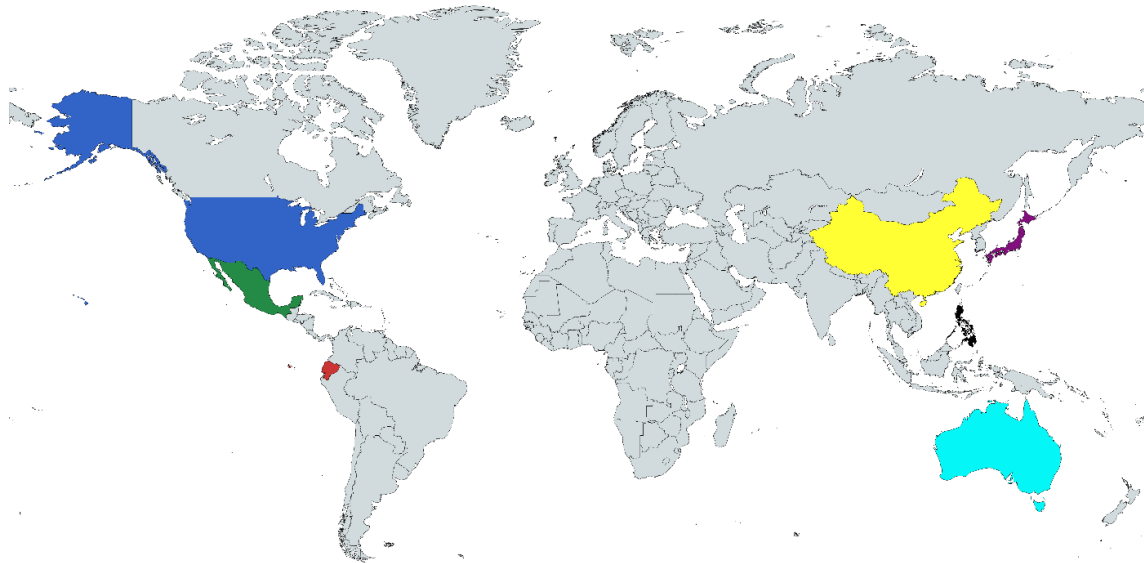
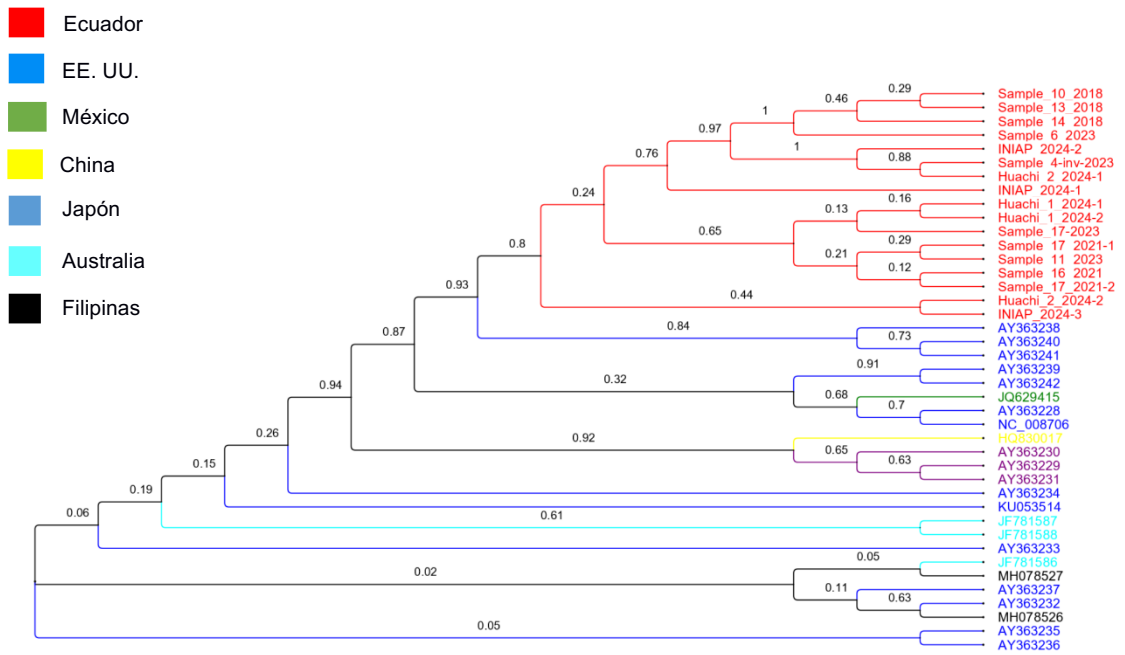
El árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) (Figura 2) reveló una segregación mixta de los 41 aislados, mostrando tanto agrupaciones claramente delineadas con alta confianza como áreas de incertidumbre. Los resultados indican que los aislados ecuatorianos forman un solo grupo filogenético en conjunto con los aislados estadounidenses de *R. ursinus* (AY363238, AY363240) y *R. occidentalis* 'Munger' (AY363241) (Figura 1). También, se observa un clado claramente definido formado por aislados de origen japonés (AY363230, AY36329, AY363231) junto con un aislado de China (JQ629415). El resto de los aislados forman grupos filogenéticos de origen transcontinental o tienen un bajo soporte estadístico con valores de Bootstrap menores al 70%.

