



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

“Identificación molecular y caracterización de síntomas de aislados virales de naranjilla en 3 especies de la sección Lasiocarpa (*S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. sessiflorum*).”

*Trabajo de Titulación previo a la obtención del
título de Ingeniero Agrónomo*

AUTOR:

Mayco Vinicio Martínez Escovar

C.I:1900745892

Vini1994mm@gmail.com

DIRECTOR:

Ing. Patricio Salvador Castro Quezada. PhD.

C.I: 1103411151

CUENCA, ECUADOR

13/09/ 2021



RESUMEN

La naranjilla es un rubro importante para la Amazonía sur del Ecuador debido a que constituye una de las principales fuentes de ingresos para las familias locales. Sin embargo, posee grandes limitantes causadas por plagas y enfermedades. La falta de información sobre infecciones virales en la Amazonía sur del Ecuador, incentivó a la realización del presente estudio, cuyo objetivo fue determinar la identidad molecular y caracterizar los síntomas de aislados virales de naranjilla de 4 lotes comerciales del cantón Palanda en 3 especies de la sección lasiocarpa (*S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. sessiflorum*). Se realizaron inoculaciones mecánicas de los aislados virales en las 3 especies y se evaluaron la incidencia y severidad de los síntomas. Se aplicó un diseño completamente al azar y se midió las variables a los 20, 25 y 30 dpi. Hubo diferencia estadística significativa de la variable severidad (Tukey $p < 0.05$) entre el testigo y los 4 aislados virales en cada especie. Además, se determinó mayor nivel de daño causado por los aislados en *S. quitoense* que en *S. sessiflorum* y *S. hirtum*. Para determinar la identidad molecular, se evaluaron 16 cebadores de virus de solanaceas utilizando la técnica de RT-PCR. Se identificó la presencia de un complejo viral entre CMV y PYVV. Además, se caracterizó la sintomatología de este complejo viral que consistió en clorosis intervenal, arrugamientos de las hojas, necrosis, mosaicos, anillos cloróticos, hojas coriáceas, entre otros. Es el primer reporte de infección mixta de virus que infectan a la naranjilla en el Ecuador y es de gran valor ante las evidentes deficiencias de información que actualmente se tiene sobre los agentes causales de virosis en este cultivo.

Palabras clave: Virología vegetal. Virus en naranjilla. Síntomas de virosis en *S. quitoense*, *S. sessiflorum*, *S. hirtum*. Identificación molecular. RT-PCR.



ABSTRACT

The naranjilla is an important item for the southern Amazon of Ecuador because it is one of the main sources of income for local families. However, it has great limitations caused by pests and diseases. The lack of information on viral infections in the Amazon south of the Equator, encouraged the realization of this study, whose objective was to determine the molecular identity and characterize the symptoms of asylees viral naranjilla of 4 commercial lots of the canton Palanda in 3 species of the section lasiocarpa (*S. quitoense*, *S. hirtum* and *S. sessiflorum*). Mechanical inoculations of viral isolates were performed in the 3 species and the incidence and severity of symptoms were evaluated. A completely random design was applied and the variables were measured at 20, 25 and 30 dpi. There was a statistically significant difference in the severity variable (Tukey $p < 0.05$) between the control and the 4 viral isolates in each species. In addition, a higher level of damage caused by isolates was determined in *S. quitoense* than in *S. sessiflorum* and *S. hirtum*. To determine the molecular identity, 16 solanaceae virus primers were evaluated using the RT-PCR technique. The presence of a viral complex between CMV and PYVV was identified. In addition, the symptomatology of this viral complex was characterized, consisting of interenal chlorosis, leaf wrinkles, necrosis, mosaics, chlorotic rings, leathery leaves, among others. It is the first report of mixed infection of viruses that infect the naranjilla in Ecuador and is of great value given the obvious deficiencies of information currently available on the causative agents of virosis in this crop.

Keywords: Plant Virology. Virus in naranjilla. Virosis symptoms in *S. quitoense*, *S. sessiflorum*, *S. hirtum*. Molecular identification. RT-PCR.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
2.1. Objetivo General:	15
2.2. Objetivos Específicos:.....	15
2.3. Pregunta de investigación	15
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Generalidades de la naranjilla.....	16
3.1.1. Naranjilla en Ecuador.....	16
3.2. Sección Lasiocarpa del género <i>Solanum</i>	16
3.3. Virus.....	17
3.3.1. Generalidades de los Virus.....	17
3.3.2. Síntomas de virus de Solanáceas en Ecuador	17
3.3.3. Síntomas de virus en naranjilla en Ecuador	18
3.3.4. Interacción virus- Solanáceas.....	19
3.4. Retro-transcripción (Transcripción reversa)	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1. Materiales.....	22
4.2. Métodos.....	22
4.2.1. El área de estudio	22
4.2.2. Manejo del experimento.....	23
4.2.2.1. Metodología para la investigación experimental del objetivo 1.	23
4.2.2.1.1. Recolección de muestras con síntomas de enfermedad viral.....	23
4.2.2.1.2. Material vegetal.	24



4.2.2.1.3. Inoculación mecánica de los Aislados virales.	24
Diseño experimental para el objetivo 1.	25
4.2.2.1.4. Variables evaluadas.	26
4.2.2.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2.	27
4.2.2.2.1. Extracción de ARN total.	27
4.2.2.2.2. Retro- transcripción (RT), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	27
5. RESULTADOS.....	29
5.1. Caracterización de los síntomas inducidos por los aislados virales en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	29
5.1.1. Características asociadas a infección viral en <i>S. quitoense</i>	29
5.1.2. Características asociadas a infección viral en <i>S. sessiflorum</i>	30
5.1.3. Características asociadas a infección viral en <i>S. hirtum</i>	32
5.1.4. Evaluación de la incidencia de virosis en función de los síntomas externos ocasionada por los aislados virales en las 3 especies de la sección Lasiocarpa.....	33
5.1.4.1. Incidencia en <i>S. quitoense</i>	33
5.1.4.2. Incidencia en <i>S. sessiflorum</i>	34
5.1.4.3. Incidencia en <i>S. hirtum</i>	34
5.1.5. Evaluación de la severidad ocasionada por aislados virales en función de los síntomas externos en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	34
5.1.5.1. Severidad de síntomas en <i>S. quitoense</i>	35
5.1.5.2. Severidad de síntomas en <i>S. sessiflorum</i>	36
5.1.5.3. Severidad de síntomas en <i>S. hirtum</i>	37
5.1.6. Evaluación de la severidad de los aislados virales entre especies de la sección Lasiocarpa.....	38
5.1.6.1. Severidad ocasionada por el aislado de Valladolid en las 3 especies de la sección Lasiocarpa.....	39



5.1.6.2. Severidad ocasionada por el aislado de S. F. del Vergel Miraflores en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	40
5.1.6.3. Severidad ocasionada por el aislado de Las Juntas en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	41
5.1.6.4. Severidad ocasionada por el aislado de S. F. del Vergel en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	42
5.2. Identificación molecular de aislados virales por RT-PCR	43
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES	49
8. RECOMENDACIONES	50
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
10. ANEXOS	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Materiales físicos, químicos y biológicos utilizados en el presente estudio	22
Tabla 2. Coordenadas de las zonas de estudio	23
Tabla 3. Diseño experimental completamente al azar del estudio realizado	25
Tabla 4. Escala para medir la severidad de síntomas de virus	26
Tabla 5. Cebadores específicos utilizados para evaluar la presencia de virus en muestras de tejido de naranjilla con síntomas de virosis en Palanda	28
Tabla 6. Incidencia de síntomas en 3 especies se la sección lasiocarpa (<i>S. quitoense</i> , <i>S. sessiflorum</i> y <i>S. hirtum</i>). Número de plantas infectadas / número total de plantas	34
Tabla 7. Pruebas de normalidad, homocedasticidad de la severidad causada por los aislados virales en <i>S. quitoense</i> , <i>S. sessiflorum</i> y <i>S. hirtum</i>	35
Tabla 8. Análisis de varianza de la severidad causada por los aislados virales en <i>S. quitoense</i> ..	35
Tabla 9. Análisis de varianza de la severidad causada por los aislados virales en <i>S. sessiflorum</i> ..	36
Tabla 10. Análisis de varianza de la severidad causada por los aislados virales en <i>S. hirtum</i>	37
Tabla 11. Pruebas de normalidad y homocedasticidad de la severidad causada por aislados virales entre especies de la sección Lasiocarpa	38



Tabla 12. Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de Valladolid en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	39
Tabla 13. Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de S. F. del Vergel Miraflores en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	40
Tabla 14. Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de Las Juntas en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	41
Tabla 15. Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de S. F. del Vergel en las 3 especies de la sección Lasiocarpa	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas del <i>virus del mosaico clorótico de la naranjilla</i> (NarCMV).....	19
Figura 2. Síntomas inducidos por aislados virales de naranjilla en plantas de <i>S. quitoense</i>	30
Figura 3. Síntomas inducidos por aislados virales de naranjilla en plantas de <i>S. sessiflorum</i>	31
Figura 4. Síntomas inducidos por aislados virales de naranjilla en plantas de <i>S. hirtum</i>	33
Figura 5. Severidad de los aislados virales en <i>S. quitoense</i>	36
Figura 6. Severidad de los aislados virales en <i>S. sessiflorum</i>	37
Figura 7. Severidad de los aislados virales en <i>S. hirtum</i>	38
Figura 8. Severidad ocasionada por el aislado viral de Valladolid entre especies.	39
Figura 9. Severidad ocasionada por el aislado viral de San Francisco del Vergel Miraflores entre especies.	41
Figura 10. Severidad ocasionada por el aislado de Las Juntas entre especies.....	42
Figura 11. Detección de PYVV mediante RT-PCR usando Cebadores específicos (PYVV-F-CP y PYVV-R-CP).	43
Figura 12. Detección de CMV mediante RT-PCR usando Cebadores específicos (CMV1RP-F y CMV1RP-R).	44



LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ARN con Reactivo TRIzol (Invitrogen).....	56
Anexo 2. Protocolo de retro-transcripción (RT).....	57
Anexo 3. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	58
Anexo 4. Resumen de los estudios de identificación molecular de virus presentes en 4 lotes comerciales de naranjilla del cantón Palanda.	59
Anexo 5. Plantas inoculadas con agua estéril (testigo).....	60
Anexo 6. Síntomas de virosis en <i>S. quitoense</i>	60
Anexo 7. Síntomas de virosis en <i>S. sessiflorum</i>	61
Anexo 8. Síntomas de virosis en <i>S. hirtum</i>	61
Anexo 9. Síntomas de virosis en hojas nuevas de especies silvestres; a. <i>S. hirtum</i> ; b. <i>S. sessiflorum</i>	62
Anexo 10. Resumen de síntomas ocasionados por los aislados virales en las 3 especies en estudio.....	63



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

- ARN: Ácido ribonucleico.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ARNss: Ácido ribonucleico monocatenario.
- ARNi: ARN interferente.
- ANSV: *Alstroemeria necrotic streak virus*.
- AMV: *Alfalfa mosaic virus*.
- APLV: *Andean potato latent virus*.
- APMV: *Andean potato mottle virus*.
- CMV: *Cucumber mosaic virus*.
- DICER: Ribonucleasa miembro de la familia de las ARNasa III.
- dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.
- NarCMV: *Naranjilla chlorotic mosaic virus*.
- NarMMV: *Naranjilla mild mosaic virus*.
- PVY: *Potato virus Y*.
- PVX: *Potato virus X*.
- PVS: *Potato virus S*.
- PYVV: *Potato yellow veins virus*.
- PLRV: *Potato leaf roll virus*.
- PVMV: *Pepper veinal mottle virus*.
- RISC: RNA-induced silencing complex.
- RpRd viral: RNA polimerasa- RNA dependiente.
- ToMV: *Tomato mosaic virus*.
- TEV: *Tobacco etch virus*.
- TMV: *Tobacco mosaic virus*.
- TSWV: *Tomato spotted wilt virus*.
- ToRSV: *Tomato ring spot virus*.



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Mayco Vinicio Martínez Escovar en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Identificación molecular y caracterización de síntomas de aislados virales de naranjilla en 3 especies de la sección Lasiocarpa (*S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. sessiflorum*)” de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de septiembre de 2021

Mayco Vinicio Martínez Escovar

C.I: 1900745892



Cláusula de Propiedad Intelectual

Mayco Vinicio Martínez Escovar, autor del trabajo de titulación “Identificación molecular y caracterización de síntomas de aislados virales de naranjilla en 3 especies de la sección Lasiocarpa (*S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. sessiflorum*)”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 13 de septiembre de 2021

Mayco Vinicio Martínez Escovar

C.I: 1900745892



AGRADECIMIENTOS

A Dios y al Universo por haber conspirado para mantenerme firme y no decaer con mucho esfuerzo durante esta gran travesía que comprendió mi carrera como Ingeniero Agrónomo.

A mi madre María por haberme dado la vida, haberme enseñado a distinguir lo importante de lo banal. A mis hermanos Carlos, Nelson, Liliana, Morse y Katherine por su apoyo y sus consejos para poder terminar con éxito esta meta.

A mi tutor Patricio Castro, por su amistad y el apoyo incondicional durante toda la realización de este trabajo. Al Dr. Antonio Vallecillo, por contribuir al desarrollo de la parte técnica y desarrollo de protocolos. A los miembros del tribunal: Ms. Walter Larriva, Ms. Paulina Villena, Dra. Lourdes Díaz, Dr. Eduardo Chica, por contribuir con sugerencias y recomendaciones en pro de la calidad de esta tesis. Un agradecimiento especial a Alexandra Elbakyan, por poner la ciencia a nuestro alcance.

A todos los docentes de la facultad de Ciencias Agropecuarias, por su entrega y sacrificio en impartir sus conocimientos, experiencias y darnos la oportunidad de sumergirnos en este mundo maravilloso del conocimiento.

A la Hna. Mónica Zongor, rectora de la Unidad Educativa San Francisco y Lic. Luis Tenesaca encargado del laboratorio de Biología, por haberme facilitado su infraestructura para realizar la primera etapa de mi investigación. A Carlos Jachero y Mauricio Padilla, por su predisposición incondicional y su amistad.

Al Ingeniero Francel Herrera, técnico encargado del M.A.G cantón Palanda y Lic. Liseth Bermeo por su colaboración en la recolección de muestras. A todas las personas que formaron parte de mi vida universitaria, familiares y amigos, gracias infinitas.

Mayco Vinicio Martínez Escobar.



DEDICATORIA

A mi madre y hermanos quienes me dieron orientación, educación, apoyo y consejos. En especial a mi hermano Nelson Martínez, por su apoyo y ejemplo. A mis compañeros de estudio, a mis maestros y amigos, quienes sin su ayuda nunca hubiera podido culminar este trabajo, esta meta. A todos ellos se los agradezco desde el fondo de mi alma, especialmente a Ud. J. V., por haberme brindado su cariño incondicional, sincero y genuino, por haber estado presente siempre en los momentos difíciles, como en los felices y ser un pilar fundamental en mi vida. Para todos ellos hago esta dedicatoria.

Mayco Vinicio Martínez Escovar



1. INTRODUCCIÓN

En Ecuador, la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) pertenece al grupo de frutas de exportación no tradicionales o también llamadas frutas exóticas. En el 2014, la superficie sembrada fue de 6.000 Ha con una producción de 120000 TM (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones Pro Ecuador, 2014). Las exportaciones de esta fruta a partir del 2013 han ido aumentando paulatinamente de 7,14 t a 62,80 t en el 2017, cuyos principales países destino fueron Estados Unidos, España, Emiratos Árabes Unidos, y Países Bajos, con una participación en miles de USD de 52%, 41%, 3%, y 3% respectivamente (Pro Ecuador, 2014; SIPA, 2017). Las Provincias que producen esta fruta son Tungurahua, Napo, Pastaza, Zamora Chinchipe, Morona Santiago, Pichincha y Bolívar (Pro Ecuador, 2014; Green y col., 2018).

En la actualidad, el cultivo de naranjilla en la Región Amazónica tiene gran potencial económico por su rentabilidad y aceptación en el mercado. Además, es de notable importancia debido a que constituye la principal fuente de ingresos económicos para el sector productivo de la Amazonía Ecuatoriana (Revelo y Sandoval, 2003). En las últimas dos décadas, la producción de naranjilla ha aumentado significativamente, por lo tanto, ahora se la puede encontrar como fruta fresca, en jugo, o como saborizante (Green y col., 2018). Sin embargo, posee fuertes limitantes ocasionadas por plagas y enfermedades (Revelo y col., 2010; Revelo y Sandoval, 2003), lo que ha hecho que paulatinamente los agricultores pierdan el interés por el cultivo, convirtiendo estas zonas en áreas de pastoreo (Silva y col., 2016; Fiallos, 2000), además, para aumentar su producción, acuden a la tala de bosques vírgenes y al uso desmedido de plaguicidas. Esto ha generado resistencia a enfermedades típicas y a insectos que pueden actuar como vectores de enfermedades más complejas como los virus (Green y col., 2018; Vásquez y col., 2011; Viteri y col., 2009).

Actualmente, el “híbrido Puyo” es el principal cultivar sembrado en el territorio nacional, produciendo el 60% de la oferta nacional, seguido del híbrido Palora con el 35% y variedad común 1% (Fiallos, 2000). Esto toma relevancia por cuanto recientemente en el “híbrido Puyo”, se reportó las primeras especies de virus que afectan directamente a la naranjilla bajo condiciones naturales a los que denominaron tentativamente como *Naranjilla chlorotic mosaic virus* (NarCMV) (Green y col., 2018) y *Naranjilla mild mosaic virus* (NarMMV) (Cornejo y col., 2019). Dado que estos híbridos se obtienen de forma interespecífica (*S. sessiflorum* + *S. quitoense*), pueden desencadenar



la aparición de virus nuevos o reemergentes que generalmente no presentan síntomas en las especies silvestres (Green y col., 2018), además, estos se propagan de forma vegetativa, planteando una amenaza directa debido a la falta de programas de certificación del material de propagación de esta fruta.

Los investigadores colocaron a estos virus en el género Tymovirus. Género que no solamente infecta la naranjilla, sino, también al de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), entre otras, como también a especies silvestres, cuya sintomatología causa daños desde leves a severos y su presencia, ha causado graves pérdidas económicas en otros países (Green y col., 2018; Cornejo y col., 2019). En Colombia, hay reportes de infecciones virales en naranjilla causadas por el género Potyvirus, género más grande de virus de ARN de cadena sencilla con sentido positivo (ARNss) y el de mayor importancia económica por las pérdidas que causan en la mayoría de especies de la familia Solanaceae (Vaca y col., 1999).

En Palanda, en los últimos años se ha observado la presencia de plantas con posibles síntomas virales como mosaicos, clorosis, arrugamiento de las hojas y caída de frutos. A pesar del amplio rango de hospedero y las inestimadas pérdidas económicas producidas por los géneros Potyvirus y Tymovirus, no existe información de infecciones similares en la Amazonía sur del Ecuador y no se ha dado la importancia necesaria para analizar posibles epidemias.

Ante las evidentes deficiencias de información que actualmente se tiene sobre los agentes causales de virosis en naranjilla, se realizó el presente estudio con el fin de identificar los virus presentes en naranjilla mediante la técnica de Biología Molecular RT-PCR, y caracterizar los síntomas inducidos en 3 especies de la sección Lasiocarpa: *S. quitoense* Lam., *S. hirtum* y *S. sessiflorum*. Esto a futuro, permitirá conocer como estos interaccionan con las plantas, o incluso, determinar los posibles vectores implicados en el proceso infectivo, y así diseñar estrategias que permitan prevenir pérdidas económicas.



