



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima Ciencias Biológicas,  
Oceanográficas y Recursos Naturales.**

“Diagnóstico molecular de geminivirus en plantaciones comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y malezas asociadas al cultivo, en la provincia Santa Elena.”

## **TESIS DE GRADO**

Previo a la obtención del título de:

## **BIÓLOGO**

Presentada por:

María Alejandra Ibarra Matamoros

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2012

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por todas las bendiciones que me ha brindado, a mis padres, a mi hermana y mi abuelita, por el apoyo incondicional que he recibido durante estos años; a la Dra. Esther Peralta, a la Ing. Lisbeth Espinoza y al M.Sc. Pablo Chong, por la oportunidad que me brindaron para realizar mi tesis en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), y por su apoyo y orientación para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación Científica y Biotecnológica (CICYT) por el apoyo y financiamiento brindado para la ejecución de este trabajo de investigación.

A todo el personal del CIBE que, con su colaboración, permitieron que se culmine este estudio, y de manera especial a aquellos que se convirtieron, no solo en mis compañeros, si no, en mis amigos: a la Ing. Ana María Campuzano, al Ing. Jorge Paredes, al Ing. Robert Álvarez y al Biólogo Cristian Romero, por la invaluable y permanente ayuda brindada.

A mis profesores de FIMCBOR, de manera especial al Dr. Marcelo Muñoz, M.Sc. Cesar Bedoya y Dr. Washintong Cárdenas por poner a mi disposición los reactivos, software y equipos que fueron necesarios.

A mi amor, Jorge Rafael Paredes, que me ha brindado su apoyo, paciencia y cariño.

A mis amigos de siempre por las palabras de aliento y los abrazos que me han dado: Ana María Campuzano, Fernanda Ratti, Jennifer Choca, Lorena Monserrate, Favio Alvarado, Nicolás Esparza, Freddy Magdama, Gabriela Maridueña y Mirian Villavicencio.

## DEDICATORIA

A toda mi familia, en especial a mis padres:  
MSc. Clara Matamoros y Sr. Mariano Ibarra  
que han sido los pilares fundamentales de mi  
vida.

A mi hermana Jullyana Ibarra, mi eterna  
compañera, que ha permanecido a mi lado  
en las buenas y en las malas.

A mi abuelita Argentina Samaniego.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



M.Sc. Jerry Landivar Z.  
Decano de la FIMCBOR  
PRESIDENTE



Ing. Lisbeth Espinoza L.  
Asistente de investigación del CIBE  
DIRECTORA DE TESIS



M.Sc. Marcos Álvarez G.  
CO-DIRECTOR

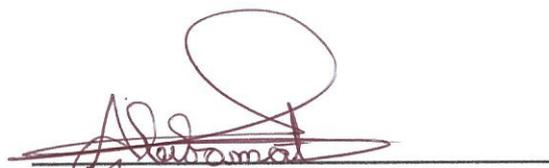


M.Sc. Francisca Burgos V.  
VOCAL

## DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



María Alejandra Ibarra Matamoros

## RESUMEN

Los geminivirus están constituidos por cuatro géneros, siendo los begomovirus los más destacados, debido a las características de su vector *Bemisia tabaci* y alta tasa de recombinación que exhiben. Esta familia ha provocado pérdidas estimadas entre 40 y 100% en diferentes cultivos de regiones tropicales y subtropicales como fréjol, tomate, melón, tabaco, calabaza, pimiento, entre otros. El presente trabajo tuvo la finalidad de diagnosticar, secuenciar e identificar por primera vez la presencia de geminivirus mediante la aplicación de técnicas moleculares en plantaciones de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y malezas (*Luffa* sp. e *Ipomoea* sp,) asociadas a este cultivo en la provincia Santa Elena-Ecuador.

Se realizaron muestreos dirigidos en las plantaciones de tomate donde se observó: altas poblaciones de mosca blanca (*B. tabaci*) y síntomas relacionados con la presencia de geminivirus tales como amarillamiento, arrugamiento, clorosis, deformaciones, enanismo y enroscamiento de la hoja.

Se realizó la extracción de ADN total de las muestras y para determinar la presencia de geminivirus se emplearon iniciadores dirigidos a amplificar la región central del gen que codifica para la cápside proteica (CP). Las muestras que amplificaron la región de interés fueron clonadas y secuenciadas; además se establecieron relaciones filogenéticas entre varios

miembros del género *Begomovirus* que se encuentran afectando al tomate en América.

El 34% de las muestras recolectadas en campo resultaron positivas en el diagnóstico inicial de geminivirus mediante el uso de cebadores degenerados, la mayoría de estas asociadas con síntomas de enrollamiento de la hoja y clorosis. En los análisis filogenéticos se demostró que el geminivirus encontrado presentaba una homología genética del 99% con el Virus de la deformación de la hoja de tomate (ToLDeV), una nueva especie de begomovirus identificada en Perú; encontrándose cuatro variaciones en la secuencia ecuatoriana, las cuales están ubicadas en los nucleótidos 71, 239, 240 y 450 reemplazando G, T, C y T por A, A, G y C del ToLDeV. Dichas variaciones en los nucleótidos originaron que al convertirse en aminoácidos ciertos tripletes cambien: el codón que codifica para Arginina CGT (R) fue reemplazado por una Histidina CAT (H), mientras que la variación TCT por AGT no ocasionó ningún cambio, ya que estos dos tipos de tripletes codifican para Serina (S); así mismo el cambio en la última base de TAT por TAC, no causa ninguna variación significativa, codificando Tyrosina (Y) en las dos posiciones.

Los resultados expuestos, constituyen los primeros en la identificación de esta nueva especie de geminivirus en el país afectando los cultivos de

tomate y malezas acompañantes; sin embargo no se descarta la presencia de otras especies aún no identificadas.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. GEMINIVIRUS Y TOMATE.....</b>	<b>4</b>
1.1 Clasificación taxonómica, características generales e importancia de los geminivirus.....	4
1.2 Géneros de la familia de los Geminiviridae.....	10
1.3 Tomate.....	19
1.3.1 Importancia económica.....	20
1.3.2 Principales geminivirus que afectan los cultivos de tomate.....	22
1.3.3 Medidas de control.....	23
1.4 Métodos de Diagnóstico e identificación.....	24
1.4.1 Diagnóstico Molecular.....	25
1.4.2 Clonación.....	26
1.4.3 Secuenciación.....	26
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.1. Recolección de muestras de campo.....	28
2.2. Descripción de síntomas.....	31
2.3. Extracción de ADN y Electroforesis.....	31
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis.....	34
2.5. Clonación y secuenciación.....	36
2.6. Análisis y comparación de datos obtenidos.....	39

<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>41</b>
3.1. Recolección de muestras en campo y síntomas .....	41
3.2. Extracción de ADN .....	45
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa .....	46
3.4. Obtención de Clones. ....	52
3.5. Secuencia del Genoma viral .....	53
3.6. Comparación de la secuencia y análisis filogenético .....	54
<b>4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>67</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>79</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACR	Amplificación por círculo rodante
AND	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNdc	ADN de doble cadena
ADNsc	ADN de simple cadena
ADNv	ADN viral
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B	Bases
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
h	Horas
HAN	Hibridación de ácidos nucleicos
Kb	Kilobases
Kg/Ha	Kilogramos/ hectarias
M	Molar
Mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Ng	Nanogramos
Nm	Nanometros
Nt	Nucleótido
O	Oeste
OR	Origen de replicación
ORF	Marco abierto de lectura
Pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Sur
' / min	Minutos
" / seg	Segundos
%	Porcentajes
°	Grado
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µg/ml	Microgramos/mililitros
µl	Microlitros

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Ciclo de replicación viral de los geminivirus y movimiento intracelular del ADN viral.....	10
Figura 2: Genoma bipartito del género <i>Begomovirus</i> : componente A y B .....	14
Figura 3: Genoma monopartito del género <i>Curtovirus</i> .....	16
Figura 4: Genoma monopartito del género <i>Mastrevirus</i> .....	17
Figura 5: Genoma monopartito del género <i>Topocuvirus</i> .....	19
Figura 6: Ubicación de la Hacienda Azúcar.....	29
Figura 7 Localidad San Rafael, Hacienda Luz Victoria.....	30
Figura 8 Hacienda El Azúcar, cultivo de tomate ( <i>S lycopersicum</i> var. Dominic).....	41
Figura 9: Presencia del complejo de moscas blancas <i>B. tabaci</i> y <i>B. argentifolii</i> en los cultivos de tomate ( <i>S. lycopersicum</i> ), malezas y cultivos aledaños.....	42
Figura 10: Muestras de hojas de la hacienda Chanduy con presencia de síntomas de manchas amarillas en las hojas nuevas.....	44
Figura 11: Síntomas relacionados con la presencia de geminivirus en maleza y tomate.....	45
Figura 12: Análisis de electroforesis de la presencia de ADN total en las muestras recolectadas en la Hacienda Azúcar (A y T), Chanduy (C) y Luz Victoria (V). A, T, C, V corresponden a muestras de tomate, mientras que AM, TM, CM, y VM corresponden a malezas.....	46
Figura 13: Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles del 1 al 3 corresponden a muestras de tomate positivas para geminivirus con amplicones de casi 600 nucleótidos; del 4 al 7 corresponden a	

	muestras negativas de tomate para geminivirus, 8 es el control positivo, y 9 el blanco del ensayo.....	47
Figura 14	Análisis de correspondencias entre los síntomas y la infección por geminivirus para las muestras de tomate.	52
Figura 15	Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se muestra la digestión de los productos clonados con la enzima <i>Not I</i> . Se empleó un marcador de 1kb (M), los códigos corresponden a: blancos=B, Hacienda Azúcar= A y T, Chanduy =C y Luz Victoria =V. A, T, C, V corresponden a muestras de tomate, mientras que AM, TM, CM, y VM corresponden a malezas.....	53
Figura 16	Alineación de las secuencias de nucleótidos de ToLDeV del Perú con las tres secuencias encontradas en Ecuador.....	55
Figura 17	Alineación de las secuencias de aminoácidos de ToLDeV, del Perú con las tres especies identificadas en Ecuador C5, C8, C2.....	56
Figura 18	Dendograma que muestra la relación entre 20 begomovirus que infectan únicamente a los cultivos de <i>S. lycopersicum</i> , empleando el alineamiento de secuencias 186 de aminoácidos de la región central de la cápside proteica.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I: Reactivos que conforman la solución tamponada de extracción (“buffer” de extracción).....	32
Tabla II: Iniciadores universales para geminivirus.....	34
Tabla III: Programa de amplificación para AVcore y ACcore.....	35
Tabla IV: Reacción de ligación.....	36
Tabla V: Geminivirus alineados en Bioedit.....	40
Tabla VI: Muestras recolectadas en la provincia de Santa Elena.....	42
Tabla VII: Descripción de síntomas en tomate.....	43
Tabla VIII: Descripción de síntomas en maleza.....	44
Tabla IX: Muestras que presentaron ADN.....	46
Tabla X: Porcentaje de muestras infectadas con geminivirus....	47
Tabla XI: Tabla de contingencia entre síntomas e infección en tomate.....	50
Tabla XII: Tabla de contingencia entre síntomas e infección en malezas.....	50

## INTRODUCCIÓN

La presencia de geminivirus (en especial el género *Begomovirus*), se ha incrementado notablemente desde el año 1986, (1), (2) convirtiéndose en un problema emergente debido a las mutaciones y recombinaciones genéticas de estos virus que han sido reportadas en los últimos años (3), (4). Lo que ha permitido este incremento y variación genética es la presencia de la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) biotipo B (5), su principal vector, que es un organismo con un amplio rango de hospederos, alta capacidad de proliferación, gran resistencia a varios tipos de insecticidas y dispersión en diferentes pisos climáticos (6), (7).

La familia *Geminiviridae* está formada por virus de ADN circular de simple cadena (3), (8), (9) y agrupa cuatro géneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* y *Topocuvirus* (4), (10). Esta familia de virus ha causado problemas en más de 20 países en América Central (México, Costa Rica), el Caribe (Cuba, República Dominicana y Jamaica) y América del Sur (Colombia, Venezuela, Perú, Brasil, Argentina y Chile), ya que estos virus y sus vectores pueden desarrollarse con facilidad en zonas tropicales y subtropicales del mundo (10).

Los geminivirus pueden llegar a ocasionar pérdidas que varían entre el 40 y el 100% de la producción (6), su nivel de perjuicio afecta por lo menos, a 17 tipos de cultivos, entre ellos se cuentan: fréjol, tomate, ayote, algodón, soya, melón, tabaco, calabaza y pimiento entre otros (3).

En el ámbito nacional, los rendimientos del cultivo de tomate hasta el año 2009 han sido estimados en 20.600 Kg/Ha aproximadamente, mientras que en países vecinos como Colombia y Perú se encuentran alrededor de 29.911 y 37.223 Kg/Ha respectivamente (11). Estas cifras demuestran los bajos rendimientos que existen en el Ecuador debido a factores como falta de tecnología, mal manejo del cultivo y enfermedades de diferentes tipos, en muchos casos no conocidas ni estudiadas.

La mayoría de los estudios realizados en América han sido desarrollados en México, Cuba, Venezuela y Brasil, entre otros, pero en Ecuador, hasta el 2010 no existían resultados que demuestren la presencia de geminivirus afectando los cultivos de tomate. Sin embargo los estudios desarrollados por Arias y Valarezo (12), (13), describen una alta incidencia de mosca blanca en el país y sugieren la posible presencia de geminivirus en los cultivos afectados por este insecto.

La presencia de virus en diferentes tipos de cultivos puede ser diagnosticada por medio de la sintomatología presente, pruebas serológicas (ELISA) y técnicas moleculares (PCR, ACR, etc), (14). Sin embargo para el caso de

geminivirus, la metodología más empleada para el diagnóstico es la molecular, debido a su especificidad y rapidez. (15), (16), (17).

Los síntomas en campo asociados con la infección de geminivirus en diferentes hospedantes pueden ser: mosaico amarillo brillante, enrollamientos, reducción del área foliar, enanismo, epinastia, maduración prematura de los frutos, moteado clorótico y clorosis foliar interna o de los márgenes (14), (18); sin embargo estos síntomas también pueden ser producidos por otras especies virales, por lo que en muchos casos carecen de valor diagnóstico.

La existencia en los cultivos de ciclo corto del vector principal (*B. tabaci*) junto a la de síntomas relacionados con geminivirus, en especial del género *Begomovirus*, hace considerar la posibilidad de la presencia de algunas de sus especies en la provincia de Santa Elena, por lo que el objetivo principal de este estudio, fue diagnosticar la presencia de la familia *Geminiviridae* en los cultivos de tomate de esta provincia; para lo que fue necesario: recolectar muestras de este tejido vegetal junto con las malezas asociadas al cultivo, con síntomas relacionados con infección por geminivirus. Luego mediante la aplicación de técnicas moleculares se diagnosticó la presencia de geminivirus para luego, clonar, secuenciar, y comparar los resultados con otras especies reportadas en América.