En términos de porcentaje de identidad de nucleótidos (nt), los aislados de linajes ecuatorianos contienen múltiples secuencias idénticas o apenas divergentes (entre 97% a 100% idénticas entre sí). De la misma manera, la matriz de identidad se reveló un alto nivel de similitud (95-97%) entre las secuencias ecuatorianas y las secuencias de origen estadounidense (AY363238, AY363240 y AY363241). Esto último se confirmó mediante el árbol filogenético. En general, los 41 aislados utilizados en este estudio comparten ≥ 85 de identidades por pares entre sí.

Por ende, se presume una relación estrecha entre los aislados ecuatorianos y los aislados estadounidenses con una baja variabilidad, lo que sugiere que SNSV podría haber sido introducido recientemente a Ecuador mediante la importación de material vegetal infectado procedente de Estados Unidos, específicamente de la región Pacific Northwest.

Figura 2

Análisis filogenético de strawberry necrotic shock (SNSV) basado en las secuencias de aminoácidos de CP



Nota. El árbol filogenético se elaboró con el método ML, basado en el modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) con tasas uniformes y 100 réplicas de Bootstrap. Los aislados se colorearon según su país de origen. El mapa mundial muestra el origen de las secuencias analizadas resaltadas con colores. El mapa se creó utilizando Mapchart (<https://www.mapchart.net/>).

Tabla 3

Listado de los aislados de SNSV de *Fragaria* y *Rubus* spp. analizados en este trabajo

Número	Fecha de colecta	Código de este estudio	Anfitrión	Cultivar	No. de acceso a GenBank	País de Origen	Localidad	Referencia
1	2018	10	<i>Rubus glaucus</i>	Castilla	N/A	Ecuador		
2	2018	13	<i>Rubus glaucus</i>	Castilla	N/A	Ecuador		
3	2018	14	<i>Rubus glaucus</i>	Castilla	N/A	Ecuador		
4	2021	17_1	<i>Rubus glaucus</i>	N/A	N/A	Ecuador		
5	2021	16	<i>Rubus glaucus</i>	N/A	N/A	Ecuador		
6	2021	17_2	<i>Rubus glaucus</i>	N/A	N/A	Ecuador		
7	2023	6	<i>Rubus glaucus</i>	N/A	N/A	Ecuador		
8	2023	4 INV	<i>Rubus glaucus</i>	N/A	N/A	Ecuador		
9	2023	17	<i>Rubus glaucus</i>	N/A	N/A	Ecuador		N/A
10	2023	11	<i>Rubus glaucus</i>	N/A	N/A	Ecuador		
11	2024	INIAP_1	<i>Rubus glaucus</i>	148	N/A	Ecuador		
12	2024	INIAP_2	<i>Rubus glaucus</i>	148	N/A	Ecuador		
13	2024	INIAP_3	<i>Rubus glaucus</i>	148	N/A	Ecuador		
14	2024	HUACHI_1_1	<i>Rubus glaucus</i>	Andimora	N/A	Ecuador		
15	2024	HUACHI_1_2	<i>Rubus glaucus</i>	Andimora	N/A	Ecuador		
16	2024	HUACHI_2_1	<i>Rubus glaucus</i>	Andimora	N/A	Ecuador		
17	2024	HUACHI_2_2	<i>Rubus glaucus</i>	Andimora	N/A	Ecuador	Tungurahua	