2. OBJETIVOS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

2.1. Objetivo General:

- Identificar molecularmente y caracterizar los síntomas de aislados virales de naranjilla en 3 especies de la sección Lasiocarpa: *S. quitoense* Lam., *S. hirtum* y *S. sessiflorum*.

2.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar los síntomas inducidos por los aislados virales, en las 3 especies de la sección Lasiocarpa.
- Identificar molecularmente los aislados virales por RT-PCR.

2.3. Pregunta de investigación

- ¿Cuáles son los síntomas causados por aislados virales de naranjilla del cantón Palanda en 3 especies de la sección Lasiocarpa?
- ¿Cuál es la identidad molecular de estos aislados virales?



3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Generalidades de la naranjilla

La naranjilla (*S. quitoense* Lam.) es una especie de arbusto perenne originaria y cultivada en áreas subtropicales de Ecuador, Colombia y Perú (Green y col., 2018; Lobo, 2000; Heiser, 1972). Pertenece a la sección Lasiocarpa de la familia Solanaceae. El fruto es de forma redonda ovalada, cuyo interior se divide en 4 compartimientos llenos de pulpa color verdoso amarillento, y numerosas semillas pequeñas (Silva y col., 2016).

3.1.1. *Naranjilla en Ecuador*

La naranjilla es considerada dentro del grupo de frutas de exportación no tradicionales o también llamadas frutas exóticas. En el 2014, la superficie sembrada fue de 6.000 Ha con una producción de 120000 TM (Pro Ecuador, 2014). Los principales países de destino hasta septiembre del 2014 fueron: Estados Unidos, España, Emiratos Árabes Unidos, y Países Bajos, con una participación en miles de USD de 52%, 41%, 3%, y 3% respectivamente (Pro Ecuador, 2014). Las principales Provincias que producen esta fruta son; Tungurahua, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Pichincha, Bolívar y Zamora Chinchipe (Pro Ecuador, 2014; Green y col., 2018).

3.2. Sección Lasiocarpa del género *Solanum*

La sección lasiocarpa incluye entre 11 y 13 especies distribuidas principalmente en el noroeste de Suramérica: *Solanum candidum* Lindl, *S. felinum* Bitter ex Whalen, *S. hirtum* Vahl, *S. hyporhodium* A. Braun y C. D. Bouché, *S. indicum*, *S. lasiocarpum* Dunal, *S. pectinatum* Dunal, *S. pseudolulo* Heiser, *S. quitoense* Lam, *S. repandum* G. Forst, *S. sessiflorum* Dunal, *S. stramoniifolium* Jacq, *S. vestissimum* (Dunal y col., 1981; Heiser, 1996; Bohs, 2004 citados en Arias y col., 2007), con presencia de un taxón, *S. ferox*, en el continente Asiático (Whalen y col., 1981; Heiser y Anderson, 1999 citados en Arias y col., 2007). Del conjunto de entidades biológicas anteriores, la naranjilla (*S. quitoense*) y la cocona, o lulo amazónico (*S. sessiflorum*) son cultivos importantes en América Latina (Heiser, 1969, 1985 citado en Arias y col., 2007). El centro primario de diversidad genética del taxón comprende Colombia, Ecuador y Perú, encontrándose entre los 1200 y 2300 msnm (Arias y col., 2007).



3.3. Virus

3.3.1. Generalidades de los Virus

En los casi 115 años de desarrollo de la virología como disciplina científica, no se ha logrado determinar si los virus son seres vivos, o ser clasificados como otro grupo de microorganismos. Ante esta incertidumbre, muchos científicos han debatido sobre el tema. Un grupo de notables virólogos reconocidos, establecieron la premisa base para la determinación de un organismo vivo, la que consistía en buscar la existencia de un linaje continuo con una historia evolutiva permanente. Desde ese punto de vista, los virus se pueden considerar agentes infecciosos vivos, debido a que existen estudios donde se explica que el gen que codifica la ARN polimerasa, tiene vestigios altamente conservados entre virus de plantas y animales, lo que sugiere la existencia de ancestros virales que se presentaron antes de que ocurriera la separación de los hospedantes (Álvarez y col., 2017).

En este contexto, se puede definir a los virus como agentes infecciosos formados por uno o más ácidos nucleicos, protegidos por una cápside, compuesta por proteínas o lipoproteínas, cuya replicación depende de la maquinaria de síntesis de proteínas de sus hospedantes y solamente pueden producir progenie dentro de una célula huésped susceptible, cuya forma de transmisión puede ser horizontal o vertical (Marín Montoya y Gutiérrez Sánchez, 2016; Pagán y col., 2014).

Los virus pueden ser de ADN o ARN. Los virus con genomas de ARN de cadena simple constituyen más del 90% de todos los virus de plantas conocidos. Estos, durante la replicación en las células hospederas, generan formas replicativas de doble cadena (R, F) que consisten en moléculas de ARN completamente emparejadas con bases de ARN genómico e intermedios replicativos (Valverde y De La Torre-Almaraz, 2017).

3.3.2. Síntomas de virus de Solanáceas en Ecuador

En los principales valles de la provincia de Pichincha, se reportó que el *Potato Virus Y* (PVY) es el más frecuente y más común observado en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Este se asoció con síntomas severos de amarillamiento en las venas de las hojas, síntoma típico en esta especie. Además, mediante pruebas de ELISA, se ha confirmado la infección por el *Potato Leaf Roll Virus* (PLRV), *Tomato Ring Spot Virus* (ToRSV), y *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV) (Vizuete y col., 1990).



Dávila, (2016) reportó mediante la utilización de las técnicas de hibridación Dot Blot y RT-PCR, que el AMV, *Potato Virus X* (PVX) y PVY infectan al cultivo de pimiento (*Capsicum annuum*) en Imbabura Ecuador. Los síntomas más comunes del virus Y en pimiento son el aclaramiento sistémico de las venas, mosaico o moteado, color verde oscuro en las hojas y en algunas ocasiones se observa necrosis en el pecíolo, nervaduras, tallo y yemas apicales, defoliación y la muerte de la planta. El PVX, solamente se presenta con moteados de baja severidad, y el AMV se manifiesta con mosaicos y moteados de amarillos a blancos, y necrosis en las nervaduras abarcando gran parte de la superficie foliar. En pimiento, es común encontrarse complejos virales con estas tres especies de virus, especialmente una interacción entre el PVX y PVY.

En papa, las principales infecciones virales reportadas en Ecuador está el PLRV, la enfermedad se manifiesta con síntomas típicos de enrollamiento y erección de las hojas jóvenes; las hojas adultas se vuelven coriáceas, y cambian a un color claro. Los Virus PVX y PVY, en combinación ocasiona rugosidad y necrosis. El PVX, no induce síntomas en el follaje, solo se manifiesta en la reducción del vigor de la planta. El PVY, se manifiesta con moteados en los foliolos y necrosis en la nervadura del envés de la hoja. El moteado, usualmente no se manifiesta a temperaturas mínimas de 10°C o máximas de 25°C. Otro virus que no produce síntomas visibles es el *Potato virus S* (PVS), sin embargo, en plantas con un bajo nivel de nutrición, suele manifestarse con rugosidad en las hojas, enanismo y distanciamiento de brotes de yemas laterales (Mora, 1986). Otros virus reportados en la sierra andina según Mora (1986) está el *Andean Potato Latent Virus* (APLV), *Andean Potato Mottle Virus* (APMV), y el *Potato Yellow Vein Virus* (PYVV).

3.3.3. Síntomas de virus en naranjilla en Ecuador

Green y col., (2018) reportaron en el cultivar híbrido Puyo la primera especie de virus en naranjilla ubicada en la familia Tymoviridae, a la que denominaron como “*Naranjilla chlorotic mosaic virus*” (NarCMV). El virus produjo mosaicos, retraso en el crecimiento, manchas cloróticas en las hojas superiores, necrosis y senescencia, dejando una superficie de hoja perforada (Figura 1). Además, este virus infecta a otras especies de solanaceas como: *Nicotiana benthamiana*, berenjena, tomate de árbol, pimiento, con síntomas similares a los mostrados en naranjilla.

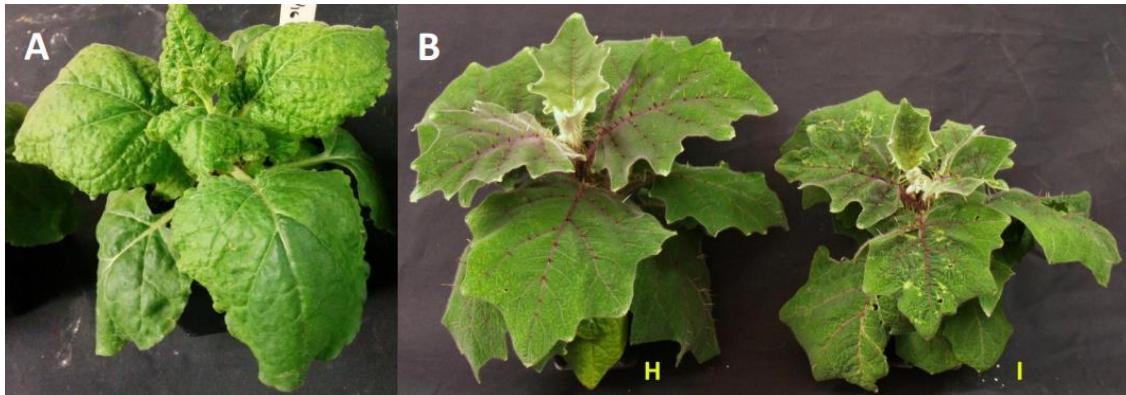


Figura 1. Síntomas del virus del mosaico clorótico de la naranjilla (NarCMV).