# CAPÍTULO 1

## 1. GEMINIVIRUS Y TOMATE

### 1.1 Clasificación taxonómica, características generales e importancia de los geminivirus.

La familia *Geminiviridae*, constituyen a una de las tres familias virales con mayor importancia económica a nivel mundial y la segunda más grande de los virus vegetales (17), (19), que afectan a una gran diversidad de especies de plantas en zonas tropicales y subtropicales (2), (20), (21), Esta familia incluye aproximadamente 295 miembros, 218 de los cuales constituyen especies totalmente definidas como geminivirus y 77 aún se consideran especies tentativas (22).

Se cree que la primera referencia sobre la presencia de este virus fue hecho en el año 752 DC, por la emperatriz japonesa Koken, al referirse a la apariencia de una hoja de una planta, conocida hoy en

día como *Eupatorium makinoi*, que presentaba una coloración amarilla, y según la descripción lírica, se trata del síntoma mosaico amarillo, frecuente de geminivirus (23). Sin embargo, la identificación, caracterización y reconocimiento de los geminivirus como una familia viral vegetal por parte del Comité Internacional Taxonómico de Virus (ICTV) no se produjo hasta 1978 (24).

Se ha reportado que los geminivirus pueden afectar a más de 74 familias vegetales a nivel mundial (24), incluyendo especies de importancia comercial como: el fréjol (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimiento (*Capsicum annum* L), remolacha (*Beta vulgaris*), algodón (*Gossypium hirsutum*), soya (*Glycine max*), melón (*Cucumis melo*), tabaco (*Nicotiana tabacum* L), calabaza (*Cucurbita pepo* L), maíz (*Zea mays*), entre otras, presentado pérdidas entre el 40 y 100% en la producción (3).

Los geminivirus, son la segunda familia viral de menor tamaño que afectan a las plantas, pues tienen un diámetro de 30 nm y de largo entre 18 y 20 nm (9), (24), además presenta una cápside en forma de dos icosaedros iguales incompletos unidos por una de sus caras, dándole una forma geminada, de ahí se deriva su nombre “gemini=gemelos” (3), (24).

La estructura icosaédrica externa está recubierta por 220 subunidades proteicas (3), y en su interior presenta un genoma de ADN de simple cadena (ADNsc) en forma circular. El material genómico de los geminivirus puede ser monopartito, donde la información genética está ubicada en un solo componente, o bipartito, es decir que su material genómico está distribuido en dos componentes, cada una de los cuales tiene una longitud entre 2500 a 3000 nucleótidos (0,7 a  $0,9 \times 10^6$  g/mol) (24), (25). Sin embargo este tipo de genomas bipartitos es más común en los begomovirus.

Su genoma total puede transcribir y traducir hasta ocho proteínas que se pueden encontrar codificadas en sentido positivo (viral) o negativo (complementario) de acuerdo a la posición que se encuentren los marcos abiertos de lectura (siglas en inglés, ORF) que son secuencias de nucleótidos que se encuentran entre un codón de inicio y un codón de parada, que posiblemente traducen una proteína (3), (24).

Los geminivirus en su región intergénica presentan una horquilla de 30nt y 46nt en los bipartitos y monopartitos respectivamente (24); y una área nanométrica (secuencia invariable de nueve nucleótidos) (TAATATTAC) formando el asa de la horquilla, donde se ha demostrado que la variación o mutación de esta pequeña región origina la inhibición de la replicación viral ya que esta zona es un

elemento de especificidad para el reconocimiento del origen de la replicación (14), (26), (27).

Otra secuencia invariable de importancia que interviene en el reconocimiento para el acoplamiento de la proteína que acelera la replicación viral (REP), es una secuencia repetida (5' GGTAGTAAGGTAG) que está ubicada de ocho a nueve nucleótidos debajo de la secuencia TATA (26).

### **Síntomas comunes causados por geminivirus:**

Los geminivirus afectan a las plantas angiospermas y los síntomas varían de acuerdo a la edad que presenten los cultivos al momento de la infección caso similar es común en los demás fitovirus, (3), (26).

Se ha reportado que los cultivos infectados en etapas tempranas, presentan síntomas más severos y graves que los que son infectados en estadios más avanzados; por lo general en este último caso, el síntoma más común es un retraso en la maduración de los frutos (26).

En plantas monocotiledóneas los síntomas más comunes son: amarillamiento y estriado clorótico en las hojas, mientras que en las dicotiledóneas es el retraso en el crecimiento de la planta y frutos, enrollamiento en las hojas (síntoma de la cuchara), presencia de

moteado o coloración amarillenta, aclaramiento en las venas, arrugamiento y deformación en las hojas nuevas (26).

### **Transmisión e infección viral:**

Hasta los últimos estudios realizados sobre la familia *Geminiviridae* se ha demostrado que no son transmitidos por semillas, y la única manera de infección es originada exclusivamente por insectos vectores pertenecientes al orden *Hemiptera*, mediante un proceso circulatorio, persistente pero no propagativo (1), (26), (28).

El genoma de los geminivirus está estructurado para codificar proteínas para pocas funciones, por lo que depende de la maquinaria celular de su hospedero para el proceso de replicación y expresión de su genoma.

El proceso de infección de los geminivirus inicia cuando el vector, inocular a la planta con el virus y este ingresa al citoplasma, donde se despoja de la cápside proteica e ingresa al núcleo de la célula iniciándose el proceso de replicación viral, donde la cadena de ADN viral (ADN<sub>v</sub>) sirve como template para la formación del ADN complementario pasando de cadena simple (ADN<sub>sc</sub>) a doble cadena (ADN<sub>dc</sub>) que servirá como molde para la transcripción de los genes de la cadena complementaria, así como para la replicación en círculo rodante (Figura 1) (3), (24). A partir del proceso transcriptivo, de esta

molécula se producen las proteínas AC1 y AC3 requeridas para iniciar la replicación (29).

Para la síntesis de la cadena del virión se produce un corte en la molécula de ADN circular en el origen de replicación (OR), esta función es realizada por la proteína AC1, Después del corte esta proteína permanece unida al extremo 5' de la cadena clivada, mientras que el extremo 3' sirve como iniciador para la síntesis de ADN, desplazando la cadena original. La enzima encargada de esta reacción continuamente gira alrededor del ADN molde siguiendo por tanto el modelo del círculo rodante. Cuando una unidad de la cadena ha sido copiada la misma es cortada y ligada para formar una molécula de ADN circular de simple cadena, la cual puede servir como molde para otro ciclo de replicación o puede ser encapsidada dentro de los viriones (3), (24), (29). Debido a este proceso de replicación los geminivirus pueden sufrir de recombinación genética, empleando el mismo mecanismo de los procariontes, proceso que es facilitado debido al gran número de copias de ADN<sub>v</sub> producido por la replicación de círculo rodante, originando mutaciones génicas, en especial cuando hay infecciones mixtas (24).

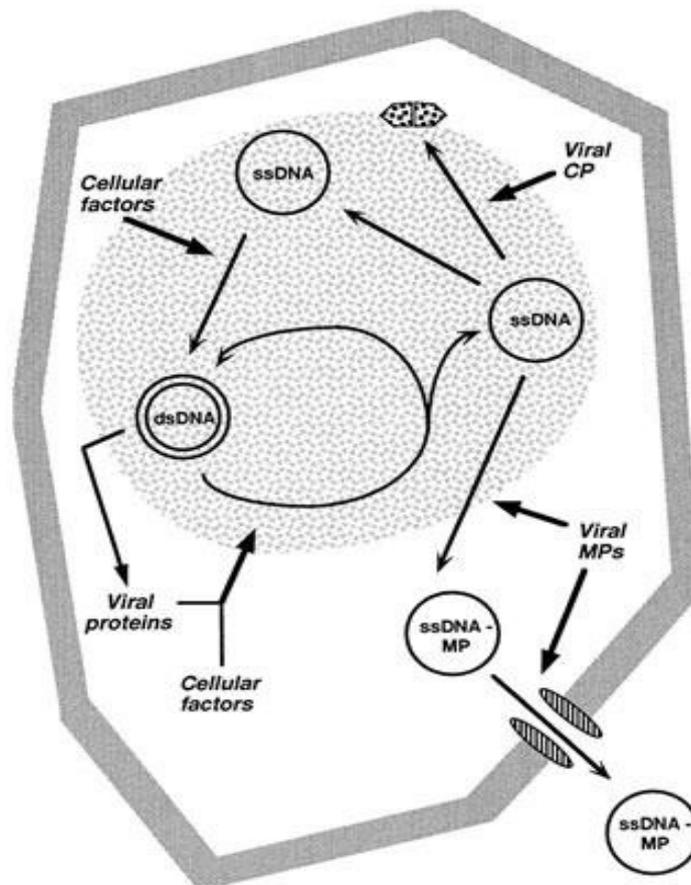


Figura 1: Ciclo de replicación viral de los geminivirus y movimiento intracelular del ADN viral.  
Fuente: Gutiérrez 2003

## 1.2 Géneros de la familia de los *Geminiviridae*

La clasificación taxonómica actual, basada en la variedad de hospedantes, insecto vector, organización del genoma y la similitud de las secuencias, divide a esta familia cuatro géneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus* y *Topocuvirus* (9), (20), (21), (27), sin embargo, estudios del 2009 han identificado una nueva especie, *Eragrostis curvula streak* (ECSV), que podría estar agrupada en un

nuevo género, el cual presenta similitudes específicas lo que hace concluir, que este posible nuevo género no es resultado de recombinaciones genéticas, si no que surgió de un ancestro común (30), sin embargo el género *Begomovirus* es el de mayor importancia y con mayor número de especies, causantes de pérdidas tanto económicas como de producción en zonas tropicales y subtropicales del mundo (3), (14), (17), (20).

#### **Género *Begomovirus*:**

El nombre de este género, surge de *Bean golden mosaic virus* (Virus mosaico dorado del fréjol - BGMV), que fue la primera especie de virus identificada en este género en 1981 (31).

Muchas de las especies de begomovirus constituyen un serio problema en la agricultura por los daños y pérdidas económicas que ocasionan (14).

En países como Cuba, México, Venezuela, Chile; las pérdidas oscilan entre el 20 y el 100% de la producción (2), (3), (14), (16), por lo que es considerado el responsable de las principales pérdidas agroeconómicas en todo el mundo (17).

Los begomovirus afectan a plantas dicotiledóneas tales como son: tomate (*S. lycopersicum* L), pimiento (*C. annum* L), tabaco (*N*

*tabacum* L), fréjol (*P. vulgaris* L), papa (*S. tuberosum* L), etc. causando principalmente alteraciones en el desarrollo, moteado, amarillamiento, y enrollamiento de las hojas (14), (20).

El genoma de los begomovirus puede ser bipartito o monopartito, presentando en el primer caso dos componentes denominados: ADN-A donde se ubican los genes esenciales para la replicación, traducción y transcripción viral y ADN-B están los genes responsables del movimiento viral; a excepción de algunos aislamientos del Virus del rizado amarillo del tomate o mejor conocido por sus siglas TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) y el Virus del rizado amarillo del tomate de Sardinia o conocido como TYLCSV (*Tomato yellow leaf curl sardinia virus*) que son monopartitas (3), (27), incluso hay especies que pueden infectar a plantas de tomate únicamente con el componente ADN-A.

Investigaciones recientes han detectado la presencia de ADN satélites conocidos como ADN- $\alpha$  y ADN- $\beta$  asociados con estas especies monopartitas, siendo esencial para la inducción de síntomas (17), (32), (33), (34). Se considera que todas las especies monopartitas se originaron en el viejo mundo mientras que las bipartitas, son especies nuevas, las cuales surgieron en las zonas tropicales y subtropicales del nuevo mundo (14), (27).

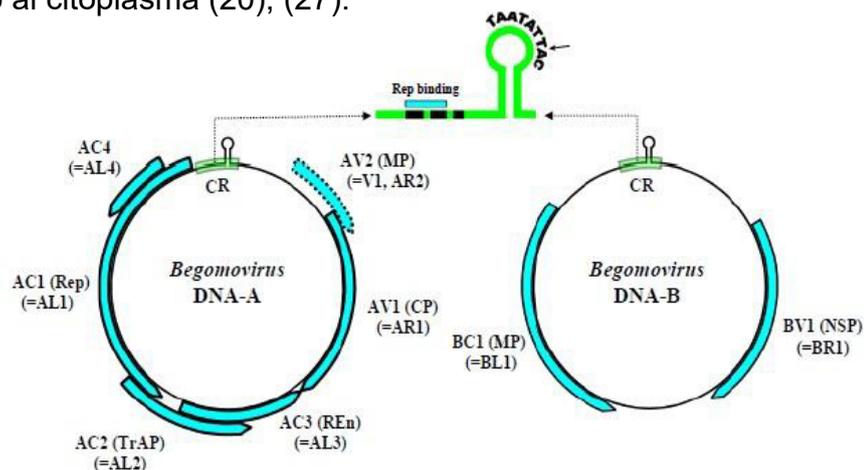
Este género es el grupo más importante de la familia de los *Geminiviridae*, debido a su alta tasa de recombinación dando como resultado una gran número de aislados y cepas (35), (36), su vector es la mosca blanca (*B. tabaci* Gennadius) (HEMÍPTERA: ALEYRODIDAE) que posee un amplio rango de hospederos, abarcando 74 familias vegetales y 500 especies aproximadamente (24). La mosca blanca presenta una gran capacidad de proliferación y en los últimos años ha mostrado resistencia a ciertos insecticidas inorgánicos (21) como: ciclodienos, piretroides y organofosforados (6), (21), (24), (37).

Genéticamente este género están constituidos hasta por ocho ORF distribuidos en un solo componente o en dos. En el caso de los monopartitos, presentan seis genes, cuatro están ubicados en sentido complementario: gen C1 (Rep) que codifica la proteína de la replicación que está asociada a la polimerasa de la planta, el gen C2 (Trap) que controla la transactivación de los genes V1 y V2, el gen C3 (Ren) que incrementa la eficiencia de la multiplicación viral; mientras que el gen V1 (Cp) codifica la cápside proteica del virus y V2 (Mp) es responsable del movimiento, están ubicados en la cadena viral (3), (24).

En el caso de los bipartitas (Figura 2), en el componente ADN-A están los genes: AC1 (Rep) que codifica la proteína esencial para la

replicación del ADN viral, la cual va a estar asociada a la ADN polimerasa del hospedante, el gen AC2 (Trap) que controla la transactivación de los genes AV1 y BV1, el gen AC3 (Ren) que incrementa la eficiencia de la replicación viral, y el gen AC4, que aún se desconoce su función. Estos genes están parcialmente solapados en el ADNc, mientras que en la cadena viral se encuentra el gen AV1 (Cp) que codifica la cápside proteica del virus y AV2 (MP) involucrado en el movimiento del virus en la célula y la inhibición del silenciamiento de los ARN virales (20), (27).

En el componente ADN-B se encuentran en la cadena complementaria, el gen BC1 (Mp) también responsable del movimiento del virus de célula a célula por los plasmodesmos, y en la cadena viral el gen BV1 (Nsp) encargado del movimiento del virus hacia afuera del núcleo al citoplasma (20), (27).