18	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	N/A	AY363228	EE.UU.	Mayrland
19	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	Oishi-shikinari	AY363229	JAPAN	N/A
20	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	Koro	AY363230	JAPAN	N/A
21	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	Sokusei	AY363231	JAPAN	N/A
22	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	US-70	AY363232	EE.UU.	Mississippi
23	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	US-159	AY363233	EE.UU.	Mississippi
24	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	Melcher	AY363234	EE.UU.	Louisiana
25	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	Sweet Charlie	AY363235	EE.UU.	Florida
26	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	G980	AY363236	EE.UU.	California
27	N/A	<i>Fragaria x ananassa</i>	MS-US-540	AY363237	EE.UU.	Carolina del Norte
28	N/A	<i>Rubus ursinus</i>	Dyke	AY363238	EE.UU.	Pacific Northwest
29	N/A	<i>Rubus hybrid</i>	New Logan	AY363239	EE.UU.	Pacific Northwest
30	N/A	<i>Rubus ursinus</i>	NCGR 9025	AY363240	EE.UU.	Pacific Northwest
31	N/A	<i>Rubus occidentalis</i>	Munger	AY363241	EE.UU.	Pacific Northwest
32	N/A	<i>Rubus idaeus</i>	Willamette	AY363242	EE.UU.	Pacific Northwest

(I. E. Tzanetakis et al., 2004)

33	2008	<i>Fragaria</i> <i>x</i> <i>ananassa</i>	N/A	HQ830017	CHINA	N/A	(Li & Yang, 2011)
34	1979	<i>Fragaria</i> <i>x</i> <i>ananassa</i>	N/A	JF781586	AUSTRALIA	N/A	
35	N/A	<i>Fragaria</i> <i>vesca</i>	N/A	JF781587	AUSTRALIA	N/A	(Sharman et al., 2011)
36	N/A	<i>Fragaria</i> <i>vesca</i>	N/A	JF781588	AUSTRALIA	N/A	(Silva-Rosales et al., 2013)
37	2008	<i>Fragaria</i> <i>x</i> <i>ananassa</i>	<i>Duch</i>	JQ629415	MEXICO	Guanajuato	(Thekke Veetil et al., 2016)
38	2013	<i>Fragaria</i> <i>x</i> <i>ananassa</i>	N/A	KU053514	EE.UU.	Florida	
39	2017	<i>Fragaria</i> <i>x</i> <i>ananassa</i>	Festival	MH078526	FILIPINAS	N/A	(Pinon & Martin, 2018)
40	2017	<i>Fragaria</i> <i>x</i> <i>ananassa</i>	Sweet Charlie	MH078527	FILIPINAS	N/A	
41	N/A	N/A	N/A	NC_008706	EE.UU.	Mayrland	I. E. Tzanetakis et al., 2010)

Nota. Las secuencias del número 1 al número 17 corresponden a aislados ecuatorianos, mientras que a partir de la secuencia 18 hasta la 41 son secuencias homólogas internacionales recuperadas de GenBank.

3.3 Ocurrencia y medidas de manejo de SNSV en Ecuador

Se registró que SNSV (Tabla 4) fue detectado en 18%, 77% y 87% de las muestras de mora recolectadas en 2021, 2023 y 2024 en la provincia de Tungurahua, respectivamente, sin embargo, no se registró en Azuay y Pichincha, ni en las muestras de frutilla “Albión” de Tungurahua. Tal parece indicar que SNSV solo está circulando en mora en Tungurahua, aunque no se descarta la posibilidad de que el virus pueda encontrarse en otras provincias no muestreadas de la región Andina. Cabe resaltar que la incidencia muestra un aumento significativo progresivo desde un 17% en 2021 hasta 87%

en 2024. Esto sugiere un incremento considerable en los casos de SNSV en *R. glaucus* en Tungurahua, indicando una posible propagación o mayor prevalencia de la enfermedad en estos años.