Nota: A) Características de los síntomas en *N. benthamiana*. B) Plantas de naranjilla, Variedad Puyo sana (H). Planta infectada con el NarCMV (I) (Green y col., 2018).

Cornejo y col., (2019) reportaron en el norte de Ecuador un virus que se presenta con mosaicos moderados en naranjilla, al cual lo denominaron como *Naranjilla mild mosaic virus*” (NarMMV). Además, se encontró que este virus infecta al tomate de árbol de forma severa, en el cual se presentó con moteados intensos, necrosis de los ápices y defoliación de los brotes emergentes. Antes del reporte de los virus mencionados anteriormente, en Ecuador se informaba 2 enfermedades de origen viral denominadas como Virus del mosaico rugoso y Virus del amarillamiento, que, hasta la actualidad, se desconoce el agente causal (Revelo y col., 2010).

3.3.4. Interacción virus- Solanáceas

Las plantas han evolucionado creando mecanismos para protegerse de parásitos (plantas parásitas, insectos y algunos animales invertebrados) y agentes patogénicos, entre los cuales se incluyen virus, viroides, bacterias, fitoplasmas, hongos y nematodos (Stange, 2006).

Los virus han evolucionado siendo capaces de evadir las barreras defensivas complejas de las plantas huésped. En respuesta, las plantas desarrollaron un tipo de defensa extrema descrita como silenciamiento génico del ARN viral. Este silenciamiento empieza con el reconocimiento de la cadena bicanalicular formada con la hebra positiva y negativa de ARN viral, ésta estructura se genera en la etapa intermedia durante la replicación del virus de ARN de hebra positiva en la planta. Como consecuencia, se desencadena un complejo multicomponente en el que se incluye la RpRd viral, ARN helicasa y la DICER/RISC, las cuales se encargan de identificar y degradar al ARN en pequeños fragmentos de 21-27 nucleótidos (ARNi). Estas moléculas son la señal móvil



encargada de amplificar el silenciamiento al resto de la planta generando una respuesta de HR en el sitio de infección (MLotshwa y col., 2002; Hammond y col., 2001; Hamilton y Baulcombe, 1999 citados en Stange, 2006).

La mayoría de los virus de las plantas tiene genomas de ARN, y las estructuras secundarias de doble cadena pueden accionar el silenciamiento del genoma viral en el hospedante, y prevenir la diseminación viral sistémica. Los efectores de la virulencia viral se pueden considerar los encargados de suprimir la respuesta silenciadora del ARN del hospedante. Se han identificado supresores en muchos virus de las plantas, y las funciones moleculares de varios de ellos han sido caracterizadas detalladamente (Chisholm y col., 2006).

Estudios han determinado que diversos supresores interfieren con los componentes únicos de la maquinaria silenciadora del hospedante, lo que sugiere que muchos virus desarrollaron independientemente los medios para suprimir el silenciamiento. Naturalmente, las plantas utilizan un segundo mecanismo de defensa para reconocer y para restringir el movimiento del virus. Las proteínas R específicas reconocen componentes virales de cualquier supresor y lo silencian; además pueden reconocer otras proteínas que se acumulen como resultado de la replicación viral (Stange, 2006).

3.4. Retro-transcripción (Transcripción reversa)

RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa), es un método copiado de los retro virus utilizada para la detección y cuantificación de la expresión de ARNm. En biología molecular, los ensayos basados en RT-PCR, son el método más común para caracterizar, diagnosticar o confirmar patrones de expresión génica y comparar niveles de ARNm en diferentes poblaciones de muestras, o agentes infecciosos (Orlando y col., 1998; Hierro y col., 2006).

Es una herramienta lo suficientemente sensible como para permitir la cuantificación de ARN de una sola célula. A menudo, la RT-PCR o retro transcripción puede ser realizada de 2 formas:

En la primera el ARN se transcribe de forma inversa en ADN complementario (ADNc) utilizando una enzima, la transcriptasa inversa. El ADNc resultante, se usa como plantillas para la



posterior amplificación por PCR usando cebadores específicos para uno o más genes (Orlando y col., 1998).

En la segunda, se puede llevar a cabo como RT-PCR de un solo paso, en el que todos los componentes de la reacción se mezclan en un tubo antes del inicio de la reacción. La RT-PCR de un solo paso ofrece simplicidad y conveniencia y minimiza la posibilidad de contaminación, sin embargo, el ADNc resultante no puede usarse para detectar múltiples mensajes de una sola muestra de ARN como en la RT-PCR de dos pasos (Orlando y col., 1998).



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Tabla 1. *Materiales físicos, químicos y biológicos utilizados en el presente estudio*

Biológico	Físicos	De laboratorio
– Plantas de <i>S. quitoense</i> , <i>S. hirtum</i> y <i>S. sessiflorum</i> .	– Sustrato estéril – Fundas plásticas – Libreta de campo	– Vasos de precipitación – Erlenmeyer – Tubos de Eppendorf
– Muestras de hojas sintomáticas	– Rótulos de identificación – Cubas de hielo	– Puntas para micro pipeta – Pisetas – Pinzas – Gradillas
Equipos	Reactivos	Programas
– Cámara de flujo – Vórtex – Balanza analítica – Estufa – Incubadora – Refrigeradora – Centrifugadora – Termociclador – Cámara de electroforesis – Autoclave – Trans-luminador – Micropipetas	– Alcohol 70 y 90% – Agua sin ARNAsas – Isopropanol – Trizol – Tampón fosfato pH 7,2 (1.37M Cloruro de Sodio, 0.027M Cloruro de Potasio, y 0.119M Fosfato Buffer) Reactivos para RT-PCR – Agarosa, TAE – Carburo de silicio	– Software Excel – Infostat – R

Fuente: Autor

4.2. Métodos

4.2.1. *El área de estudio*

En diciembre de 2019, se realizó recorridos de reconocimiento de enfermedades virales en cultivos a campo abierto de naranjilla en 4 lotes comerciales del cantón Palanda-provincia de Zamora Chinchipe (Tabla 2). El cantón Palanda está ubicado a 1200 m.s.n.m., en el margen del río Mayo-Chinchipe. Goza de un clima eminentemente templado-húmedo, con inviernos prolongados y veranos reducidos. La temperatura oscila entre 18 y 24°C, con una humedad relativa entre 60 y 70% (POT, 2019).



Tabla 2. Coordenadas de las zonas de estudio

MUESTRA	LOTE	COORDENADA
Aislado 1	Valladolid	4° 35' 55,42'' S; 79° 7' 28,82'' W
Aislado 2	San Francisco del Vergel Miraflores	4° 40' 58,5'' S; 79° 2' 33,35'' W
Aislado 3	San Francisco del Vergel	4° 40' 40,61'' S; 79° 3' 5,18'' W
Aislado 4	Las Juntas	4° 31' 26,46'' S; 79° 7' 49,2'' W

Fuente: Autor

Los ensayos experimentales del presente estudio se realizaron en dos etapas: la etapa 1 se realizó en el laboratorio de biología de la Unidad Educativa San Francisco ubicado en Zamora-Zamora Chinchipe, la cual consistió en la siembra de las semillas de las especies en estudio para obtener las plantas sanas, mantenimiento de las mismas, mantenimiento de las muestras recolectadas, y finalmente la inoculación de los aislados virales; y la etapa 2 en el laboratorio de Biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Campus Yanuncay, la cual consistió en la extracción de ARN, aplicación de la técnica RT-PCR y la visualización de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.2. Manejo del experimento

4.2.2.1. Metodología para la investigación experimental del objetivo 1.

4.2.2.1.1. Recolección de muestras con síntomas de enfermedad viral.

En julio de 2020, se recolectaron submuestras de 1 a 2 hojas jóvenes con signo de enfermedad viral (mosaicos, deformación de las hojas, arrugamientos, clorosis interenal) en plantas de naranjilla híbrido puyo y variedad común, obteniendo entre 100 y 500 g de tejido por lote. Las submuestras recolectadas se mezclaron para obtener una sola muestra por lote. Para mantener las muestras viables con el fin de prever posibles deterioros de las muestras, se utilizó el criterio utilizado por Green y col., (2018) el cual consistió en realizar inoculaciones *in situ*, para lo cual se maceraron aproximadamente 5 g de tejido sintomático de cada lote en 50 mL de tampón fosfato pH 7,2 (1.37 M Cloruro de Sodio, 0.027 M Cloruro de Potasio, y 0.119 M Fosfato Buffer) y se inocularon en 4 diferentes plantas sanas de naranjilla variedad común que se disponía en el momento. La otra fracción de las muestras se rotularon y se sometieron a refrigeración a 4°C hasta la llegada al laboratorio de Biología de la Unidad Educativa San Francisco para utilizarla en re- inoculaciones.



4.2.2.1.2. Material vegetal.

Para la inoculación de los aislados virales, se utilizaron plantas de 4 meses de edad que se obtuvieron mediante la siembra de semillas almacenadas en el laboratorio de biología molecular provenientes de ensayos anteriores de las 3 especies en estudio. Las semillas fueron sembradas en bandejas de germinación con turba hasta tener una altura promedio de 5cm, luego se trasplantaron en sustrato estéril compuesto por 2 partes de limo, 1 parte de materia orgánica y 1 parte de abono orgánico. Cada planta utilizó 1 Kg de sustrato por funda de polietileno color negro de 10x15''.