**Figura 2: Genoma bipartito del género *Begomovirus*: componente ADN-A y ADN-B.**

Fuente: Cuong Viet Ha 2007

Investigaciones recientes han demostrado que estos dos componentes no están completamente ligados, ya que los niveles de infección no se encuentran estrictamente unidos al componente ADN-B (26), (27), como es el caso del Virus del rizado amarillo en la hoja del tomate en Tailandia (TYLCTHV,) y el virus mosaico de la yuca en Sri Lanka (SLCMV), los cuales pueden causar infecciones sintomáticas solo con la presencia del componente ADN-A (27).

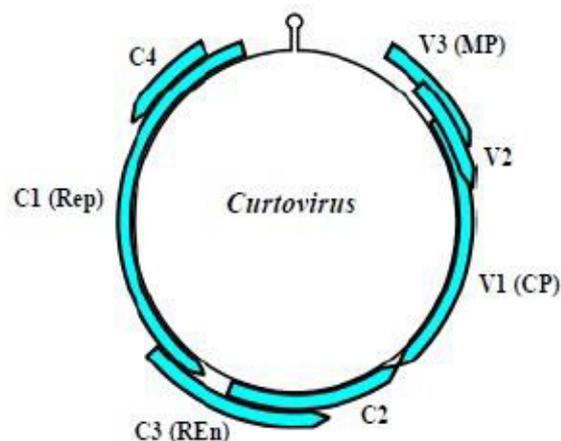
Hasta la actualidad se han descrito 196 especies dentro de este género y aproximadamente 56 individuos tentativos (38).

**Género *Curtovirus*:**

El nombre “Curtovirus” se deriva de la primera especie encontrada, *Beet Curly Top Virus* California (Virus Rizado de la Remolacha de California) (39). Este género afecta alrededor de 300 especies de dicotiledóneas, causando síntomas de amarillamiento, enrollamiento y moteado en las hojas (26), (40).

Genéticamente los virus de este género están conformados por siete genes distribuidos dentro de un solo componente de aproximadamente de entre 2,7 a 3 Kb, con tres ORF en sentido viral y cuatro ORF en la cadena complementaria (Figura 3) (20), (40).

Estos genes están distribuidos entre la cadena viral y la cadena complementaria: C1 (Rep) que codifica la proteína que interviene en la replicación viral, que interactúa con la ADN polimerasa de la planta, el gen C2 (Trap) encargado de la transactivación de V1 y V2, el gen C3 (Ren) incrementa la eficiencia de la multiplicación viral, y el gen C4 que aún se desconoce su función. Estos genes están parcialmente solapados en el ADNc, mientras que en la cadena viral se encuentran: V1 (Cp) que codifica la cápside proteica del virus, V2 (Nsp) encargado del movimiento del virus hacia afuera del núcleo y V3 (MP) responsable del movimiento del virus de célula a célula (24).



**Figura 3: Genoma monopartito del género *Curtovirus***  
Fuente: Cuong Viet Ha 2007

Su principal vector es el insecto *Circulifer tenellus* (HEMÍPTERA: CICADELIDAE), conocido también como: saltahojas, loritos verdes o chicharritas. A pesar de la amplia cantidad de hospedantes vegetales del género *Curtovirus*, su capacidad de propagación no es tan alta como la ocasionada por la mosca blanca en begomovirus (3), (20).

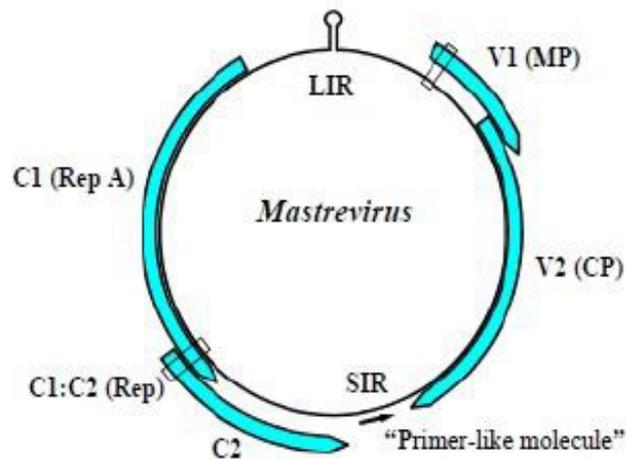
De este género hasta el 2009 se han descrito siete especies y tres especies tentativas (9).

**Género *Mastrevirus*:**

“Mastrevirus” se origina a partir del nombre *Maize streak virus* (virus del estriado del maíz) (3), (26), (41).

Este género se caracteriza por afectar principalmente plantas monocotiledóneas (gramíneas), presentan síntomas como estriado clorótico en las hojas y amarillamiento (26). Sus genes se encuentran arreglados en un genoma monopartito de aproximadamente 2.8kb y presenta dos genes en el sentido complementario, el gen C1 (Rep A) y C2 (Rep) ligado a la proteína de la replicación: y dos en el sentido viral, V1 (Mp) encargado de la proteína de movimiento y el V2 (Cp) que codifica para la cápside viral y cada par se encuentra solapado (Figura 4) (24), (26).

Este género además de presentar una región intergénica (denominada en este caso región intergénica mayor-LIR) común con los demás geminivirus, presenta una región intergénica menor (SIR) que corresponde el punto de origen para la replicación de la cadena viral y cadena complementaria respectivamente (20), (24).



**Figura 4: Genoma monopartito del género *Mastrevirus***  
Fuente: Cuong Viet Ha 2007

Hasta la actualidad se han descrito un total de 32 especies siendo 14 totalmente confirmadas y 18 especies tentativas (9). El insecto vector, al igual que en los curtovirus, son los saltahojas (*Nesocluta tenellus*) (HEMÍPTERA: CICADELIDAE) (20), (24), (26).

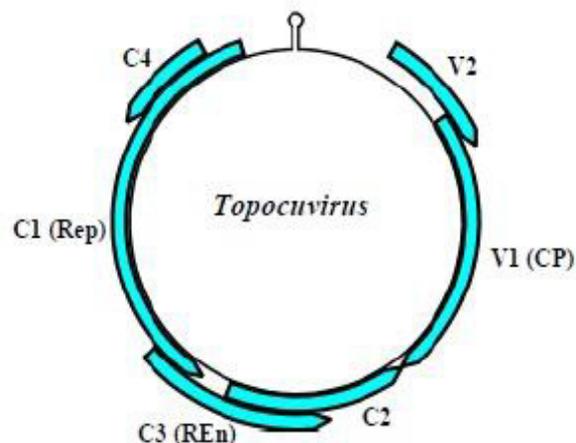
#### **Género *Topocuvirus*:**

El nombre de este género se deriva de la única especie identificada hasta el momento dentro del mismo: *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV).

Este género afecta solo a las plantas dicotiledóneas. Presenta un genoma monopartita con seis genes codificados, dos en sentido viral y cuatro en el sentido complementario presentando una longitud de

2,8kb (Figura 5) (42). Los genes que presentan son: C1 (Rep) que codifica la proteína de la replicación, el gen C2 (Trap) que controla la transactivación de los genes V1 y V2, el gen C3 (Ren) que incrementa la eficiencia de la multiplicación viral, y el gen C4, (se desconoce su función), estos genes están parcialmente solapados en la cadena complementaria; mientras que el gen V1 (Cp) que codifica la cápside proteica del virus y V2 (Nsp) encargado del movimiento hacia afuera del núcleo, están ubicados en la cadena viral (20), (24).

El insecto vector responsable de la dispersión de este género viral son los membrácidos de la especie *Micrutalis malleifera* (26).



**Figura 5: Genoma monopartito del género *Topocuvirus***  
Fuente: Cuong Viet Ha 2007

### 1.3 Tomate

El tomate es una hortaliza perteneciente a la familia de las solanáceas y del género *Solanum* (26), (43), es originario de la región andina de

Perú, Ecuador, Bolivia y el norte de Chile donde su crecimiento es silvestre (44). Aún se desconoce de manera precisa el sitio de origen, pero se cree que México fue el lugar de domesticación y la región andina del Perú donde posiblemente surgieron las diferentes variedades, puesto que hoy en día se encuentra una enorme variedad de parientes silvestres y cultivos del tomate en esta región y también a sus alrededores (44), (45).

### **1.3.1 Importancia económica**

El tomate, luego de la papa es la segunda hortaliza más importante a nivel mundial tanto para consumo interno como para exportación, alcanzando en el año 2004, los 100 millones de toneladas de producción, repartidas en 3.7 millones de hectáreas en 114 países (46).

En Ecuador el cultivo de tomate es de gran importancia, desde el punto de vista social como económico, ya que a más de ser un producto de alta demanda local, es el soporte económico para varios pequeños agricultores que dependen de esta actividad en las zonas costeras (43).

Para el año 2009, el rendimiento estimado en Ecuador fue de 20.600 Kg/Ha aproximadamente, mientras que en países como Colombia y Perú se encuentran alrededor de 29.911 y 37.223 Kg/Ha

respectivamente (11), estas cifras dan constancia del bajo rendimiento que existe a nivel nacional, probablemente a factores como: falta de tecnología, mal manejo del cultivo y enfermedades de diferente origen: fungoso, bacteriano y viral (47).

Se conoce que entre los principales problemas que afectan a las plantaciones de esta especie se encuentran los insectos plaga y enfermedades de tipo viral, en especial el complejo Mosca blanca-begomovirus, que pueden provocar una gran variedad de síntomas desde mosaicos leves y retraso en el crecimiento de las plantas, hasta rizados de las hojas y disminución del 80% del rendimiento de la producción (2) (47).

Este complejo ha sido catalogado como emergente y re-emergente (48). Otra de las enfermedades virales que han causado serios problemas, es el bronceado del tomate (TSWV), perteneciente al género *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*) y cuyos síntomas principales son manchas necróticas en las hojas, disminución del tamaño de la planta, manchas y deformación del fruto (49).

En Ecuador los cultivos de: melón, sandía, pepino, zapallo, tomate, pimiento, soya, haba, tabaco, algodón y maní ubicados en las provincias de: Manabí, el Guayas, Santa Elena y Los Ríos han sido los más afectados con una disminución entre el 25 y 50% en su producción a causa de la presencia de la mosca blanca

pertenecientes a las especies *Bemisia argentifolii* y *B. tabaci* (12), (13), sin embargo hasta el 2008 se descarta la existencia de geminivirus en el Ecuador sin ninguna comprobación (13) .

### **1.3.2 Principales geminivirus que afectan los cultivos de tomate.**

En las regiones tropicales y subtropicales de América se encuentran distribuidos principalmente los begomovirus (6).

Solo en América Latina se ha diagnosticado la presencia de más de 30 especies de geminivirus, en su mayoría perteneciente al género *Begomovirus*, afectando una variedad de cultivos (3), (24).

En la región de América del Norte los begomovirus que afectan los cultivos de tomate son: el virus moteado del tomate (ToMoV), virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYCV), el virus del chino del tomate (CdTV), el virus del encrespamiento de la hoja del tomate (TLCV) y virus del encrespamiento de la hoja del tomate de Sinaloa (STLCV); en América Central: el virus del chino del tomate (CdTV), el virus de la hoja rizada del tomate de Sinaloa (STLCV), virus del moteado del tomate taino (TTMoV), el virus de la hoja rizada amarilla del tomate (TYLCV), virus moteado del tomate(ToMoV); y finalmente en América del Sur los virus de mayor incidencia son: mosaico amarillo del tomate (TYMV), el virus del mosaico dorado del tomate (ToGMV), virus del moteado clorótico del tomate, (ToCMV),

virus del mosaico rugoso del tomate (ToRMV) , virus de la rugosis severa del tomate (ToSRV) (6), (26), (50), (51).

### 1.3.3 Medidas de control

La implementación de medidas de control es de vital importancia económica para los cultivos, aunque las estrategias convencionales que son principalmente para evitar el establecimiento y la propagación de enfermedades fungosas o bacterianas, no son siempre aplicables para el caso de los virus, en especial de los geminivirus, (19), (45).

El género *Begomovirus*, por su alta tasa de recombinación y gracias a las habilidades de adaptación de su vector (52), necesita un manejo integrado que incluye la obtención y utilización de variedades genéticamente mejoradas (19), y el manejo efectivo de las poblaciones de vectores, ya sea con aplicaciones de insecticidas (azadiractin, abamectina) y/o su control biológico con especies como: *Chispoeria sp.* *Coleornegilia maculata*, *Cycloneda sanguínea*, *Scymnus sp.* *Orius sp*, *Geocoris sp* *Encarsia formosa* o *Eretmocerus californicus* (45).

Otra estrategia, que permite controlar la presencia viral es la eliminación de malezas, que pueden servir de fuente de infección (19). Sin embargo en la actualidad la ingeniería genética está permitiendo obtener material vegetal capaz de mantener los rendimientos y

silenciar el ataque de varias especies de geminivirus mediante: 1) la sobreexpresión de genes virales, en particular del que codifica para la proteína de la cápside (Cp), que genera un mecanismo de competencia por la maquinaria celular, teniendo como resultado una mayor resistencia de la planta al virus en cuestión; 2) el uso de ácidos nucleicos interferentes (ARNi), capaces de disminuir los síntomas e interferir la replicación viral 3) la expresión de los ARNm de genes de interés involucrados directamente en la replicación viral, sea mediante el uso de construcciones antisentido de fragmentos específicos o de estrategias de silenciamiento génico post-transcripcional (19).

#### **1.4 Métodos de Diagnóstico e identificación**

Es indispensable establecer métodos de diagnóstico idóneos que nos permitan identificar de manera rápida, precisa y fiable la presencia de diferentes agentes infecciosos en las plantas (3), (53). Es necesario que el diagnóstico de geminivirus sea un proceso permanente, debido a que estos patógenos poseen facilidad de recombinación dando lugar a nuevos *Begomovirus*; por ello, nuevas estrategias de control son siempre requeridas (19).

Los sistemas tradicionales de diagnóstico como: la observación de síntomas y la microscopía, con el paso de los años han quedado rezagados para ser remplazados por técnicas inmunoquímicas como

el ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (14) y técnicas moleculares como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), ACR (Amplificación por círculo rodante), HAN (Hibridación de ácidos nucleicos) (24), (26).

La técnica ELISA es muy usada para el diagnóstico de diferentes patógenos. Sin embargo, en la identificación de geminivirus, ha presentado muchas limitaciones por la dificultad de obtener los antisueros y la inespecificidad ligada a los sitios de reconocimiento (54). Por otro lado, las técnicas moleculares permiten tener resultados cualitativos y cuantitativos de la presencia de geminivirus, incluso en etapas tempranas de infección permitiendo realizar caracterizaciones parciales (15), (16), (17), (24), (54).

#### **1.4.1 Diagnóstico Molecular**

Estas técnicas se fundamentan en la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos y la capacidad de síntesis del ADN por parte de las polimerasas.

La PCR fue una de las primeras técnicas moleculares empleada para el diagnóstico de geminivirus, por ser extremadamente sensible y específica para determinar la presencia de patógenos en plantas (3), (53). Sin embargo uno de los problemas con este tipo de virus es su gran variabilidad genética, lo que dificulta la identificación de regiones

conservadas que sirven para el diseño de iniciadores o cebadores, por lo que inicialmente se diseñaron como degenerados (53).