Estos hallazgos podrían ser resultado de que las moras generalmente se propagan vegetativamente, a través de estacas, acodos y mediante procesos de gemación/micropropagación. La propagación vegetativa es una forma eficaz de transmisión de virus como en el caso de SNSV, de una planta madre a la progenie. Además, en Ecuador no existe ningún programa nacional de certificación fitosanitaria para garantizar que el material de propagación de plantas esté limpio y disponible.

Por ello, se deben diseñar estrategias efectivas de manejo para controlar la propagación de SNSV, considerando los datos recopilados en este estudio sobre la prevalencia y diversidad del virus, así como su interacción con la mora. En general, cualquier estrategia para el manejo de la virosis debe enfocarse fundamentalmente en la prevención, debido a que las opciones de medidas de control de infecciones virales de plantas en el campo son actualmente limitadas porque los virus son inmunes a medidas de control químico, a diferencia bacterias y hongos que pueden tratarse con agentes antibacterianos y antifúngicos (Devi et al., 2024). La detección temprana es crucial para prevenir la propagación, esto se consigue principalmente a través del diagnóstico rápido y confiable del virus con técnicas moleculares basadas en PCR o HTS. Ahora que se conoce que SNSV se encuentra en los cultivos de mora en Tungurahua, se deben tomar medidas preventivas como cuarentenas (control de fronteras) y certificación sanitaria de germoplasma libre de virus para evitar su propagación en otras provincias productoras de mora del país, sobre todo en las provincias de Bolívar, Chimborazo y Pichincha, las cuales limitan con Tungurahua. Otra medida de prevención ampliamente utilizada en el

manejo de infecciones virales es la reducción de fuentes de inóculo, eliminando los huéspedes alternativos como las malas hierbas alrededor de los cultivos, las cuales pueden actuar como huéspedes alternativos. A fin de implementar estas medidas preventivas de manera efectiva se requiere del esfuerzo en conjunto del Estado ecuatoriano, viveristas, agricultores y centros de investigación para evitar la propagación a nuevas zonas geográficas y la aparición de nuevas variantes de SNSV en los cultivos de mora y frutilla.

Tabla 4

Porcentaje de incidencia del virus SNSV en Ecuador (%)

Provincia	Hospedero	Incidencia de SNSV (%)		
		Año		
		2021	2023	2024
Azuay	<i>R. glaucus</i>	0	0	-
Tungurahua	<i>Fragaria x ananassa, "Albion"</i>	0	0	-
	<i>R. glaucus</i>	17	77	87
Pichincha	<i>R. glaucus</i>	-	-	0

Nota. Los hospederos son muestras de frutilla y mora en las provincias de Azuay, Tungurahua y Pichincha, muestreadas durante los años 2021, 2023 y 2024.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

- En resumen, este estudio determinó la ocurrencia y la variabilidad genética del virus *strawberry necrotic shock virus* (SNSV) a partir de material vegetal infectado de la región Sierra de Ecuador. En conjunto, estos hallazgos facilitan la comprensión de la diversidad genética y la prevalencia espacial y temporal de SNSV en Ecuador. Esto es crucial para el desarrollo de estrategias más efectivas enfocadas en la prevención contra SNSV en los cultivos de mora.
- También, se estudió la ocurrencia de SNSV en *R. glaucus* y *Fragaria spp.* en las provincias de Tungurahua, Azuay y Pichincha durante los años 2021, 2023 y 2024. SNSV al parecer solo se encuentra circulando en mora en la provincia de Tungurahua. Aunque, no se conoce con exactitud la magnitud de la diseminación del virus en Ecuador, dado que no se muestrearon todas las provincias productoras de mora.
- Por último, se analizó la variabilidad genética, las relaciones filogenéticas y los patrones de recombinación en función del gen de la proteína CP del virus SNSV de 17 aislados ecuatorianos de los años 2021, 2023 y 2024 en comparación con 24 aislados homólogos recuperados de GenBank de diferentes regiones geográficas. Con base a los datos generados, se concluye que el gen CP tiene una baja diversidad genética y no presenta eventos de recombinación significativos que indiquen la aparición de nuevos virus o variantes

recombinantes. Además, los análisis filogenéticos indicaron que los 17 aislados ecuatorianos analizados en este estudio están más estrechamente relacionados entre sí y forman un clado en conjunto con los aislados estadounidenses (AY363238, AY363240, AY363241).