4.2.2.1.3. Inoculación mecánica de los Aislados virales.

La inoculación mecánica de los aislados virales se dividió en 5 partes: La parte 1 correspondió a la inoculación del aislado viral extraído de muestras provenientes del lote de Valladolid, para lo cual se trituraron 5g de la muestra sintomática, en 50mL de tampón fosfato pH 7,2 10x (1.37M Cloruro de Sodio, 0.027M Cloruro de Potasio, y 0.119M Fosfato Buffer), se tamizó y se depositó en jeringas (Green y col., 2018; Cornejo y col., 2019) para posteriormente roscar 3 mL de la suspensión (3mL por planta) sobre la superficie de las hojas de plantas sanas de las 3 especies en estudio (2 a 3 hojas por planta), previamente frotadas con carburo de silicio con el fin de lesionar el tejido y generar puntos de inserción del aislado (Hull 2009 citado por Cornejo y col., 2019). La parte 2 correspondió a la inoculación con el aislado proveniente de San Francisco del Vergel Miraflores, la parte 3 a la inoculación con el aislado proveniente de San Francisco del Vergel, la parte 4 al aislado de las Juntas, en los cuales se repitió el mismo proceso que en la parte 1. En la parte 5 se indujo un “*mock*” con agua estéril en plantas sanas las cuales correspondieron al testigo. Las plantas se mantuvieron en el laboratorio de Biología de la Unidad Educativa San Francisco en condiciones semi-controladas con temperatura aproximada de 16°C mínima y máxima de 29°C, con un fotoperíodo aproximado de 12 horas día y 12 horas noche (Vaca y col., 1999).



Diseño experimental para el objetivo 1.

Para evaluar los síntomas causados por los aislados virales, se realizó un diseño completamente al azar cuya unidad experimental fue 1 planta. El ensayo contó con 5 tratamientos (4 inóculos diferentes y el testigo). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, por especie, teniendo un total de 45 plantas (Tabla 3).

Tabla 3. *Diseño experimental completamente al azar del estudio realizado*

<i>Especies</i>			
<i>S. quitoense</i>	<i>B1R1</i>	<i>B1R2</i>	<i>B1R3</i>
	<i>B2R1</i>	<i>B2R2</i>	<i>B2R3</i>
	<i>B3R1</i>	<i>B3R2</i>	<i>B3R3</i>
	<i>B4R1</i>	<i>B4R2</i>	<i>B4R3</i>
	<i>TR1</i>	<i>TR2</i>	<i>TR3</i>
<i>S. hirtum</i>	<i>B1R1</i>	<i>B1R2</i>	<i>B1R3</i>
	<i>B2R1</i>	<i>B2R2</i>	<i>B2R3</i>
	<i>B3R1</i>	<i>B3R2</i>	<i>B3R3</i>
	<i>B4R1</i>	<i>B4R2</i>	<i>B4R3</i>
	<i>TR1</i>	<i>TR2</i>	<i>TR3</i>
<i>S. sessiflorum</i>	<i>B1R1</i>	<i>B1R2</i>	<i>B1R3</i>
	<i>B2R1</i>	<i>B2R2</i>	<i>B2R3</i>
	<i>B3R1</i>	<i>B3R2</i>	<i>B3R3</i>
	<i>B4R1</i>	<i>B4R2</i>	<i>B4R3</i>
	<i>TR1</i>	<i>TR2</i>	<i>TR3</i>

Bulk (B) Repetición (R) Testigo (T)

Fuente: Autor

Se realizó la caracterización de los síntomas a partir de los 10 días posteriores a la inoculación (dpi) durante 6 semanas y se evaluó los síntomas mediante la utilización de dos variables: incidencia y severidad. La incidencia se midió en una sola ocasión a los 30 dpi y la severidad en 3 fechas cada 5 días (20, 25 y 30 dpi).

Los datos obtenidos correspondientes a la variable severidad, se sometieron a análisis de Normalidad y Homocedasticidad con los test de Shapiro-Wilks modificado y Levene respectivamente. Cumpliendo los supuestos, se realizó el análisis de varianzas (ANOVA) y una prueba de comparación de rango múltiple (Tukey 5%).



4.2.2.1.4. Variables evaluadas.

La variable incidencia se midió en proporción, para lo cual se utilizó la fórmula propuesta por Holguín Peña, (2004) modificada por Martínez, (2021).

$$\text{Incidencia (I)} = \frac{\text{No. plantas enfermas}}{\text{No. total plantas}}$$

La variable severidad, fue evaluada utilizando una escala propuesta por Pérez y col., (2016) adaptada al presente estudio, el cual consta de 5 parámetros (Tabla 4), refiriéndose al nivel de daño causado por los aislados virales de menor a mayor intensidad, siendo 1= plantas sin síntomas y 5 = plantas con síntomas intensos de virosis, por ende, plantas con mayor nivel de daño. En el parámetro 1 se consideró a las plantas que no presentaron síntomas ni daño aparente. En el parámetro 2 se consideró a las plantas que presentaron síntomas imperceptibles, mosaicos suaves en la zona de inoculación, hojas brillosas y arrugamientos suaves. En el parámetro 3 se consideró aquellas plantas que presentaron mosaicos leves en las zonas de inoculación, arrugamientos moderados en la zona de inoculación, hojas coriáceas, necrosis en la zona inoculada, base y ápice de las hojas color marrón. En el parámetro 4 se consideró a las plantas que presentaron mosaicos generalizados, arrugamientos intensos en las zonas de inoculación, hojas nuevas con arrugamientos leves, bordes de las hojas inoculadas necrosadas y clorosis intervenal intenso. Finalmente, el parámetro 5 se consideró aquellas plantas con mosaicos y moteados intensos, necrosis generalizada desde la zona de inoculación, hojas nuevas deformes con arrugamientos fuertes y senescencia de las hojas inoculadas.

Tabla 4. Escala para medir la severidad de síntomas de virus

Escala	Severidad de síntomas
1	Plantas asintomáticas
2	Plantas con ligeros síntomas de virosis
3	Plantas con síntomas regulares de virosis
4	Plantas con síntomas fuertes de virosis
5	Plantas con síntomas intensos de virosis

Fuente: Pérez y col., (2016)



4.2.2.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2.

4.2.2.2.1. Extracción de ARN total.

Preparación de las muestras y extracción de ARN total: Se escogieron un total de 6 plantas inoculadas con los aislados virales de las 4 localidades en estudio que aún presentaban síntomas perceptibles y se extrajeron muestras; cada muestra fue homogenizada y trituradas en reactivo TRIzol como lo recomienda los kits comerciales (Invitrogen™ Reactivo TRIzol™). Para ello, se utilizó 1 mL de reactivo TRI por cada 50 a 100 mg de tejido, se introdujo cada muestra en tubos de Eppendorf de 1 mL diferentes y se colocó 4 perlas de acero por tubo, luego se sometió a trituración en el equipo TissueLyser LT (QUIAGEN) por 10 minutos para romper y homogenizar el tejido y se siguió con el protocolo del fabricante, ver (Anexo1).

4.2.2.2.2. Retro- transcripción (RT), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en dos pasos siguiendo el protocolo del fabricante (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A partir del ARN total obtenido de cada una de las muestras, se sintetizó ADN complementario (ADNc) utilizando diferentes “primers” o cebadores de virus reportados anteriormente (Tabla 5) con el empleo de la enzima RT (Retro - transcriptasa). Para ello; se utilizó 2mM de cada cebador reverso (Tabla 5) hasta 1 μ L, 10 μ M de dNTPs mix cada uno hasta 1 μ L, 10pg - 5 μ g de ARN total, agua tratada con DEPC hasta 13 μ L, buffer SSIV 5x, 100mM de DTT, inhibidor de ribonucleasas y 200 U de la enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las reacciones se incubaron a 65°C por 5 min para desalinear el ARN, luego la hibridación se hizo incubando a 55°C por 10 min y finalmente se desactivó la enzima a 80°C por 10 min, (Anexo 2).



Tabla 5. Cebadores específicos utilizados para evaluar la presencia de virus en muestras de tejido de naranjilla con síntomas de virosis en Palanda

Cultivo	Patógeno	Cebador	Sentido	Secuencia	Referencia
Naranjilla	NarCMV	tymo1294F	F	GAACGTATCTTGGCTCTCACCC	Green y col., (2018)
		tymo2278R	R	CAGCTGACATTGGAAATAGTCGG	
Tomate	TSWV	TSWVR	F	5'-GCCATTGTTCTCCGGAAGATTAG-	Fuerte y col., (2011)
		TSWVF	R	3'5'-CAACCCTAGTTAATTCTGTTGGTG-3'	
Papa	PVY	PVYF	F	5'-ACGTCCAAAATGAGAATGCC-3'	Nie y Singh, (2001)
		PVYR	R	5'-TGGTGTTCGTGAGACCT-3'	
Papa	PLRV	PLRVF	F	5'-CGCGCTAACAGAGTTAGCC-3'	Jaramillo, (2011)
		PLRVR	R	5'- GCAATGGGGTCCAACCTCAAACCAT-3'	
Alfalfa	AMV	AMVF2	F	5'-ATCATGAGTTCTTCACAAAAGAA-3'	Xu, H., y Nie, J., (2006)
		AMVR2	R	5'-TCAATGACGATCAAGATCGTC-3'	
Cucurbitác ea	CMV	CMV1RP_F	F	5'-CGTCCACTGACATGATTGTTACC-3	Gallo y col., (2018)
		CMV1RP_R	R	5'-CTCCACGACTGACCATTAGC-3''	
Astromelia	ANSV	Tospo_S_F	F	5'-CAGAACAGGCTGCATTAAATTCC-	Gallo y col., (2018)
		Tospo_S_R	R	3' 5'-CAACGCTCCTTAGCATTAGG-3'	
Papa	PYVV	PYVV_F_CP	F	5'-TCAGGTTAGAGCAGACAGAGG-3'	Álvarez – Yepes y col., (2017)
		PYVV_R_CP	R	5'-AGTTGCTGCATTCTAACAGGG-3'	

Fuente: Autor

La PCR se realizó en volumen total de 25 µL (para cada PRIMER), en tubos Eppendorf de 200µL que contenía: 1 U de la enzima Taq DNA polymerase (INVITROGEN), 1X de buffer, 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de los cuatro dNTPs y 0,2 µM de los cebadores específicos para cada virus (Tablas 4) (Álvarez – Yepes y col., 2017). La amplificación se realizó en un termociclador T3 (Eppendorf Mastercycler NexusGSX1); los programas para PCR utilizados dependieron de cada cebador y se presentan en el Anexo 3. La presencia de amplicones (conjunto de moléculas de ADN idénticas resultado de una PCR) se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0,5% y tinción con bromuro de etidio, utilizando un visualizador de luz ultravioleta BIO RAD Analyze transilluminator (Biometra, Goettingen, Alemania) (Gallo y col., 2018) y su tamaño fue verificado por comparación con el marcador de peso molecular DNA ladder 1kb (Promega).