Otra técnica que ha cobrado importancia es el ACR. Esta, ha mostrado ser mucho más eficiente que la PCR debido a que partiendo de bajas concentraciones (0,01ng) permite obtener un sinnúmero de copias ( $1 \times 10^7$  1-3 $\mu$ g) de ADN de simple cadena completo, sin tener que considerar las variaciones genéticas en las secuencias al momento de la amplificación (51), (55), (56). El producto de ambas técnicas ha sido empleado para realizar hibridaciones con sondas específicas para determinar presencia de infecciones múltiples comunes en los geminivirus (3).

#### **1.4.2 Clonación**

La clonación de los geminivirus se puede iniciar a partir de los productos de PCR, -cuando se desea identificar genes específicos-, y de ACR, cuando el propósito es la caracterización del genoma viral completo (51).

#### **1.4.3 Secuenciación**

Esta tecnología, establecida alrededor de los años 80, se ha convertido en una técnica básica para la identificación y caracterización de nuevas especies y genes, pues provee un claro

detalle de los ácidos nucleicos y su organización. Por otro lado, existen programas que analizan y almacenan estas secuencias en bases de datos, que se encuentran a disposición de la comunidad científica; estos programas permiten comparar y estudiar los niveles de homología entre secuencias (51), (57), (58), (59).

En el caso de los geminivirus, para el estudio filogenético es indispensable realizar los alineamientos con el genoma completo en el caso de los monopartitos, y del componente ADN-A en los bipartitos, considerando que si la homología entre la nueva especie secuenciada y la especie de geminivirus más cercana genéticamente es menor a 88%, es otra especie, si va de 88% a 89% es una especie tentativa, si es mayor a 89% pertenece a la misma especie (58).

Dentro de las mismas especies se pueden encontrar cepas y variantes, si la homología es menor a 93% es una nueva cepa, y si es mayor a 94% entonces es una variante (58).

# CAPÍTULO 2

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

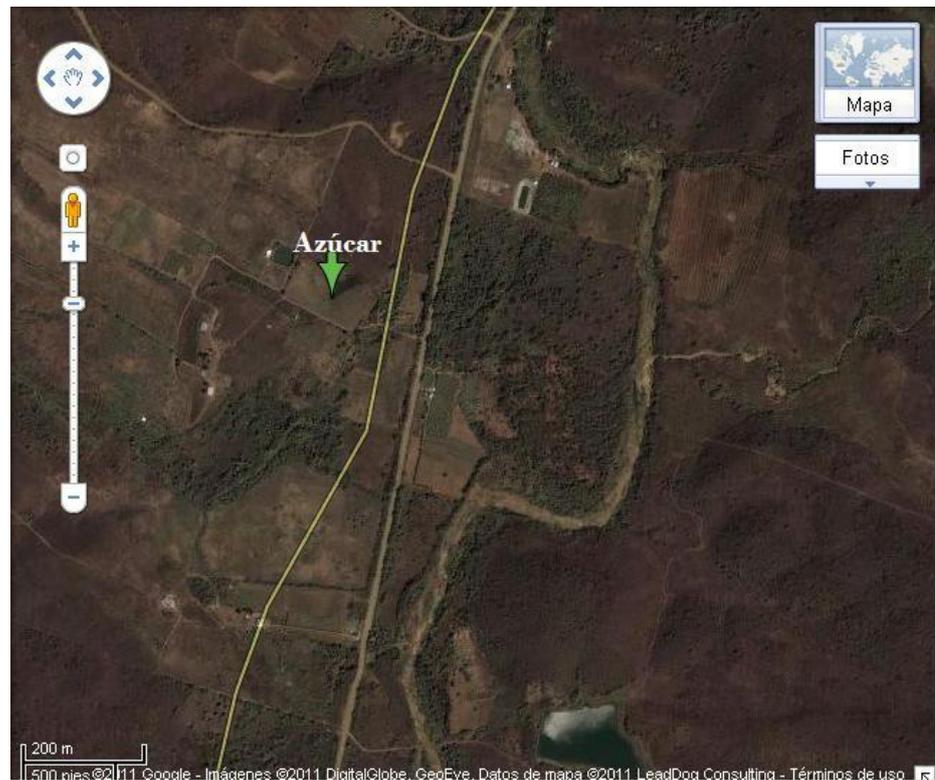
### 2.1. Recolección de muestras de campo

La presente investigación fue realizada en tres haciendas hortícolas del cantón Santa Elena, en época seca. El historial agrícola de la península de Santa Elena ha estado marcado por la producción de cultivos de ciclo corto, entre los que destacan pimiento, tomate y cucurbitáceas, por lo que se consideró el área para el presente estudio (60).

La zona donde se realizó la investigación, corresponde a una región desértica tropical con temperaturas mínimas y máximas de 23 y 26°C y 200mm de precipitación anual (61).

La haciendas muestreadas están ubicadas en dos localidades del cantón Santa Elena: Azúcar, y San Rafael; en la primera se evaluó la hacienda "Azúcar" (2°16'7.77"S; 80°35'11.93"O) (Figura 6), y en la

segunda localidad las haciendas: Luz Victoria ( $2^{\circ}19'55.23''S$ ;  $80^{\circ}39'8.14''O$ ) (Figura 7) y Chanduy ( $2^{\circ}18'59.11''S$ ;  $80^{\circ}38'15.74''O$ ).



**Figura 6: Ubicación de la Hacienda Azúcar**

Para este estudio se realizaron muestreos dirigidos con el objetivo de recolectar material vegetal de hojas jóvenes de cultivos de tomate y maleza acompañante que presentaran síntomas relacionados con geminivirus, los cuales se describen en el acápite 2.2. En estos sitios de evaluación además se observó la presencia de mosca blanca (*B. tabaci*)



**Figura 7: Localidad San Rafael, Hacienda Luz Victoria**

Las muestras de hojas se depositaron en fundas de polietileno bajo refrigeración (4°C) para su posterior procesamiento en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

En el laboratorio, se dejó constancia fotográfica de las muestras colectadas en campo, se codificó (Apéndice A) y se guardó en dos grupos las muestras: 300mg de cada muestra fue colocado en tubos en -80 (Detallado en el acápite 2.3), y el resto del tejido vegetal se preservó en -20.

Como controles negativos para el diagnóstico molecular, se emplearon muestras de tomate sanas, obtenidas de los invernaderos de la Sociedad Ecuatoriana de Biotecnología (SEBIOCA).

## 2.2. Descripción de síntomas

De acuerdo a lo indicado por Faría y Cervantes (14), (18), los síntomas de campo más comunes relacionados con geminivirus y los cuales se consideraron en el muestreo de campo fueron: mosaico dorado, mosaico amarillo brillante, enrollamiento total de la hoja, encrespamiento de los folíolos, entrenudos cortos, moteado clorótico, clorosis foliar marginal, enrollamiento de la hoja (Forma de cuchara), deformaciones foliares como abultamientos, ampollas, reducción del área foliar, enanismo, abscisión floral, reducción del tamaño de los frutos, entre otros. Además como un agente indicador extra, solo se tomó muestras de las localidades que presentaban poblaciones de mosca blanca (*B. tabaci*) ya que es el vector principal de propagación del género *Begomovirus*.

## 2.3. Extracción de ADN y Electroforesis

Para la obtención de ADN total se aplicó el protocolo interno del CIBE de "Aislamiento de ADN basado en el protocolo de Dellaporta y Aljanabi (62), (63).

Los tejidos vegetales fueron tratados con todas las medidas de seguridad adecuadas para evitar contaminación entre las muestras de cada hacienda y los controles.

Previamente a la extracción del material genómico, las muestras fueron cortadas en trozos pequeños (300 mg de material vegetal fresco) y colocados en tubos de 2ml a  $-80^{\circ}$  C entre 24 y 48 horas, pasado el periodo de congelación; las muestras fueron pulverizadas utilizando el triturador Retsch, MM400 ® y se colocó 1 ml de la solución tamponada de extracción (Tabla I) por muestra:

**Tabla I: Reactivos que conforman la solución tamponada de extracción**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
Tris	100mM
EDTA	50mM
Cl Na	500mM
Beta-Mercaptoetanol	10mM (7ul cada uno)
PVP(polivinil pirrolidona)	2% (10.000pm)

Luego de invertir varias veces la muestra, se adicionaron 80  $\mu$ l de SDS al 20% y se homogenizaron las muestras por 5 seg en un vortex; luego se incubaron a  $55^{\circ}$ C durante 10 min.

Finalizado el periodo de incubación, se adicionaron 330  $\mu$ l de acetato de potasio (K-Ac 5M) se homogenizó por 2 seg. en vortex e inmediatamente se procedió a su centrifugación a  $4^{\circ}$ C durante 10 min a 12000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R).

Se eliminó el sobrenadante evitando que se mezcle con la fase acuosa inferior; se colocaron 750  $\mu$ l de cloruro de sodio (NaCl, 6M) y se

colocaron las muestras en el vortex durante 30 seg; se adicionaron 10  $\mu$ l de RNasa al sobrenadante y se incubó a 37 °C por 15 min.

Para ayudar a precipitar las macromoléculas se adicionó un volumen de cloroformo isoamilalcohol igual al de la muestra y se invirtió varias veces; posteriormente se centrifugó la muestra a 12000 rpm por 5 min a 4 °C y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Se agregó a la muestra un volumen (1:1) de isopropanol, se homogenizó y se dejó reposar por 24 h a -20 °C.

Pasado ese tiempo, se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 20 min; se lavó el precipitado con etanol al 70% y se volvió a centrifugar por 5 min a 4 °C a la misma velocidad. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar. El precipitado obtenido fue resuspendido en 200  $\mu$ l de agua y se conservó en refrigeración a -20 °C.

Para determinar la presencia de los ADN extraídos, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en solución TAE 1X (Tris, Ácido Acético y EDTA). Para realizar la lectura de las bandas, se empleó un transiluminador (Bio-Rad, Gel Doc<sup>TM</sup> XR). Además se evaluó la calidad y concentración de ADN vegetal mediante espectrofotometría, usando el Nanodrop (Thermo, Scientific NanoDrop 2000).

## 2.4. Reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis

Se realizó la detección de la presencia de geminivirus mediante la reacción en cadena de la polimerasa, usando los iniciadores degenerados universales: AVcore y ACcore (Tabla II) que amplifican aproximadamente 600 nucleótidos de la región interna central del gen que codifica para la cápside proteica de los geminivirus; los ciclos para la amplificación fueron los diseñados y establecidos por Brown (48). (Tabla III).

Se trabajó con un volumen final por reacción de 10 µl, compuesto por: 1x de la solución de PCR sin MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de dNTPs, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1unidad de Taq polimerasa (Invitrogen), 0.02 µM de cada primer (AVcore y ACcore), 100 ng de ADN total. Se completó el volumen deseado con agua estéril. El ciclaje de las muestras se realizó en el termociclador Eppendorf (Eppendorf, Mastercycler Gradient).

**Tabla II: Iniciadores universales para geminivirus**

<b>Primers</b>	<b>Secuencias de reconocimiento</b>
<b>AVcore:</b>	5' GCCHATRTAYAGRAAGCCMAGRAT 3'
<b>ACcore:</b>	5' GGRTTDGARGCATGHGTACANGCC 3'

Nucleótidos degenerados: R = A/G; Y = C/T; M = A/C; K = G/T; W = A/T; S = C/G;  
B = C/G/T; D = A/G/T; H = A/C/T; V = A/C/G; N = A/C/G/T

Se emplearon controles positivos, negativos y blancos de PCR, para garantizar la fiabilidad de los resultados. Los controles positivos (ADN

de plantas de tomate infectados con TYLCV), fueron donados por el laboratorio de virología de la “Universidad de Arizona” de Tucson-Arizona, mientras que los controles negativos, fue el ADN extraído de plantas sanas.

Los productos de PCR fueron separados y observados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% disuelto en solución TAE 1X teñido con SYBR Safe, a 100 voltios por 30 minutos.

**Tabla III: Programa de amplificación para los iniciadores AVcore y ACcore**

		<b>Tapa</b>	<b>105°C</b>
<b>30 CICLOS</b>	Inicio	95°C	2 min
	Desnaturalización	95°C	1 min
	Hibridación	58°C	1 min
	Enlongación	72°C	1 min
	Extención	72°C	20 min
Conservar		4°C	

Se utilizó un marcador de ADN (100 pb Ladder Invitrogen) para determinar el tamaño de los amplicones; las bandas fueron observadas en un transiluminador (Bio-Rad, Gel Doc<sup>TM</sup> XR).

### **Análisis de la presencia de geminivirus y síntomas asociados**

Para el análisis de la relación de dependencia o independencia entre la presencia de los síntomas encontrados en campo y la presencia del virus en los tejidos vegetales, se empleó técnicas estadísticas

inferenciales como: tablas de contingencias (Ji-cuadrado, X<sup>2</sup>) y análisis de correspondencia para los cuales se usó el software estadístico InfoStat (64).

## 2.5. Clonación y secuenciación

### Clonación

Para la clonación de la región central del gen que conforma la cápside proteica de los geminivirus, se utilizaron los productos de PCR positivos; se empleó el kit pGEM®-T y pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison WI, USA), siguiendo la metodología de ligación y transformación recomendada por el fabricante:

- **Ligación**

Se realizó la ligación de los productos de PCR positivos usando los volúmenes de reactivos detallados en la tabla IV los mismos que se incubaron por 18 horas a 4°C.

**Tabla IV: Reacción de ligación**

<b>Volumen</b>	<b>Reactivos</b>
<b>1ul</b>	H2O (Libre de nucleasas)
<b>2.5ul</b>	2X Buffer de ligación
<b>0.5ul</b>	Vector (pGEM-T easy)
<b>0.5ul</b>	Producto de PCR
<b>0.5ul</b>	T4 ADN Ligasa

Para lograr una buena interacción entre inserto y vector se estableció previamente la concentración del producto de PCR en un espectrofotómetro de marca “Bio-Rad, Molecular Imager Gel Doc<sup>tm</sup> XR”.

- **Transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes**

En una cámara de flujo laminar se descongelaron las células *E. coli* de las cepas DH5 $\alpha$  competentes por 5 min. Sin retirar las células del hielo, se colocó 5 $\mu$ l de reacción de ligación a cada tubo que contenía 100  $\mu$ l de bacterias *E. coli*, finalmente se homogenizó la mezcla.

Para lograr el ingreso de los plásmidos con los amplicones ligados a las células, las muestras se sometieron a un choque térmico que inició a 42°C en un baño de María por 45 seg y finalizó en hielo por 2 min; luego se añadieron 300  $\mu$ l del medio SOC (Apéndice B) en cada tubo y se colocaron en una incubadora con agitación por 1,5 h a 37°C y a 250 rpm.

Se preparó medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) (Apéndice B), luego de dispensado y solidificado, se colocaron 40  $\mu$ l de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) por placa petri. Las cajas con el medio se dejaron secar por 30 min dentro del flujo laminar en ausencia de luz.