4.2 Recomendaciones

Tras culminar lo planificado en la propuesta de estudio se obtienen las siguientes recomendaciones primordiales:

- Se recomienda para futuros trabajos que se amplie la toma de muestras a otras provincias de la región Andina que cultiven mora como Bolívar, Chimborazo y Carchi, con el objetivo de ofrecer una perspectiva más completa de la distribución y diversidad de SNSV.
- Podríamos complementar el estudio mediante la investigación de las malezas cercanas a las plantaciones de mora. Analizar las secuencias genéticas podría proporcionar información valiosa sobre posibles reservorios de SNSV en el entorno agrícola, ya que las malezas a menudo actúan como hospederos alternativos para virus y pueden desempeñar un papel en la propagación y mantenimiento del virus.
- Se recomienda el uso adicional de otros genes de SNSV en los análisis filogenéticos, como el gen de la proteína de movimiento (MP) o el gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP). Esto permitirá corroborar y complementar los resultados filogenéticos obtenidos en este estudio

mediante el gen CP. Las regiones de incertidumbre encontradas en el árbol filogenético podrían ser resueltas con los árboles de MP y RdRP.

- Por último, se recomienda investigar cómo el SNSV interactúa con otros virus que coexisten en las plantaciones de mora y en el entorno agrícola. Analizar la coexistencia y posible interacción entre SNSV y otros virus como RBDV, otro virus que también afecta a las plantaciones de mora puede proporcionar información valiosa sobre las dinámicas virales y la salud general de los cultivos, de tal manera que se puedan realizar estrategias de manejo más efectivas considerando la coinfección con múltiples virus como factor importante. Este estudio podría complementarse bien con el análisis de RBDV, otro virus que también afecta a las plantaciones de mora.

Referencias

- agropecuaria, C. colombiana de investigación. (2005). *Manual técnico para el cultivo de la mora de castilla*. Corporación colombiana de investigación agropecuaria - AGROSAVIA. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13515>
- Barrera, V. H., Alwang, J., Andrango, G., Domínguez Andrade, J. M., Escudero, L., Martínez, A., Jácome, R., & Arévalo, J. (2017). *La cadena de valor de la mora y sus impactos en la Región Andina del Ecuador*. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Unidad de Economía Agrícola, 2017.
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4700>
- Benavides, M., Cardona, W., Garcia, M., Zapata Narvaez, Y., Martinez Lemus, E., & Bautista Montealegre, L. (2021). *Mora (Rubus glaucus Benth.). Manual de recomendaciones técnicas para su cultivo en el departamento de Cundinamarca*.
- Galarza, D., Garcés, S., Velásquez, J., Sánchez Arizo, V. H., & Zambrano Mendoza, J. L. (2016). *El cultivo de la mora en el Ecuador*.
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4878>
- 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>
- Hasiów-Jaroszewska, B., Boezen, D., & Zwart, M. P. (2021). Metagenomic Studies of Viruses in Weeds and Wild Plants: A Powerful Approach to Characterise Variable Virus Communities. *Viruses*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/v13101939>

- Health (PLH), E. P. on P., Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Gonthier, P., Jacques, M.-A., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., MacLeod, A., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Parnell, S., Potting, R., Reignault, P. L., Thulke, H.-H., Van der Werf, W., Vicent Civera, A., Yuen, J., Zappalà, L., ... Rubino, L. (2020). Pest categorisation of non-EU viruses of *Rubus* L. *EFSA Journal*, *18*(1), e05928.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5928>
- Hernández Pachón, D. M., Árdila Panesso, S. M., Díaz Jiménez, J. S., Perilla Gómez, M. A., Cubillos Pedraza, D. D., Serrano Sánchez, J. C., Quesada Pacheco, M. F., & Pulido Ortiz, N. L. (2018). Caracterización de agentes causales de enfermedades en el cultivo de mora (*Rubus glaucus*) en la finca manantial en la vereda sabaneta, municipio de La Vega, Cundinamarca. *Revista Ciencias Agropecuarias (RCA)*, *4*(1), 9–17.
- Ho, T., & Tzanetakis, I. E. (2014). Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing. *Virology*, *471–473*, 54–60.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.019>
- Jaya, F. R., Brito, B. P., & Darling, A. E. (2023). Evaluation of recombination detection methods for viral sequencing. *Virus Evolution*, *9*(2), vead066.
<https://doi.org/10.1093/ve/vead066>
- Maina, S., Donovan, N., Plett, K., Bogema, D., & Rodoni, B. (2024). High-throughput sequencing for plant virology diagnostics and its potential in plant health certification. *Frontiers in Horticulture*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fhort.2024.1388028>
- Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B., & Tzanetakis, I. E. (2013). Viruses and Virus Diseases of *Rubus*. *Plant Disease*, *97*(2), 168–182.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0362-FE>