5. RESULTADOS

Los síntomas en *S. quitoense* fueron incrementando su severidad post inoculación, mientras que en algunas plantas de las especies silvestres (*S. sessiflorum* y *S. hirtum*) los síntomas fueron disminuyendo hasta tornarse imperceptibles. Los síntomas descritos en el siguiente apartado, corresponden a las observaciones realizadas en el presente estudio, en el cual se consideran síntomas sutiles que no se observaron en las plantas muestreadas en campo.

5.1. Caracterización de los síntomas inducidos por los aislados virales en las 3 especies de la sección Lasiocarpa

5.1.1. Características asociadas a infección viral en *S. quitoense*

Las plantas de naranjilla inoculadas con el aislado proveniente de Valladolid y las Juntas, presentaron un patrón similar a los síntomas observados en campo en estos dos lotes. Los síntomas característicos fueron diferentes de acuerdo al tiempo post inoculación (Figura 2), a los 15 días posteriores a la inoculación (dpi) en las zonas inoculadas se formaron anillos cloróticos, que después se extendieron por todo el limbo. Finalmente se necrosaron y cayeron, dejando una superficie de hoja perforada a los 30 dpi. Los bordes de la hoja tomaron un color morado y luego marrón para posteriormente en algunas hojas enrollarse hacia arriba y en otras hacia abajo. Las venas principales cambiaron de color morado a amarillo y tuvieron una apariencia corchosa.

Las plantas inoculadas con el aislado proveniente de san Francisco del Vergel Miraflores, presentaron mosaicos leves en la zona de inoculación y a la vez arrugamientos moderados, además, la base y ápice de las hojas se tornaron color marrón y se necrosaron (Figura 2). Algunas hojas superiores se ondularon hacia arriba y otras se encresparon los ángulos de inserción. Las hojas jóvenes no inoculadas de algunas plantas, presentaron un color azulado y arrugamientos leves.

En cuanto a los síntomas inducidos por el aislado proveniente de San Francisco del Vergel, a los 15 dpi se observó una coloración morada intensa, coriácea, empezando en la base de las hojas para posterior translocarse los síntomas a los bordes y finalizar en senescencia a los 40 dpi (Figura 2). Una característica peculiar de ese aislado, es que a los 30 dpi formaron mapas amarillos separados por las venas secundarias que se extendían en forma de “v” separadas por las venas principales. Estas últimas, se iban decolorando hasta tomar tonos amarillos y beige.

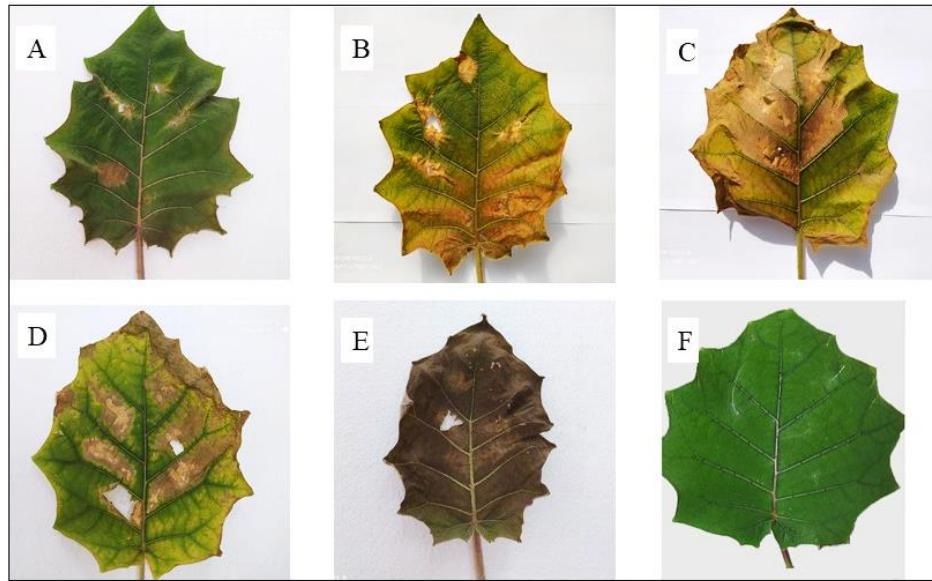


Figura 2. Síntomas inducidos por aislados virales de naranjilla en plantas de *S. quitoense*.

Nota: (A) Arrugamientos moderados. (B) Anillos cloróticos y clorosis intervenal. (C) Clorosis y enrollamiento de la hoja. (D) Mosaicos. (E) Necrosamiento de tejido del ápice de los brotes nuevos. (F). Planta testigo sin síntomas.

Fuente: Autor

5.1.2. Características asociadas a infección viral en *S. sessiflorum*

El arrugamiento de las hojas se pudo observar en todas las plantas inoculadas de manera leve en los primeros días de inoculación, sin embargo; las plantas inoculadas con el aislado proveniente de Valladolid, a los 15 dpi empezaron a observarse anillos cloróticos y arrugamientos suaves en la zona de inoculación. En las hojas no inoculadas se presentaron mosaicos suaves casi imperceptibles a los 30 dpi (Figura 3). Las regiones de las hojas inoculadas se necrosaron y cayeron dejando la superficie perforada. Cabe recalcar que los síntomas ocasionados por todos los aislados, iban disminuyendo su severidad en esta especie hasta tornarse, en algunas plantas, imperceptibles a los 40 dpi, es decir, el daño no avanzó y las hojas nuevas no presentaron síntomas.

Las plantas inoculadas con el aislado proveniente de San Francisco del Vergel Miraflores; los síntomas fueron apareciendo en las hojas inoculadas de forma paulatina. A los 15 dpi presentaron mosaicos moderados, anillos necróticos y arrugamientos leves. A los 30 dpi se presentó un bronceado desde la mitad de la hoja hacia el borde y este se mantuvo hasta los 40 dpi.

El aislado proveniente de San Francisco del Vergel a los 15 dpi, generó arrugamientos intensos dirigidos hacia adentro, ondulando todo el borde de las hojas nuevas y formaron anillos cloróticos y necróticos en las hojas bajas. A los 30 dpi, el tejido necrótico cayo dejando el limbo perforado y a los 40 dpi, el arrugamiento se mantuvo, pero redujo su severidad y en las hojas que presentaban clorosis, la intensidad decreció hasta tornarse imperceptible (Figura 3).

Las plantas inoculadas con el aislado proveniente de las juntas, presentaron síntomas leves de arrugamientos y anillos cloróticos en la zona de inoculación que se mantuvieron en las hojas jóvenes hasta los 40 dpi, luego la nervadura central de las hojas viejas tomó un color blanco-amarillento y se cayeron.

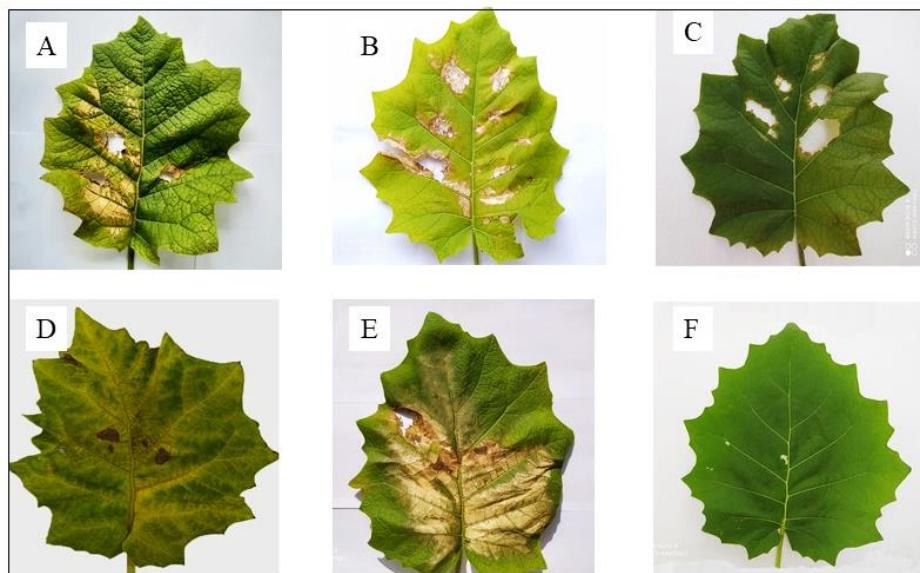


Figura 3. Síntomas inducidos por aislados virales de naranjilla en plantas de *S. sessiflorum*.

Nota: (A) Hoja coriácea y brillosa. (B). Clorosis generalizada (C) Arrugamientos moderados y hoja perforada. (D) Clorosis intervenal. (E) Quemazón y necrosamiento de tejido medio de la hoja. (F). Planta testigo sin síntomas.

Fuente: Autor



5.1.3. Características asociadas a infección viral en *S. hirtum*

El aislado proveniente de Valladolid, permitió visualizar lesiones cloróticas que se mantuvieron en el borden de la zona de inoculación y posteriormente desencadenó una reacción de hipersensibilidad, necrosando el tejido y dejando el limbo perforado (Figura 4). A los 30 dpi también se observó arrugamientos leves que se dirigían hacia adentro de la hoja.