Después de la hora de incubación de las bacterias, se tomaron 50  $\mu$ l de cada una de estas muestras, y se dispersaron suavemente en una placa con LB sólido con Ampicilina (Apéndice B); el restante (350  $\mu$ l) fue dispensado en otras placas en similares condiciones. Las placas sembradas se dejaron durante 30 min a temperatura ambiente para que la solución fuera absorbida por el medio; posteriormente, se dejaron las cajas incubando toda la noche a 37°C.

Luego del período de incubación, todas las colonias que se tornaron azules fueron descartadas, mientras que a las blancas que crecieron bien y se encontraban dispersas se les realizó un estriado. Se dejó incubar durante otra noche.

Estas colonias estriadas fueron posteriormente colocadas en 5ml de medio LB líquido + Antibiótico (100 $\mu$ g/ml) y se las dejó incubando en un plato agitador a 250rpm a 37°C por 12h.

- **Recuperación del plásmido y verificación de la presencia del inserto de interés:**

Para la recuperación del plásmido se empleó el kit GeneJET™ Plasmid Minipreps (Cat # K0503, Fermentas) siguiendo el protocolo detallado por el fabricante.

Para confirmar la presencia de los insertos en el pGEM-T, se realizó una digestión combinando: 3  $\mu$ l de muestra, 0.1  $\mu$ l de seroalbúmina bovina (BSA) 1  $\mu$ l de solución tampón (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 a 25°C), 0.5  $\mu$ l de enzima *Not I* y 5.4  $\mu$ l de agua; la combinación se incubó a 30°C por dos horas. Se observó la digestión en un gel de agarosa al 1%.

- **Secuenciación del fragmento clonado**

Las muestras que presentaron el inserto de interés fueron enviadas al Instituto de Genómica de Arizona (AGI) de la “Universidad de Arizona”, para su secuenciación mediante el Applied Biosystem 3730XL DNA Analyzer.

## **2.6. Análisis y comparación de datos obtenidos**

Las secuencias obtenidas fueron alineadas individualmente en Basic Blast-NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y posteriormente fueron alineadas con 19 secuencias de diferentes begomovirus que han sido reportadas en América y cuyo principal hospedero es *S. lycopersicum* (Tabla V), se empleó el programa informático Bioedit (65) usando “Clustal W Multiple alignment” y transformando los ácidos nucleicos a aminoácidos. Las distancias genéticas fueron

determinadas a partir de la secuencia de aminoácidos con el software Mega 5.05, en Construct/test-Neighbor Joining tree (Método del vecino más próximo) (66).

**Tabla V: Geminivirus empleados para los alineados en Bioedit**

	<b>Accesiones</b>	<b>Virus</b>	<b>Acrónimo</b>	<b>País</b>
<b>1</b>	FJ538207	Tomato yellow spot virus	ToYSV	Argentina
<b>2</b>	GQ387369	Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV	Argentina
<b>3</b>	AY090557	Tomato chlorotic mottle virus	ToCMoV	Brasil
<b>4</b>	AF132852	Tomato golden mottle virus	TGMoV	Brasil
<b>5</b>	HQ606467	Tomato severe rugose virus	ToRMV	Brasil
<b>6</b>	EU518935	Tomato yellow mosaic virus	TYMV	Colombia
<b>7</b>	NC_003867	Tomato mosaic Havana virus	ToMHV	Cuba
<b>8</b>	AF012300	Tomato mottle Taino virus	ToMoTV	Cuba
<b>9</b>	FJ174698	Tomato yellow distortion leaf virus	ToYLDV	Cuba
<b>10</b>	AJ223505	Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV	Cuba
<b>11</b>	L14460	Tomato mottle virus	ToMoV	Florida
<b>12</b>	HM459852	Tomato chino La Paz virus	ToChLPV	México
<b>13</b>	HM459851	Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV	México
<b>14</b>	EF501978	Tomato golden mottle virus	TGMoV	México
<b>15</b>	DQ347946	Tomato severe leaf curl virus	ToSLCV	México
<b>16</b>	AJ842171	Tomato severe leaf curl virus	ToSLCV	Nicaragua
<b>17</b>	AF110515	Sinaloa tomato leaf curl virus	STLCV	Panama
<b>18</b>	GQ334472	Tomato leaf deformation virus	ToLDeV	Perú
<b>19</b>	NC_015122	Tomato mottle leaf curl Zulia virus	ToMLCV	Venezuela

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Recolección de muestras en campo y síntomas

Muestreos:



Figura 8: Hacienda El Azúcar, cultivo de tomate (*S. lycopersicum* var. Dominic).

En la zona de “El Azúcar” se recolectaron 76 muestras de tomate (*S. lycopersicum* var. Dominic) y 13 de malezas que correspondieron a los géneros *Luffa* sp. e *Ipomoea* sp, de acuerdo a lo descrito en la guía de campo para la identificación de malezas (67). Ochenta y nueve de las muestras (Apéndice A) presentaron síntomas relacionados con la presencia de geminivirus (Tabla VI).

**Tabla VI: Muestras recolectadas en la provincia de Santa Elena.**

Localidad	Hacienda	Muestras de Maleza	Muestras de Tomate	Total de Muestras
Azúcar	Azúcar	8	48	56
San Rafael	Luz Victoria	3	16	19
San Rafael	Chanduy	2	12	14
<b>Total</b>		13	76	89



**Figura 9:** Presencia del complejo de moscas blancas *B. tabaci* y *B. argentifolii* en los cultivos de tomate (*S. lycopersicum*), malezas y cultivos aledaños.

Adicionalmente, se observaron infestaciones altas (> 80%) de mosca blanca (*B. tabaci* & *B. argentifolii*) en las unidades de muestreo y en las plantaciones comerciales aledañas, Estos resultados coinciden con lo reportado por Valarezo (Figura 9) (68).

## Síntomas

Los síntomas encontrados en tomate en las diferentes zonas de evaluación (Tabla VII ) correspondieron a: clorosis en los márgenes de las hojas o moteado, presencia de amarillamiento en todo el haz de la hoja o mosaico o moteado (Figura 10a y 10b), enrollamiento de la hoja - en forma de cuchara- (Figura 10b); y en un caso en particular - en una planta de tomate de la hacienda Azúcar- se encontró arrosamiento total, descripción que fue agrupada en la categoría de “deformación” para el posterior análisis (Figura 11a).

**Tabla VII: Descripción de síntomas en Tomate**

Síntomas Múltiples	Localidad			Total
	Azúcar	Luz Victoria	Chanduy	
<b>S2+S3</b>	0	0	2	2
<b>S2+S5</b>	0	16	0	16
<b>S3+S4</b>	0	0	2	2
<b>S1</b>	26	0	1	27
<b>S2</b>	22	0	0	22
<b>S3</b>	0	0	7	7
<b>Total de Tomates evaluados</b>				<b>76</b>

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara y S6= Ampollas en el haz de la hoja.

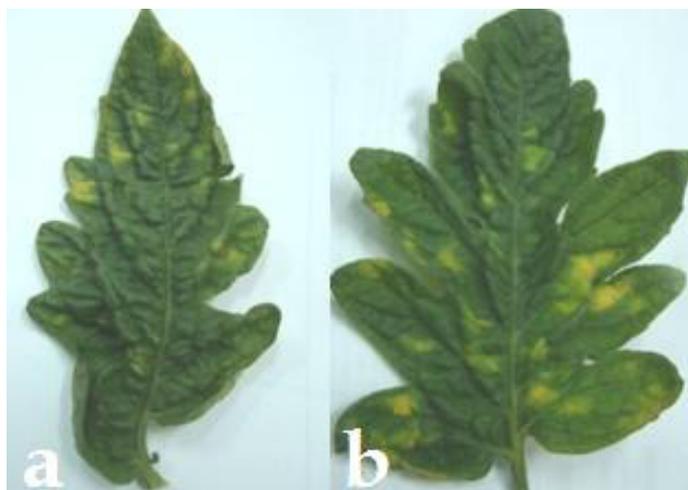
Todos estos síntomas se asemejan a los reportados en otros países, donde las infecciones por diferentes especies de geminivirus han sido comprobadas con técnicas moleculares (6), (51).

Las muestras de malezas recolectadas (Tabla VIII) presentaron únicamente variación en la forma original de las hojas, con arrugamiento y clorosis, mostrándose en conjunto y en un patrón intenso tal como se observa en las Figuras 11e, 11f, 11g y 11h.

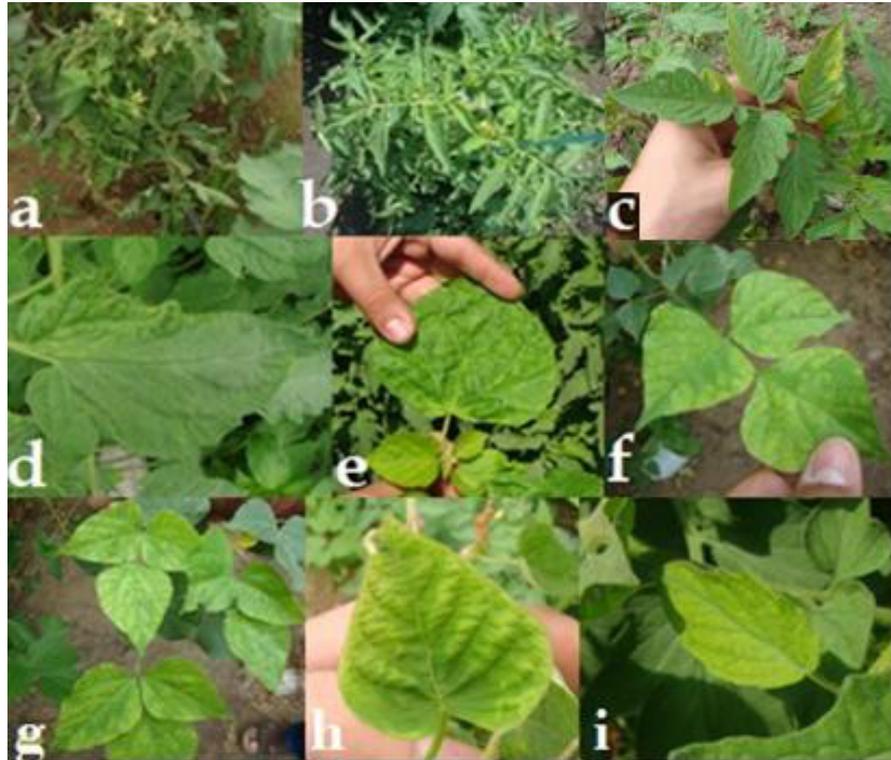
**Tabla VIII: Descripción de síntomas en Malezas**

Síntomas Múltiples	Localidad			Total
	Azúcar	Luz Victoria	Chanduy	
<b>S1+S4+S6</b>	3	0	0	3
<b>S1+S5</b>	0	3	0	3
<b>S3+S4</b>	0	0	2	2
<b>S2</b>	5	0	0	5
<b>Total de Malezas evaluadas</b>				<b>13</b>

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara y S6= Ampollas en el haz de la hoja



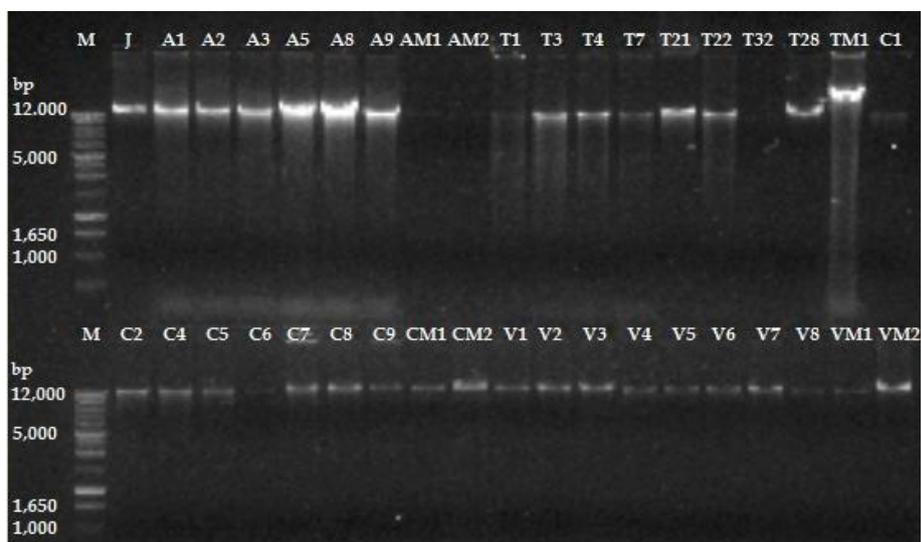
**Figura 10: Muestras de hojas de la hacienda Chanduy con presencia de síntomas de manchas amarillas en las hojas nuevas.**



**Figura 11: Síntomas relacionados con geminivirus en maleza y tomate. a) planta de tomate arrossetada, b) muestras de tomate con síntoma de enrollamiento en la hoja o “síntoma de la cuchara”, c) hojas de tomate con amarillamiento en el ápice. d) es ligero amarillamiento y clorosis en una parte de la lámina foliar. e) maleza con presencia de arrugamiento y ligera clorosis. f) maleza con presencia de un mosaico amarillo. g) y h) clorosis en maleza. i) clorosis en tomate.**

### **3.2. Extracción de ADN.**

Las concentraciones de ADN genómico variaron desde 18ng/μl hasta 1428ng/μl, en un volumen final de 200 μl. Sin embargo, en las muestras T32 y T13 de tomate de la hacienda Azúcar la concentración fue muy baja, que no pudo ser visible mediante electroforesis; y el material genómico de las muestras TM1 se observa degradado, tal como se aprecia en la Figura 12.



**Figura 12:** Análisis de electroforesis de la presencia de ADN total en las muestras recolectadas en la Hacienda Azúcar (A y T), Chanduy (C) y Luz Victoria (V). A, T, C, V corresponden a muestras de tomate, mientras que AM, TM, CM, y VM corresponden a malezas.

**Tabla IX: Muestras presentaron concentraciones óptimas para el diagnóstico de geminivirus**

Localidad	Hacienda	Maleza	Tomate	Total
Azúcar	Azúcar	5	44	49
San Rafael	Luz Victoria	3	14	17
San Rafael	Chanduy	2	11	13
<b>Total</b>		10	69	79

### 3.3. Reacción en cadena de la polimerasa

#### Resultados de la presencia de geminivirus

En las muestras evaluadas, tanto de malezas como de *S. lycopersicum* se obtuvieron amplicones de 600 nucleótidos aproximadamente (Figura 13), similar a lo descrito por Brown (48).