- Martínez, A., Vásquez C., W., Viteri D., P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). *Ficha técnica de la variedad de mora sin espinas (Rubus glaucus Benth) INIAP ANDIMORA-2013*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4768>
- Nehra, C., Verma, R. K., Petrov, N. M., Stoyanova, M. I., Sharma, P., & Gaur, R. K. (2022). Chapter 24—Computational analysis for plant virus analysis using next-generation sequencing. In P. Sharma, D. Yadav, & R. K. Gaur (Eds.), *Bioinformatics in Agriculture* (pp. 383–398). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89778-5.00013-1>
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J. C., Palero, F., & González-Candelas, F. (2015). Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution*, *30*, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.022>
- Qiang-long, Z., Shi, L., Peng, G., & Fei-shi, L. (2014). High-throughput Sequencing Technology and Its Application. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, *21*(3), 84–96. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(14\)60073-8](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(14)60073-8)
- Salazar-Yepes, M., CARDONA, M., & CÉSPEDES, P. (2007). ESPECIES DE COLOMBIA, ECUADOR Y PERÚ PERTENECIENTES AL GÉNERO GERWASIA RACIBORSKI DEL ORDEN UREDINALES Species from Colombia, Ecuador and Peru belonging to the genus Gerwasia Raciborski from the order Uredinales. *Caldasia*, *29*.
- Sastry, K. S., & Zitter, T. A. (2014). Management of Virus and Viroid Diseases of Crops in the Tropics. In K. S. Sastry & T. A. Zitter (Eds.), *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics: Volume 2: Epidemiology and Management* (pp. 149–480). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7820-7_2

- Schulz, M., & Chim, J. F. (2019). Nutritional and bioactive value of *Rubus* berries. *Food Bioscience*, *31*, 100438. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100438>
- Simkovich, A., Kohalmi, S. E., & Wang, A. (2021). Ilarviruses (Bromoviridae). In D. H. Bamford & M. Zuckerman (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)* (pp. 439–446). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21301-0>
- Tzanetakis, I. (2022). Strawberry necrotic shock virus (Strawberry necrotic shock virus). *CABI Compendium*, *CABI Compendium*.
<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.118867>
- Tzanetakis, I. E. (2012). Strawberry necrotic shock virus (Strawberry necrotic shock virus). *CABI Compendium*, *CABI Compendium*, 118867.
<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.118867>
- Tzanetakis, I. E., Mackey, I. C., & Martin, R. R. (2004). Strawberry necrotic shock virus is a distinct virus and not a strain of Tobacco streak virus. *Archives of Virology*, *149*(10), 2001–2011. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0330-y>
- Viteri D., P., Vásquez C., W., Viera, W., Sotomayor, A., & Mejía, P. (2016). *Ecología para el desarrollo y crecimiento de la mora*. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura, 2016.
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4051>
- Wang, Y. M., Ostendorf, B., Gautam, D., Habili, N., & Pagay, V. (2022). Plant Viral Disease Detection: From Molecular Diagnosis to Optical Sensing Technology—A Multidisciplinary Review. *Remote Sensing*, *14*(7), Article 7.
<https://doi.org/10.3390/rs14071542>
- Iza, M., Viteri, P., Hinojosa, M., Martínez, A., Correa, A.V., & Viera, W. (2020). Diferenciación morfológica, fenológica y pomológica de cultivares comerciales de

mora (*Rubus glaucus* Benth). *Agricultural and Food Sciences*, 11(2), 47-57. DOI:
10.29019/enfoque.v11n2.529

Yunda, A., & David, F.F. (2019). Canales de comercialización de la mora (*Rubus glaucus* benth) para la asociación de productores de mora de Guantug Cruz. *Agricultural and Food Sciences*.