El aislado de San Francisco del Vergel Miraflores, presentó características diferentes, las hojas superiores inoculadas y no inoculadas, presentaron un color verde azulado brilloso, además; las hojas se enrollaron hacia adentro y la superficie del limbo se tornó rugosa.

En las plantas inoculadas con el aislado proveniente de San Francisco del Vergel, se pudo observar algunos cambios morfológicos moderados en las hojas inoculadas como; arrugamientos, anillos cloróticos y tejido color marrón alrededor del anillo casi imperceptibles a los 15 dpi y a los 30 dpi se pudo observar arrugamientos intensos en las hojas nuevas y solamente una clorosis leve en la zona de inoculación (Figura 4). La clorosis no se extendió a todas las hojas y el arrugamiento se mantuvo hasta la senescencia de las hojas a los 40 dpi.

En cuanto al aislado proveniente de las Juntas, las plantas inoculadas con este aislado exhibieron anillos cloróticos y arrugamientos moderados en las zonas de inoculación, estos se mantuvieron latentes hasta los 30 dpi, luego fueron desapareciendo paulatinamente hasta la senescencia de las hojas a los 40 dpi (Figura 4).

Las 3 especies en estudio presentaron patrones comunes en la sintomatología como: anillos cloróticos y necróticos, clorosis intervenal, moteados, necrosis de brotes nuevos, tejido coriáceo amarillamiento de las venas y quemazón de las hojas.

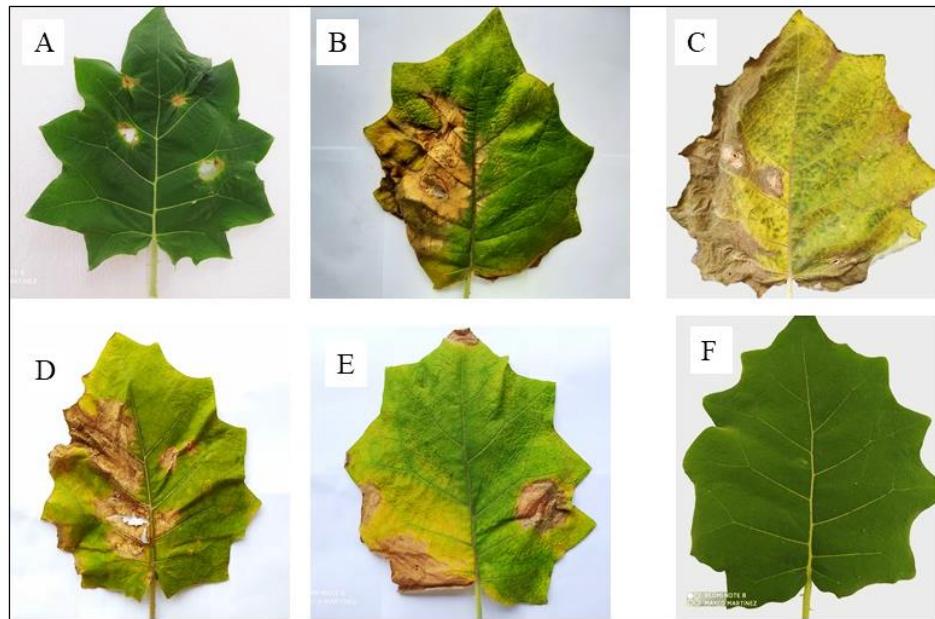


Figura 4. Síntomas inducidos por aislados virales de naranjilla en plantas de *S. hirtum*.

Nota: (A) Arrugamientos moderados. (B) Quemazón y necrosamiento de tejido. (C) Moteados y necrosis en los bordes de la hoja. (D) Clorosis generalizada. (E) Anillos necróticos. (F). Planta testigo sin síntomas.

Fuente: Autor

5.1.4. Evaluación de la incidencia de virosis en función de los síntomas externos ocasionada por los aislados virales en las 3 especies de la sección Lasiocarpa

5.1.4.1. Incidencia en *S. quitoense*.

Las observaciones realizadas en cuanto a la Incidencia a los 30 días posteriores a la inoculación (dpi), en *S. quitoense* 12 de 15 plantas (12/15) presentaron sintomatología típica de virus; 3/3 inoculadas con aislados virales provenientes de Valladolid (A1), 3/3 con el aislado de San Francisco del Vergel Miraflores (A2), 3/3 con el aislado de San francisco del Vergel (A3) y 3/3 con el de las Juntas (A4). 0/3 plantas correspondieron al testigo, las cuales no presentaron síntomas (Tabla 6).



Tabla 6. Incidencia de síntomas en 3 especies de la sección *lasiocarpa* (*S. quitoense*, *S. sessiflorum* y *S. hirtum*). Número de plantas infectadas / número total de plantas

AISLADO	INCIDENCIA		
	<i>S. quitoense</i>	<i>S. sessiflorum</i>	<i>S. hirtum</i>
A 1	3/3	3/3	3/3
A 2	3/3	3/3	3/3
A 3	3/3	2/3	3/3
A 4	3/3	2/3	2/3
Testigo	0/3	0/3	0/3
	12/15	10/15	11/15

Fuente: Autor

5.1.4.2. Incidencia en *S. sessiflorum*.

En *S. sessiflorum* los aislados provenientes de Valladolid y San Francisco del Vergel Miraflores tuvieron una incidencia de 3/3 y los aislados de San Francisco del Vergel y las Juntas tuvieron una incidencia de 2/3, el testigo no presento síntomas por ende no hubo incidencia (Tabla 6).

5.1.4.3. Incidencia en *S. hirtum*.

En *S. hirtum*, el aislado que tuvo menos incidencia fue el proveniente de las Juntas infectando 2/3, al igual que las especies anteriores, en el testigo no hubo presencia de síntomas, por ende, la incidencia fue 0/3 (Tabla 6). Tanto en *S. sessiflorum* y *S. hirtum*, existieron plantas que presentaron características prominentes de una infección viral entre los 20-30 dpi, pero, sus síntomas se tornaron imperceptibles a los 40 dpi. Bajo lo referido anteriormente, dichas plantas se tomaron como positivas para una infección viral.

5.1.5. Evaluación de la severidad ocasionada por aislados virales en función de los síntomas externos en las 3 especies de la sección *Lasiocarpa*

Al analizar los datos de la severidad en base a los síntomas externos causados por los aislados virales para examinar cuál de estos fue más severo en cada una de las especies en estudio, se realizó pruebas de normalidad y homocedasticidad, las cuales cumplieron con los supuestos establecidos con un *p*-valor > 0.05, es decir, nuestros datos tuvieron una distribución normal y homogeneidad de varianza (Tabla 7).



Tabla 7. Pruebas de normalidad, homocedasticidad de la severidad causada por los aislados virales en *S. quitoense*, *S. sessiflorum* y *S. hirtum*

Especie	Normalidad		Homocedasticidad
	W*	Shapiro-Wilks	
<i>S. quitoense</i>	0,95	0,7311	0,0903
<i>S. sessiflorum</i>	0,94	0,5831	0,0763
<i>S. hirtum</i>	0,93	0,4341	0,1126

Fuente: Autor.

5.1.5.1. Severidad de síntomas en *S. quitoense*.

Al cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para examinar si hubo diferencias en el nivel de severidad entre aislados (tratamientos). Los datos mostraron diferencia estadística significativa (p -valor < 0.05) (Tabla 8). Lo cual demuestra que si hubo diferencia en el nivel de severidad de los tratamientos en esta especie.

Tabla 8. Análisis de varianza de la severidad causada por los aislados virales en *S. quitoense*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Tratamientos	157,73	4	39,43	9,39	0,002
Error	42	10	4,2		
Total	199,73	14			

Fuente: Autor.

Para analizar cuál de los aislados fue más severo, se realizó la prueba de Tukey la cual dio como efecto 2 rangos; **a** para el inóculo con agua estéril (testigo) y **b** para el inóculo con aislados virales. Esto quiere decir que hubo diferencia estadística significativa del testigo respecto a los aislados (Tukey $p < 0.05$), pero no hubo diferencia estadística significativa entre aislados (Tukey $p > 0.05$). En base a lo mencionado anteriormente, los aislados provenientes de San Francisco del Vergel Miraflores (A2) y las juntas (A4), causaron el mismo nivel de daño en relación a los aislados de Valladolid (A1) y San Francisco del Vergel (A3), mientras que el testigo no indujo síntomas, por lo tanto, la severidad fue nula (Figura 5).

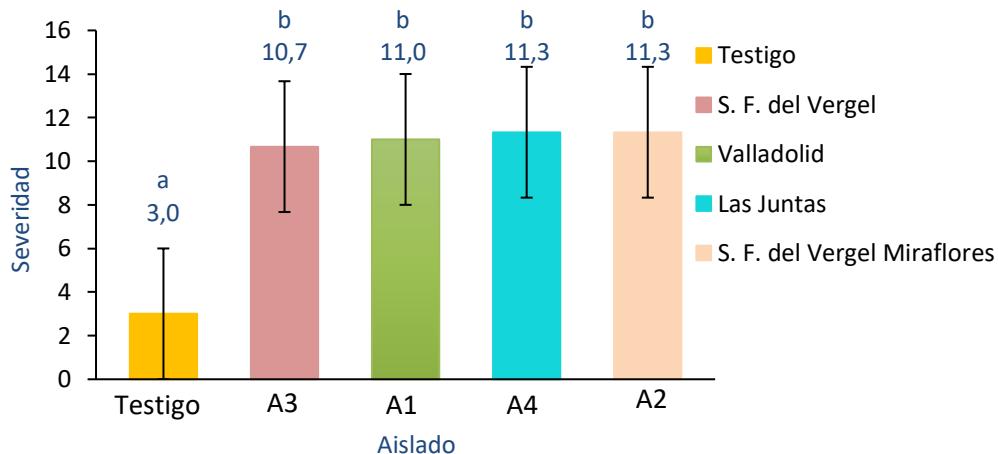


Figura 5. Severidad de los aislados virales en *S. quitoense*.