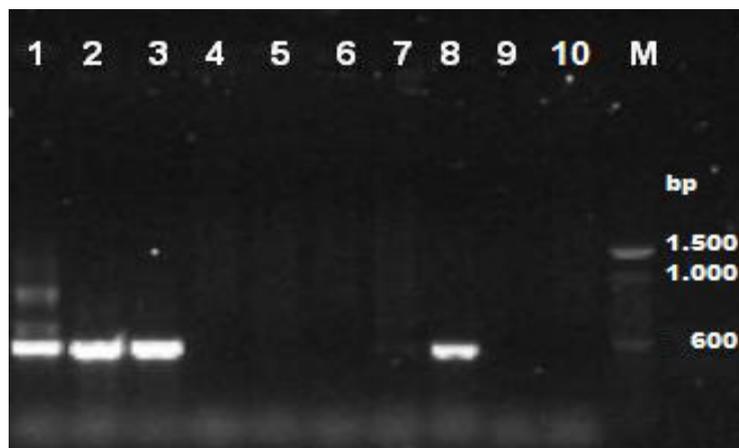


Figura 13: Resultados de la PCR con iniciadores degenerados para la región central de la cápside. Carriles 1 al 3 muestras de tomate infectadas por geminivirus con amplicones de 600nt, el carril 4 al 7 corresponde a muestras de tomate que no resultaron infectadas para geminivirus, el carril 8 corresponde al control positivo, 9 el blanco del PCR, el 10 control negativo (muestra de tomate sano) y en el carril 11(M) marcador 100bp.

De los 69 ADN evaluados en tomate 22 se logró la amplificación específica, mientras que en las 10 muestras de malezas, sólo se diagnosticó la presencia viral en cinco, lo que muestra que las plantas se encontraban infectadas por geminivirus. En la tabla X se detallan los porcentajes de infección.

Tabla X: Porcentaje de muestras infectadas con geminivirus

Localidad	Hacienda	Infectadas		
		Tomate	Maleza	Total
<b>Azúcar</b>	Azúcar	8.86%	2.53%	<b>11.39%</b>
<b>San Rafael</b>	Luz Victoria	13.92%	2,53%	<b>16.45%</b>
<b>San Rafael</b>	Chanduy	5.06%	1.27%	<b>6.33%</b>
<b>Total</b>		<b>27.84%</b>	<b>6.33%</b>	<b>34.17%</b>

El bajo porcentaje de plantas sintomáticas en las que se detectó la presencia de geminivirus podría deberse a diferentes factores. El primero que debe considerarse es la presencia de otro tipo de agente causal en las plantas recolectadas con síntomas similares a los ocasionados por geminivirus. Es conocido que tales síntomas no son completamente específicos, por lo que su valor diagnóstico es muy variable. Otros factores a tener en cuenta serían los inherentes a la sensibilidad de la técnica empleada y la concentración viral en las muestras. Aunque en la actualidad existen variantes como la ACR, capaces de detectar 0.1µg de ADN viral total, la PCR tradicional ha mostrado una elevada sensibilidad para el diagnóstico rutinario de geminivirus (55).

En vista que se realizó un muestreo dirigido a recolectar plantas de tomate y maleza con más de 10 síntomas relacionados con la presencia de diferentes geminivirus, no se puede comparar los porcentajes obtenidos, con la situación real de los cultivos del Ecuador, ya que no se ha evaluado la posible presencia de otros virus asociados al cultivo de tomate, más zonas de cultivos, el impacto del virus, la presencia del vector, ni los parámetros biológicos que puedan intervenir en su diseminación. Sería clave realizar estudios enfocados en estas áreas para de esta manera poder tener un panorama claro sobre los cultivos comerciales.

Estos resultados indican la necesidad de profundizar en el estudio, y realizar evaluaciones en invernadero para determinar inicialmente cuales son los síntomas mas comunes que esta familia viral causa en los cultivos de importancia comercial, para direccionar mejor los futuros muestreos.

### **Análisis de la presencia de geminivirus y síntomas asociados.**

Debido a la variedad de síntomas y al número de muestras infectadas con geminivirus que se encontraron en esta investigación, se resolvió hacer el análisis separando los tipos de muestras: Tomate y Maleza en el software estadístico InfoStat (64).

Es importante mencionar que para los siguientes análisis se descartó la muestra A20, principalmente por ser la única planta que presentó arrocetamiento total y sus resultados en PCR fueron negativos .

En el caso de las muestras de tomate, la tabla cruzada (Tabla XI) demuestra que existe dependencia entre las variables: síntomas descritos (S1= Moteado clorótico, S2= Clorosis foliar, S3= Mosaico amarillo, S4= Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara y S6= Ampollas en el haz de la hoja) y la infección por geminivirus, ( $\chi^2=23.86$ ,  $p<0.05$ ).

**Tabla XI: Tabla de contingencia entre síntomas e infección en tomate**

<b>Infectados</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S2-S3</b>	<b>S2-S5</b>	<b>S3</b>	<b>S3-S4</b>	<b>Total</b>
<b>No</b>	19	18	1	3	5	0	46
<b>Si</b>	4	3	0	11	2	2	22
<b>Total</b>	23	21	1	14	7	2	68
<b>Chi<sup>2</sup></b>	23.86						
<b>P</b>	0.0002						

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara y S6= Ampollas en el haz de la hoja

Según lo observado en la Tabla XI, la sintomatología que presentó mayor relación con los resultados obtenidos para el diagnóstico molecular fue principalmente el enrollamiento de la hoja con la presencia de clorosis en los bordes.

La tabla de contingencia realizada para las muestras de malezas (Tabla XII), indica que no existe relación de dependencia entre las dos variables sometidas al análisis ( $\chi^2=2.33$  ,  $p>0.05$ )

**Tabla XII: Tabla de contingencia entre síntomas e infección en malezas**

<b>Infectados</b>	<b>S1-S4</b>	<b>S1-S5</b>	<b>S2</b>	<b>S3-S4</b>	<b>Total</b>
<b>No</b>	0	1	3	1	5
<b>Si</b>	1	2	1	1	5
<b>Total</b>	1	3	4	2	10
<b>Chi<sup>2</sup> =</b>	2.33				
<b>P =</b>	0.51				

S1=Moteado clorótico, S2=Clorosis foliar, S3=Mosaico amarillo, S4=Deformación, S5= Enrollamiento de la hoja en forma de cuchara y S6= Ampollas en el haz de la hoja

En el caso de las malezas, aunque el 50% de los individuos recolectados mostraron ser positivos para geminivirus, sin embargo cabe recalcar que el número de tejidos vegetales recolectados, es muy bajo, y aunque la tabla de porcentaje de síntomas vs infección (Tabla XII) indica que la presencia de clorosis, deformación foliar y formación de ampollas en el haz es el más fuerte indicio sobre la presencia de éste virus, el valor de probabilidad ( $p > 0.05$ ) nos indica que la presencia de todos estos síntomas es independiente de la infección de esta familia viral.

#### **Análisis de correspondencia entre síntomas e infección viral**

El análisis de correspondencia (Figura 14) muestra la estrecha relación entre la disposición de los síntomas y la infección de geminivirus en un plano bidimensional. Tal como se explicó anteriormente, el síntoma que posiblemente se encuentra relacionado con la presencia de esta familia viral es el enrollamiento de la hoja (S5), se aprecian además dos tipos de asociaciones de síntomas relacionados a la infección: S2-S5 y S3-S4; la presencia del síntoma S1, S2, y S3 de forma individual indican que están asociados a la no presencia de la infección, al igual que la combinación S2- S3, lo que determina como un posible síntoma común de infección de geminivirus en los cultivos de la Península de Santa Elena el

enrollamiento de las hojas, el que puede estar acompañado por síntomas secundarios como deformación de la hoja o clorosis.

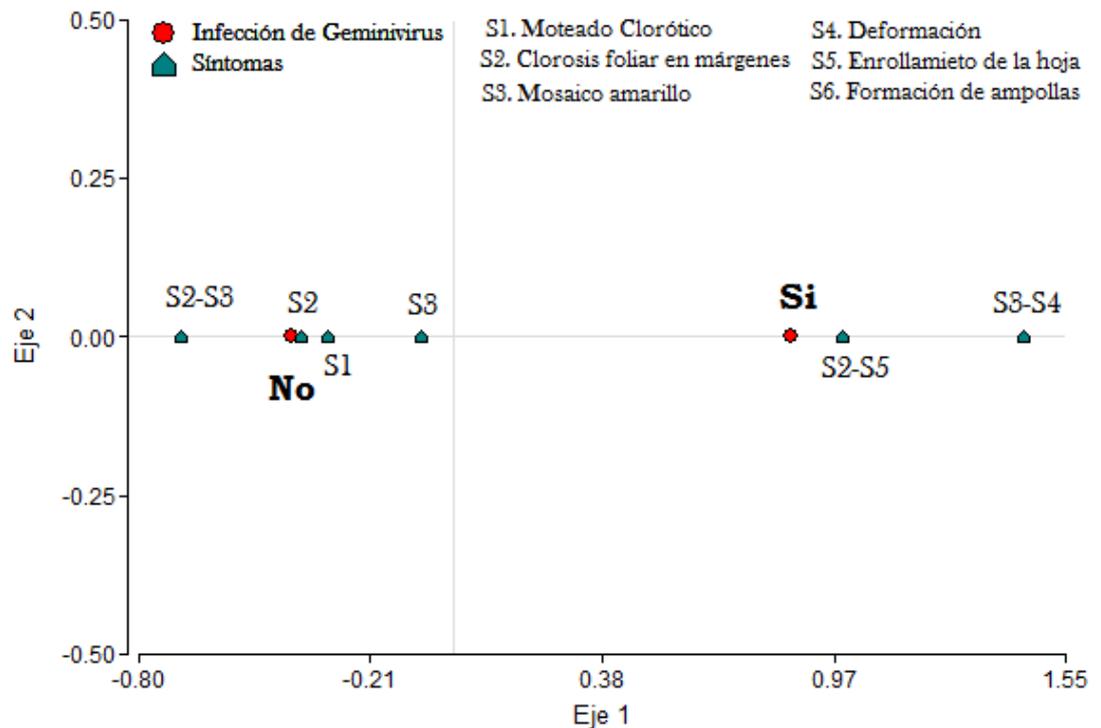
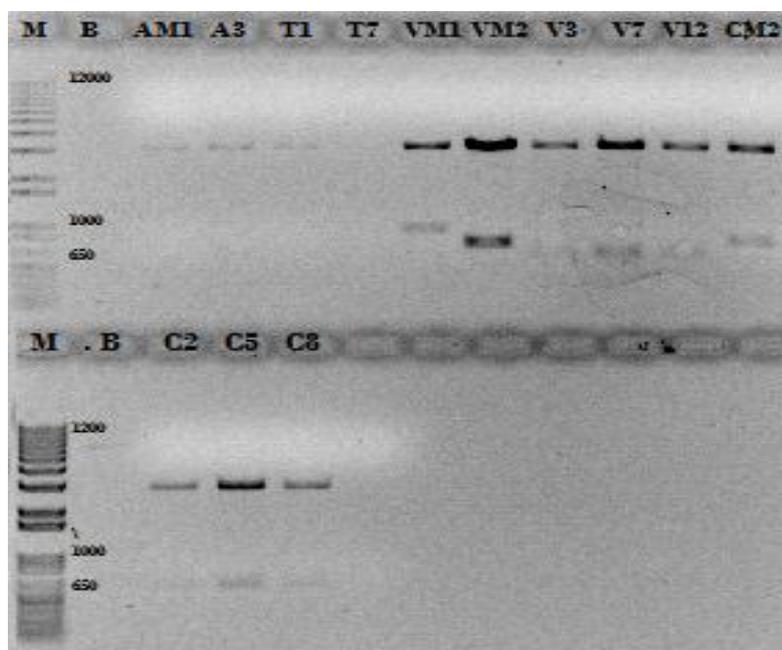


Figura 14: Análisis de correspondencia entre los síntomas y la infección por geminivirus para las muestras de tomate.

### 3.4. Obtención de Clones.

Mediante electroforesis se observó que los clones digeridos con la enzima *Not I* liberaron dos fragmentos de: 3kb que correspondería al pGEM®-T Vector (Plásmido) y 600bp de la región central de la CP de los geminivirus (Figura 15). Las muestras clonadas exitosamente que presentaron amplicones de 600 pb, correspondieron a: VM2, V3, V7, V12, CM2, C2, C5 y C8 (Apéndice A).



**Figura 15:** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se muestra la digestión de los productos clonados con la enzima *Not* I. Se empleó un marcador de 1kb (M), los códigos corresponden a: blancos=B, Hacienda Azúcar= A y T, Chanduy =C y Luz Victoria =V. A, T, C, V corresponden a muestras de tomate, mientras que AM, TM, CM, y VM corresponden a malezas.

Del total de muestras evaluadas, la muestra VM1 presentó un inserto que no corresponde al esperado, por lo que fue descartada; por otro lado las muestras AM, A3, T1 y T7 se observó tenuemente el tamaño del vector y no se apreció el inserto, por lo que también se descartaron para la secuenciación.

### 3.5. Secuencia del Genoma viral

Los resultados de la secuenciación arrojaron tres muestras con un 100% de especificidad en la lectura del electroferograma C2, C5 y C8, con un tamaño de 510 nt (Apéndice B).

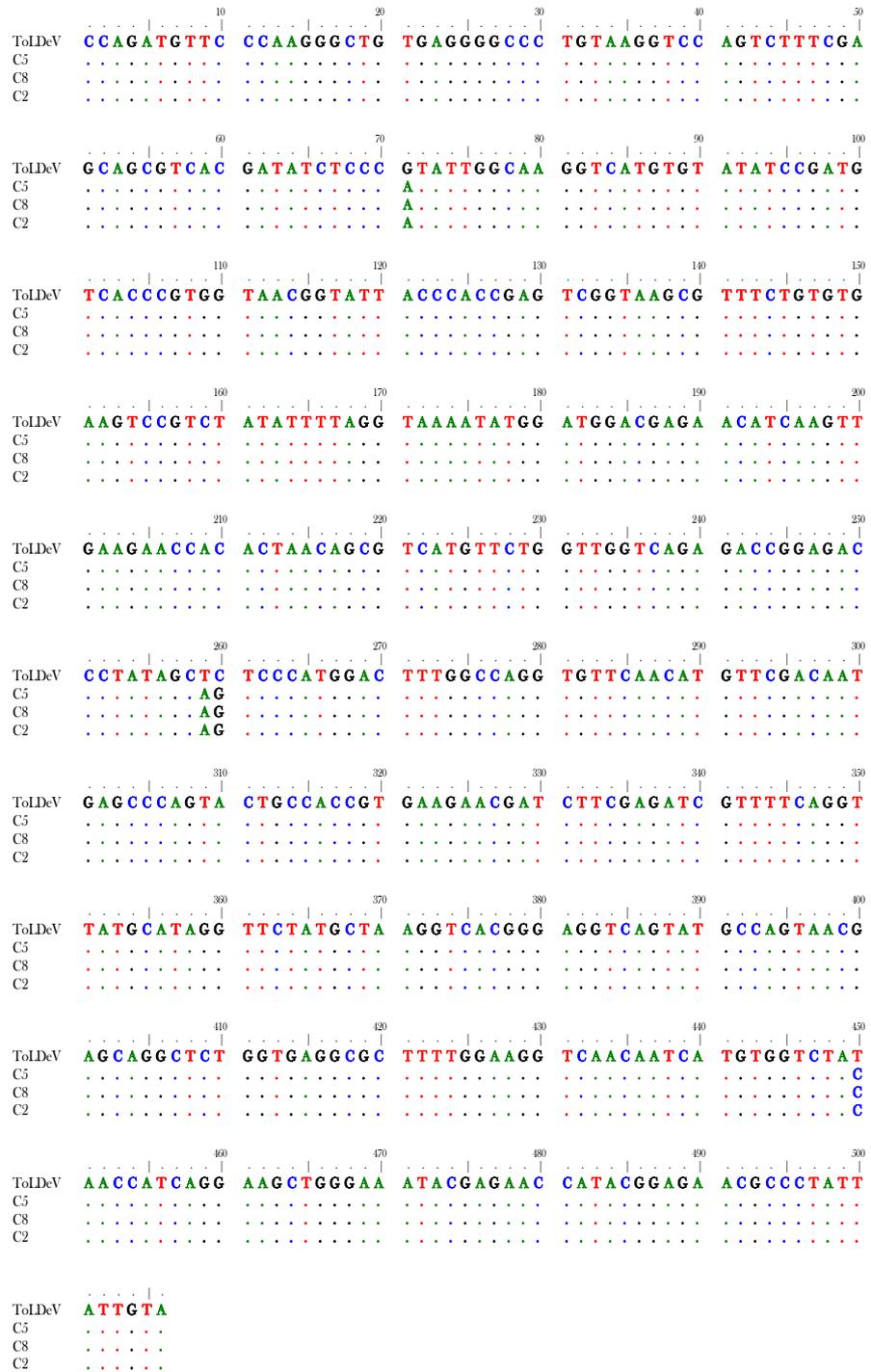
Al realizar el alineamiento de las secuencias en NCBI-Basic Blast se determinó una homología del 99% con el Virus de la deformación de la hoja del tomate (ToLDeV), una especie del género *Begomovirus* recientemente identificada en el Perú (56), almacenada en la base de datos GenBank (No. de acceso GQ334472).

### **3.6. Comparación de la secuencia y análisis filogenético**

#### **Alineamiento de nucleótidos con ToLDeV-Perú**

Las muestras alineadas con la secuencia de la especie de ToLDeV descrita en el Perú presentaron una homología del 99%, por lo que se consideran de la misma especie, de acuerdo a lo especificado por Fauquet (58).

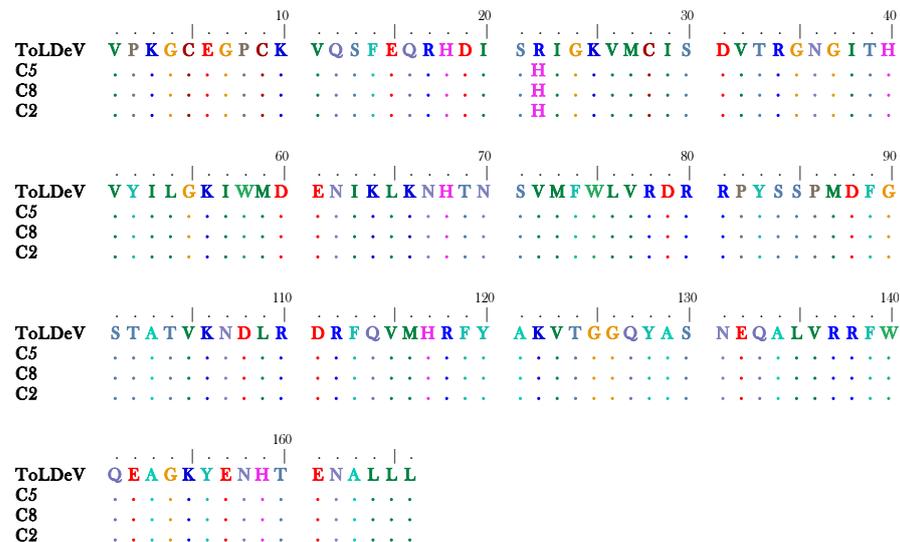
Las alineaciones fueron realizadas mediante el software BioEdit (64). Se encontraron cuatro variaciones en la secuencia ecuatoriana; las variantes están ubicadas en los nucleótidos 71, 239, 240 y 450 reemplazando G, T, C y T por A, A, G y C respectivamente (Figura 16); estos cambios, podrían deberse a una mutación originada en la replicación del virus lo que corrobora el hecho que los geminivirus son cuasi-especies, que presentan un sinnúmero de cambios entorno a una secuencia consenso (24), (58).



**Figura 16:** Alineación de las secuencias de nucleótidos de ToLDeV del Perú con las tres secuencias encontradas en Ecuador, se observan cuatro variaciones.

## Alineamiento de aminoácidos con ToLDeV-Perú

Al transformar las secuencias de ADN a aminoácidos, y al efectuar la alineación de las tres secuencias ecuatorianas con ToLDeV-Perú en el programa BioEdit, (65) se observó un cambio en los aminoácidos como se aprecia en la Figura 17.



**Figura 17: Alineación de las secuencias de aminoácidos de ToLDeV, del Perú con las tres especies identificadas en Ecuador C5, C8, C2**

El codón que codifica para Arginina **CGT** (R) fue remplazado por una Histidina **CAT** (H), mientras que la variación **TCT** por **AGT** no ocasionó ningún cambio ya que estos dos tipos de tripletes codifican para Serina (S); así mismo el cambio en la última base de **TAT** por **TAC**, no causa ninguna variación significativa, codificando Tyrosina (Y) en las dos posiciones. Cabe recalcar que las variaciones o recombinaciones genéticas son procesos muy comunes para el género *Begomovirus*; ciertas variaciones pueden ser favorables para la supervivencia y

resistencia de estos virus, contribuyendo a la expansión de estos patógenos en nuevas áreas por lo que es necesario realizar estudios detallados (69).

### **Alineamiento y árboles filogenéticos con los *Begomovirus* de América.**

Para el diseño del árbol filogenético se empleó el software Mega versión 5.05 (66). El análisis de secuencias se obtuvo con la alineación de 168 aminoácidos de la región central de la CP.

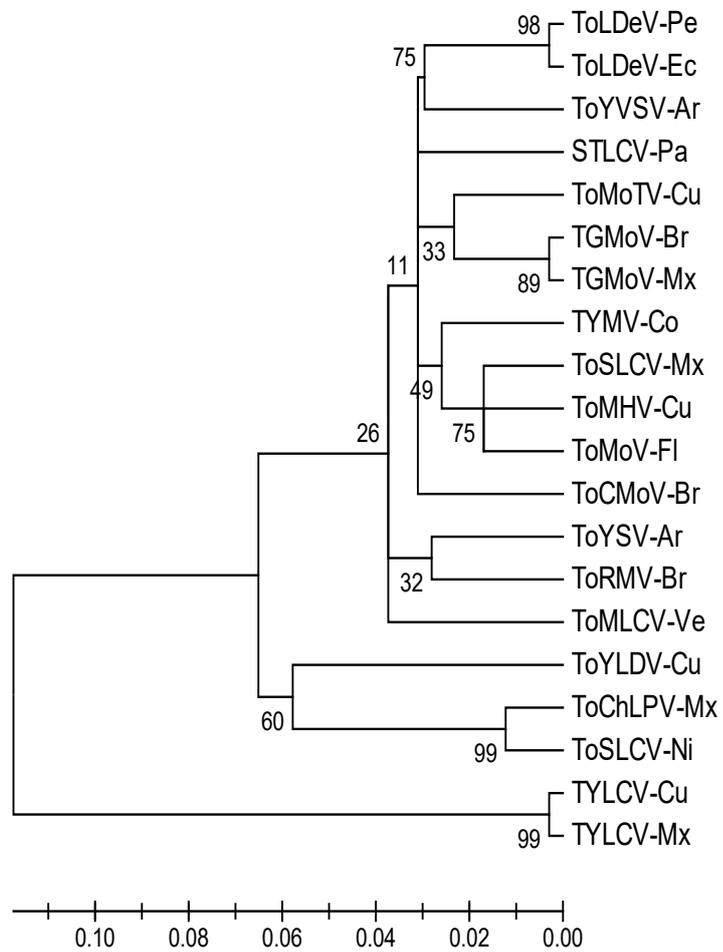
La Figura 18 se describen las distancias genéticas, las cuales fueron determinadas usando el método Construct/test-Neighbor Joining tree (65), a demás detalla la relación que existe entre la muestra ToLDeV descrita por primera vez en este estudio, en el Ecuador, con las demás especies, Puede apreciarse que se forman seis ramas (nodos e internodos) de importancia, siendo la secuencia ToLDeV de Perú la más cercana filogenéticamente, ubicándose en el mismo nodo con 98%, seguido por ToYVSV-Ar con 76% en su internodo; el tercer internodo distante estaría conformado por las especies ToCMoV-Br SLCV-Pa, ToMoTV-Cu, TGMoV-Br, TGMoV-Mx, TYMV-Co, ToSLCV-Mx, ToMHV-Cu, ToMoV-FI; el cuarto internodo más distante está conformado por ToYSV-Ar, ToRMV-Br, ToMLCV-Ve; el quinto grupo alejado es ToYDV-Cu, ToCHLPV-Mx , ToSLCV-Ni y finalmente los

individuos que se encuentran totalmente separados no solo de ToLDeV-Ec si no a todos los demás individuos es TYLCV tanto de México como Cuba.

Sin embargo hay que recalcar que desde el segundo nodo se aprecia la enorme distancia genética entre esta nueva especie (ToLDeV), tanto para Perú (56) como para Ecuador, en relación a los begomovirus más trascendentales de cada País.

Las distancias observadas entre las diferentes especies de begomovirus, están siendo consideradas en la actualidad por varios investigadores, como parte de un complejo proceso de evolución y adaptación, teniendo como motor la capacidad de recombinación de este tipo de virus, lo que les permite acceder a un mayor número de hospederos y a una variedad de síntomas diferentes.

Haciendo un análisis desde el punto de vista de familia, esta es una de las más complejas al momento de realizar o plantear técnicas de control, ya que su diversidad y capacidad de recombinación quiebran rápidamente la resistencia de algunas variedades comerciales de tomate.



**Figura 18:** Dendrograma, que muestra la relación entre 20 begomovirus que infectan únicamente a los cultivos de *S. lycopersicum*, empleando el alineamiento de secuencias 186 de aminoácidos de la región central de la cápside proteica.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

1. Con este estudio se demostró por primera vez la presencia del género *Begomovirus* en los cultivos de tomate (*S. lycopersicum*) y malezas en las haciendas de la provincia de Santa Elena-Ecuador.
2. Se detectó la presencia de geminivirus en todas las localidades evaluadas.
3. Los síntomas con mayor asociación a la presencia comprobada de geminivirus fueron enrollamiento de las hojas, en la localidad de Luz Victoria, y clorosis foliar en Chanduy, en las demás localidades se encontró variedad de síntomas independientes a la infección.

4. El begomovirus identificado en los cultivos ecuatorianos correspondió a ToLDeV con una homología del 99% con el ToLDeV identificado recientemente en Perú, encontrándose 4 variantes en la secuencia de nucleótidos, pero solo uno de esos cambios resultó ser relevante para ocasionar un cambio en la secuencia de aminoácidos reemplazando una arginina por una histidina. Sin embargo para poder llegar a una conclusión más contundente sobre el porcentaje de similitud del virus identificado con el reportado en Perú, sería necesario secuenciar el genoma completo del virus, además de identificar la presencia del componente B o algún satélite relacionado con el mismo, de esta manera se realizaría un estudio completo sobre los cambios ocurridos en las secuencias virales y su repercusión en características como síntomas, rango de hospederos y movimiento del virus en la planta.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda para estudios futuros, utilizar los protocolos de extracción de ácidos nucleicos descrito por Palmer (70) que son mucho más eficientes para realizar ensayos de clonación y secuenciación, mientras los de Dellaporta (62) son aplicados para hibridación y PCR.
2. Teniendo en cuenta que solo en el 34% de las muestras con síntomas similares a los inducidos por geminivirus, se detectó la presencia de geminivirus, es conveniente profundizar el estudio para identificar el impacto real de la presencia de esta familia viral en los cultivos de ciclo corto como pimiento, frejol, etc., y detectar la posible presencia de otros agentes causales en las plantaciones.
3. Secuenciar el genoma completo del componente A del virus identificado.
4. Evaluar la presencia de geminivirus en malezas que pueden ser reservorios de una gran variedad de virus, e identificar las posibles variaciones genéticas de esta familia.
5. Evaluar la presencia de geminivirus en *B. tabaci* en sus diferentes biotipos ubicados en los cultivos infectados y evaluar su capacidad vectorial.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Idris, A. & Brown, J. 1998. Sinaloa tomato leaf curl geminivirus: Biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88:648-657.
2. Martínez, Y., Quiñones, M., Fonseca, D. & Miranda, E. 2003. Prospección nacional de Begomovirus presentes en el cultivo del tomate en Cuba. *Revista Protección Vegetal*. 18(3). P 168-175.
3. Zúñiga, C. & Ramírez, P. 2002. Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecológica (Costa Rica)* No. 64. P 25 – 33.
4. Bian, X.Y., Thomas, M. R., Rasheed, M. S., Saeed, M., Hanson, P., De Barro, P. J. & Rezaian, M. A. 2007. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology* 97:930-937.
5. Ambrozevicius, L.P., Calegario, R.F., Fontes, E.P.B., Carvalho, M.G. & Zerbini, F.M. Brasil. 2002. Genetic diversity of Begomovirus infecting tomato and associated weeds in southeastern Brazil. *Fitopatología Brasileira* 27:372-377.

6. Holguín, R., Vázquez, R. & Mejía, H. México. 2004. Geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y rango de hospedante en Baja California Sur, México. *Resista Mexicana de Fitopatología*. 22(001).
7. Jiu, M., Zhou, X.P., Tong, L., Xu, J. & Yang, X. 2007. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *PLoS ONE* 2:e182.
8. Xiong, Q., Fan, S., Wu, J. & Zhou, X. 2007. Ageratum yellow vein China virus is a distinct Begomovirus species associated with a DNA $\beta$  molecule. *Phytopathology* 97:405-411.
9. ICTVdB Management (2006). Taxonomy of Geminivirus The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>.
10. Yang, C., Cui, G., Zhang, J., Weng, X., Xie, L. & Wu, Z. 2008. Molecular characterization of a distinct Begomovirus species isolated from Emilia Sonchifolia. *Journal of Plant Pathology* 90 (3), 475-478.
11. FAOSTAT 2011. Food and Agricultural organization for the united nations. Available in: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
12. Arias, M. 1995. Monitoreo de moscas en soya. *Revista INIAP (Ecuador)* 6: 13.

13. Valarezo, O., Cañarte, E., Navarrete, B., Guerrero, J. & Arias, M. 2008. Diagnóstico de la “mosca blanca” en Ecuador. *Revista la Granja*. P 13-15, 18.
14. Faría, A. & Nava, A. Venezuela. 2007. Detección por PCR de Begomovirus en el cultivo de tomate en las áreas productoras de tomate en los andes venezolanos. *Revista de la Facultad de Agronomía Luz (Maracaibo-Venezuela)*. 26: 179-195.
15. Czosnek, H. 2002. Characterization and management of tomato and pepper geminiviruses. Submitted to the Office Agriculture & Food Security U.S. Agency for International Development. P 3- 6.
16. Rosales, I., Sepúlveda, P., Sepúlveda, G. & Brown, J. Chile. 2007. Caracterización molecular preliminar del complejo mosquita Blanca-Begomovirus en Arica y Parinacota.
17. Yadava, P., Suyal, G. & Kumar, S. 2010. Begomovirus DNA replication and pathogenicity. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology. *Revista CURRENT SCIENCE*, 98 (3).
18. Cervantes, L., Zavaleta, E. & Rojas, R. México. 2009. Detección de geminivirus asociados a la alstroemeria (alstroemeria l.) En villa Guerrero, estado de México. *Revista Averciencia* 34:12.
19. Quiñones, M., Vega, A., Martínez, Y. & Rodríguez, E. 2007. Estrategias de ingeniería genética para la obtención de plantas

transgénicas, resistentes a geminivirus, Experiencia del CENSA. La Habana. Rev. Protección Veg. v.22 n.2.

20. Cuong, Viet Ha. 2007. Detection and identification of potyviruses and geminiviruses in Vietnam. Tropical Crops and Biocommodities Domain Institute of health and Biomedical Innovation. Martínez, Y., Quiñones, M., Palenzuela, I. & Muñoz. Y. 2006. Diversidad de Begomovirus presentes en Cuba. Revista Protección Vegetal. 21(3). P 149-154.
21. Martínez, Y., Quiñones, M., Palenzuela, I. & Muñoz. Y. 2006. Diversidad de Begomovirus presentes en Cuba. Revista Protección Vegetal. 21(3). P 149-154.
22. Index of Viruses - Geminiviridae (2006). In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_index.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm)
23. Saunders, K., Bedford, I.D., Yahara, T. & Stanley, J. 2003. Aetiology: The earliest recorded plant virus disease. Nature 422, 831.
24. Ramos, P. 2004. Identificación y caracterización biológica y molecular de una nueva especie de Begomovirus bipartito: Tomato mottle taino virus. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Departamento de Plantas, Laboratorio de Virología Vegetal. Cuba.

25. Flores, G. 2003. Evaluación de fracciones de extractos y de sustancias puras de origen vegetal como disuasivos o repelentes de adultos de *Bemisia tabaci*. Tesis de maestría de Costa Rica. Pag. 6-13
26. Martínez, Y. 1998. Contribución al conocimiento de geminivirus que afectan el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Cuba. Instituto superior de ciencias agropecuarias de la Habana. Fructuoso Rodríguez, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. P 5,6,13.
27. Briddon, R., Patil, B., Bagewadil, B. Naqaz-ul-Rehman, M & Fauquet, C. 2010. "Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite Begomoviruses.
28. DIXON, AFG. 1973. Biology of aphids. E. Arnold (Public.) Ltd. London. 58p.
29. Xiong, Z. 1995. Single stranded DNA viruses: Geminiviruses. <http://ag.arizona.edu/%zxion/plp611/lect17.html>
30. Varsani, A., Shepherd, D., Dent, K., Monjane, A., Rybicki, E. & Martin, D. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virology Journal*, 6:36.
31. Haber, S., Ikegami, M., Bajet, N.B. & Goodman, R.M. 1981. Evidence for a divided genome in bean golden mosaic virus, a geminivirus. *Nature*, UK 289, 324-326.

32. Kon, T., Kuwabara, K., Hidayat, S. H. & Ikegami, M. 2007. A Begomovirus associated with ageratum yellow vein disease in Indonesia: evidence for natural recombination between tomato leaf curl Java virus and Ageratum yellow vein virus-[Java]. *Arch Virol* 152: 1147–1157.
33. Ilyas, M., Qazi, J., Mansoor, S. & Briddon, R. 2010. Genetic diversity and phylogeography of Begomoviruses infecting legumes in Pakistan. *Journal of General Virology*. Vol 91 N°2091-2101.
34. Nkeabeng, W. 2010. Molecular Epidemiology of Begomoviruses That Infect Vegetable Crops in Southwestern Cameroon. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
35. Argüello-Astorga, G.R. & Ruiz-Medrano, R. 2001. An interon-related domain is associated to motif 1 in the replication proteins of geminivirus: identification of potential interacting amino acid base pairs by a comparative approach. *Arch. Virol.* 146: 1465-1485.
36. Martinez, Y. 2008. Emergence of Begomoviruses in Cuba. National Centre for Animal and Plant Health (CENSA). *Rev. Protección Veg.* Vol. 23 No. 1: 11-15.
37. Prabhaker, N., Toscano, N., Castle, S. & Henneberry, T. 1997. Selection for imidacloprid resistance in silverleaf whiteflies from the imperial valley and development of a hydroponic bioassay for resistance monitoring. *Pestic. Sci.* 51: 419-428.

38. ICTVdB Management (2006). 00.029.0.03. BEGOMOVIRUS. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
39. Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. & Markham, P.G, 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin., *Virology*, 1996 May 15; 219 (2) :387-94.
40. ICTVdB Management (2006). 00.029.0.02. CURTOVIRUS. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
41. ICTVdB Management (2006). 00.029.0.01. MASTREVIRUS. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
42. ICTVdB Management (2006). 00.029.0.04. TOPOCUVIRUS. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
43. Coronel, J. 2009. Alternativas de Mejora en el Manejo Postcosecha de Tomate Riñón Cultivados en la Provincia de Santa Elena. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica.
44. Pérez, M. 2010. Mejoramiento genético en *Solanum Lycopersicum* para la resistencia al pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae). Tesis de maestría en ciencias

agrarias línea de investigación fitomejoramiento. Universidad nacional de Colombia. Facultad Dr. Ciencias Agropecuarias.

45. Espinosa, C. 2004. Producción de Tomate en invernadero. Multiservicios Agropecuarios y Forestales, Zapata y Asociados. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción Torreón, Coah, México.
46. FAO (2004) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) FAOSTAT Database. Rome Italy. Available at <http://faostat.fao.org/>.
47. Productores de Hortalizas. México. 2006. Plagas y enfermedades del Tomate (Guía de Identificación y manejo). P 1, 8, 9 y 23.
48. Brown, J.K., Idris, A.M., Torre-Jerez., Banks, G.K. & Wyatt, S.D. 2001 the core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of Begomoviruses. Archives of Virology 146:1581-1598.
49. Morales, M.V., Alcacio, S. & De La Torre, R. 2008. Tomato spotted wilt virus: agente causal de la marchitez del Miguelito (*Zinnia elegans* Jacquin) en el Estado de Morelos, México. Agrociencia [online], vol.42, n.3, pp. 335-347. ISSN 1405-3195.
50. Faier, R., Siqueira, S., Chumbinho, E., & Murilo F. 2007. Characterization of Tomato yellow spot virus, a novel tomato-infecting

begomovirus in Brazil. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.9, p.1335-1343.

51. Fiallos E. MArtines, Y. Hernandez, C. Carrillo, J. & Rivera, R.F. 2009 Identificación de nuevos Begomovirus en cuba mediante el empleo de la amplificación por círculo rodante. *Rev. Protección Veg.* Vol. 24 No. 2: 81-86.
52. Martínez, A. 2007. Caracterización Molecular de un Begomovirus de Tomate en el Valle de Cauca, Colombia y búsquedas de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. Tesis Magister Ciencias Agrarias. Valle del Cauca–Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Posgrados. p 1- 4, 8, 11- 14.
53. Rojas, M.R. 1992. Detection and characterization of whitefly-transmitted geminiviruses by the use of polymerase chain reaction. M.S. thesis. University of Wisconsin-Madison.
54. Martínez, Y., Fonseca, D., Quiñones, M. & Peralta, E. 2001. Evaluación de parámetros analíticos para la detección molecular de geminivirus que afectan el cultivo del tomate en Cuba. *Rev. Protección Veg.* Vol. 16 No. 1 : 55-61.
55. Nelson, J., Cai, Y., GGiesler, T., Farchaus, J., Sundaram, S., Ortiz, M., Hosta, L., Hewitt, P., Mamone, A., Palaniappann, C. & Fuller, Carl. 2002. *TempliPhi*, 29 DNA Polymerase Based Rolling Circle

Amplification of Templates for DNA Sequencing. Genomics Reagents Department, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA.

56. Márquez B., Aragón, L., Fiallo, E., Navas, & J. Moriones, E. 2011. Tomato leaf deformation virus, a novel Begomovirus associated with a severe disease of tomato in Peru. *Eur J Plant Pathol* (2011) 129:1–7.
57. Smith, J.Z., Sanders, R.J., Kaiser, P., Hughes, C., Dodd, C.R., Connell, C., Heiner, S.B., Kent, L.E. & Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature* 321: 674–679.
58. Fauquet, C., Briddon, R., Brown, J. Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M. & Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153: 783-821.
59. Pietersen, G., Idris, A.M., Krüger, K. & Brown J.K. 2008. Characterization of Tomato curly stunt virus: a new tomato infecting Begomovirus from South Africa. *Plant Pathology*.57:809-818.
60. Huayamave, R. & Maldonado, A. 2002. Estudio del potencial agroindustrial y exportador de la Península de Santa Elena y de los recursos Necesarios Para Su Implementación; Caso: Oca. Informe De Tesis del Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.
61. Cañadas, L. 1983. El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador. Banco Central del Ecuador Quito-Ecuador Pg. 24 y 25.

62. Dellaporta, S. Word, J. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reports*. N°1, 1983, pp. 19 – 21.
63. Aljanabi, S., Wood, J. & Hicks, J. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
64. Balzarini, M.G., González, L., Tablada M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A. & Robledo, C.W. 2008. *Infostat. Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
65. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
66. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
67. Muñoz, R. & Pitty A. 1995. Guía fotográfica para la identificación de malezas, Parte I. Zamorano, Honduras: Escuela agrícola Panamericana. 77-80.
68. Valarezo, O. 1994. Diagnóstico preliminar sobre moscas blancas en el Ecuador. *Revista Colegio de Ingenieros Agrónomos de Manabí (Ecuador)*: 15.

69. Potter, J.L. 2001. PCR and DNA Hybridization methods for specific Detection and Identification of Bean-Infecting Begomoviruses. Tesis en opción al grado de Master en Ciencia en Patología de plantas de la Universidad de Wisconsin- Madison. 159 Págs.
70. Palmer, K., Schnippenkoetter, H. & Rybicki, E. 1998. Geminivirus isolation and DNA extraction. In G. Foster, and S. Taylor (eds). Plant Virology Protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. 567 p.

# APÉNDICE

## Apéndice A: Nomenclatura de muestras recolectadas

Localidad Azúcar							
#	Hacienda	Muestra	Código	#	Hacienda	Muestra	Código
1	Azucar	Maleza	Mal 1	30	Azucar	Maleza	AM1
2	Azucar	Maleza	Mal 2	31	Azucar	Maleza	AM2
3	Azucar	Maleza	Mal 3	32	Azucar	Maleza	AM3
4	Azucar	Tomate	T1	33	Azucar	Maleza	AM4
5	Azucar	Tomate	T2	34	Azucar	Maleza	AM5
6	Azucar	Tomate	T3	35	Azucar	Tomate	A1
7	Azucar	Tomate	T4	36	Azucar	Tomate	A2
8	Azucar	Tomate	T7	37	Azucar	Tomate	A3
9	Azucar	Tomate	T8	38	Azucar	Tomate	A4
10	Azucar	Tomate	T12	39	Azucar	Tomate	A5
11	Azucar	Tomate	T13	40	Azucar	Tomate	A6
12	Azucar	Tomate	T14	41	Azucar	Tomate	A7
13	Azucar	Tomate	T15	42	Azucar	Tomate	A8
14	Azucar	Tomate	T16	43	Azucar	Tomate	A9
15	Azucar	Tomate	T17	44	Azucar	Tomate	A10
16	Azucar	Tomate	T18	45	Azucar	Tomate	A11
17	Azucar	Tomate	T20	46	Azucar	Tomate	A12
18	Azucar	Tomate	T21	47	Azucar	Tomate	A13
19	Azucar	Tomate	T22	48	Azucar	Tomate	A14
20	Azucar	Tomate	T23	49	Azucar	Tomate	A15
21	Azucar	Tomate	T24	50	Azucar	Tomate	A16
22	Azucar	Tomate	T25	51	Azucar	Tomate	A17
23	Azucar	Tomate	T26	52	Azucar	Tomate	A18
24	Azucar	Tomate	T27	53	Azucar	Tomate	A19
25	Azucar	Tomate	T28	54	Azucar	Tomate	A20
26	Azucar	Tomate	T29	55	Azucar	Tomate	A21
27	Azucar	Tomate	T30	56	Azucar	Tomate	A22
28	Azucar	Tomate	T31				
29	Azucar	Tomate	T32				

**Localidad Luz Victoria**

<b>#</b>	<b>Hacienda</b>	<b>Muestra</b>	<b>Código</b>	<b>#</b>	<b>Hacienda</b>	<b>Muestra</b>	<b>Código</b>
57	Luz Victoria	Maleza	VM1	76	Chandui	Maleza	CM1
58	Luz Victoria	Maleza	VM2	77	Chandui	Maleza	CM2
59	Luz Victoria	Maleza	VM3	78	Chandui	Tomate	C1
60	Luz Victoria	Tomate	V1	79	Chandui	Tomate	C2
61	Luz Victoria	Tomate	V2	80	Chandui	Tomate	C3
62	Luz Victoria	Tomate	V3	81	Chandui	Tomate	C4
63	Luz Victoria	Tomate	V4	82	Chandui	Tomate	C5
64	Luz Victoria	Tomate	V5	83	Chandui	Tomate	C6
65	Luz Victoria	Tomate	V6	84	Chandui	Tomate	C7
66	Luz Victoria	Tomate	V7	85	Chandui	Tomate	C8
67	Luz Victoria	Tomate	V8	86	Chandui	Tomate	C9
68	Luz Victoria	Tomate	V9	87	Chandui	Tomate	C10
69	Luz Victoria	Tomate	V10	88	Chandui	Tomate	C11
70	Luz Victoria	Tomate	V11	89	Chandui	Tomate	C12
71	Luz Victoria	Tomate	V12				
72	Luz Victoria	Tomate	V13				
73	Luz Victoria	Tomate	V14				
74	Luz Victoria	Tomate	V15				
75	Luz Victoria	Tomate	V16				

## Apéndice B: Medios de cultivos para clonación

### Medio LB-Sólido

Composición	
2g	Bacto Tryptone
1g	Bacto Yeast Extract
2g	NaCl
3g	Bacto Agar

### Medio LB-Líquido

Composición	
2g	Bacto Tryptone
1g	Bacto Yeast Extract
2g	NaCl

### Medio SOC (100ml)

Composición	
2g	Bacto Tryptone
0.5g	Bacto Yeast Extract
1ml	NaCl 1M
0.25ml	KCl 1M
1ml	Mg <sup>++</sup> stock 2M
1ml	Glucosa 2M (Filtrado y esterilizado)

Se mezcla primero el Bacto Tryptone, el Bacto Yeast Extract y el NaCl en un volumen de 97 ml de agua estéril. Después de autoclavar se agrega el Mg<sup>++</sup> stock y la Glucosa, se preparan alícuotas y se ponen en congelación en -20°C