5.1.5.2. Severidad de síntomas en *S. sessiflorum*.

El análisis de varianza de la severidad causada por los aislados virales en *S. sessiflorum*, dio significativa con un $p<0.05$. Lo que sugiere que hubo una diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza de la severidad causada por aislados virales en *S. sessiflorum*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Tratamientos	35,73	4	8,93	14,89	0,0003
Error	6	10	0,6		
Total	41,73	14			

Fuente: Autor.

Al analizar el nivel de daño de los aislados virales en esta especie, la prueba de Tukey arrojó dos rangos; **a** para el inóculo con agua estéril (testigo) y **b** para el inóculo con aislados virales. Esto sugiere que hubo diferencia estadística significativa del testigo respecto a los aislados (Tukey $p<0.05$), pero no hubo diferencia estadística significativa entre aislados (Tukey $p>0.05$).

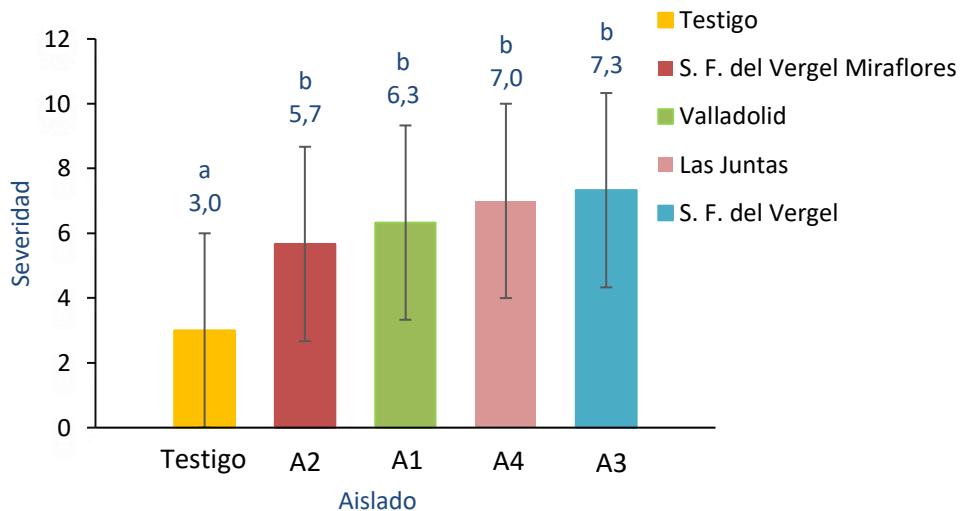


Figura 6. Severidad de los aislados virales en *S. sessiflorum*.

5.1.5.3. Severidad de síntomas en *S. hirtum*.

En *S. hirtum* se dio un panorama similar al de las especies mencionadas anteriormente. Al encontrar el análisis de varianza significativo (Tabla 10), se realizó la prueba de comparación de medias (Tukey) para analizar cuál de los aislados (tratamientos) fue más severo en esta especie.

Tabla 10. Análisis de varianza de la severidad causada por los aislados virales en *S. hirtum*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Tratamientos	47,33	4	11,83	9,86	0,0017
Error	12	10	1,2		
Total	59,33	14			

Fuente: Autor.

La prueba de Tukey arrojó dos rangos; **a** para el inóculo con agua estéril (testigo) y **b** para el inóculo con aislados virales. Es decir, hubo diferencia estadística entre el testigo y los aislados virales (Tukey $p<0.05$), pero no hubo diferencia estadística significativa entre aislados (Tukey $p>0.05$) (Figura 7).

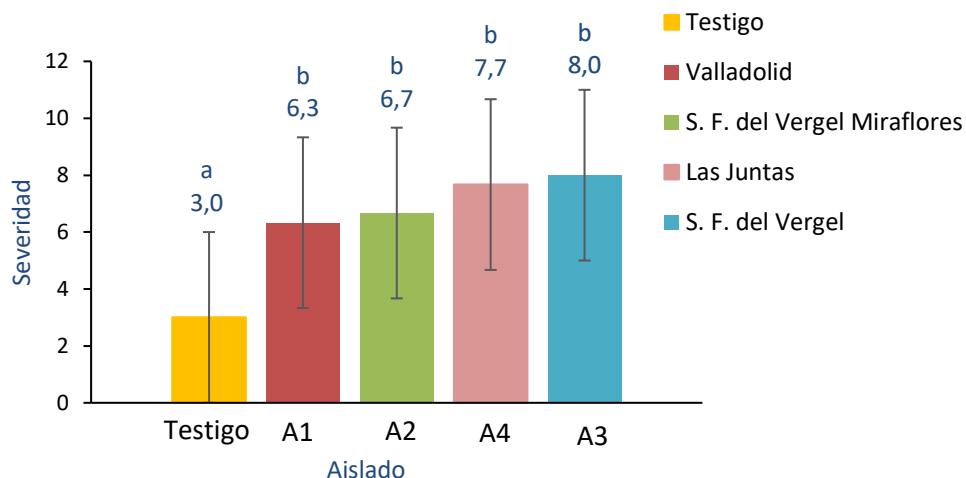


Figura 7. Severidad de los aislados virales en *S. hirtum*.

5.1.6. Evaluación de la severidad de los aislados virales entre especies de la sección *Lasiocarpa*

Con el fin de evaluar la respuesta de las 3 especies en estudio al nivel de daño causado por cada aislado viral, se realizaron pruebas normalidad, homocedasticidad y análisis de Varianza. Los datos evaluados cumplieron una distribución normal y homogeneidad de varianzas con un $p>0.05$ (Tabla 11).

Tabla 11. Pruebas de normalidad y homocedasticidad de la severidad causada por aislados virales entre especies de la sección *Lasiocarpa*

Aislado	Normalidad		Homocedasticidad
	W*	Shapiro-Wilks	
Valladolid	0,83	0,0658	0,441
S. F. del Vergel Miraflores	0,96	0,8308	0,1269
S. F. del Vergel	0,96	0,8665	0,1317
Las Juntas	0,94	0,7024	0,2729

Fuente: Autor.

5.1.6.1. Severidad ocasionada por el aislado de Valladolid en las 3 especies de la sección Lasiocarpa.

Cumplidos los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó un análisis de varianza, cuyos resultados fueron estadísticamente significativos ($p<0.05$), es decir, hubo diferencia en el nivel de daño entre especies (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de Valladolid en las 3 especies de la sección Lasiocarpa

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Especies	43,56	2	21,78	11,53	0,0088
Error	11,33	6	1,89		
Total	54,89	8			

Fuente: Autor.

Para diferenciar en que especie se manifestó mayor daño, se realizó la prueba de comparación de medias (Tukey 0,05) la cual, para el aislado de Valladolid, dio como resultado 2 rangos; **a** para *S. hirtum*, *S. sessiliflorum* y **b** para *S. quitoense*. Es decir, la especie que presentó mayor nivel de daño fue *S. quitoense*, mientras que *S. Sessiliflorum* y *S. hirtum*, tuvieron un nivel daño estadísticamente igual (Figura 8).

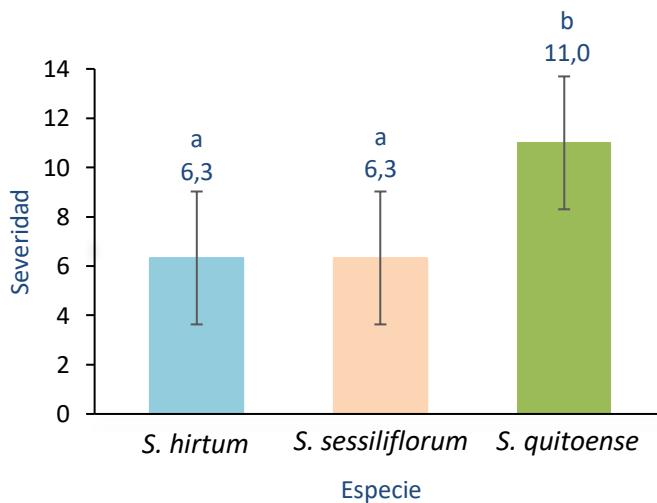


Figura 8. Severidad ocasionada por el aislado viral de Valladolid entre especies.



5.1.6.2. Severidad ocasionada por el aislado de S. F. del Vergel Miraflores en las 3 especies de la sección Lasiocarpa.

En cuanto al análisis de los niveles de severidad que ocasionó el aislado proveniente de San Francisco del Vergel Miraflores en las 3 especies en estudio, en la *Tabla 13* se muestra el análisis de varianza, la cual resultó estadísticamente significativa ($p<0.05$), lo cual sugiere que hubo diferencias en el nivel de daño entre especies.

Tabla 13. *Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de S. F. del Vergel Miraflores en las 3 especies de la sección Lasiocarpa*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Especies	54,89	2	27,44	6,86	0,0282
Error	24	6	4		
Total	78,89	8			

Fuente: Autor.

Así mismo, para identificar que especie presentó mayor daño se realizó la prueba de Tukey, la cual generó dos rangos como se puede observar en la *Figura 9*, de las cuales *S. sessiflorum* (**a**) se diferenció de *S. quitoense* (**b**), mientras que *S. hirtum* (**a, b**), compartió rango con *S. sessiflorum* y *S. quitoense*. Bajo lo referido anteriormente, *S. sessiflorum* presentó bajo nivel de daño y *S. quitoense* un nivel de daño superior, mientras que en *S. hirtum*, el nivel de daño fue estadísticamente similar a *S. quitoense* y *S. sessiflorum*.

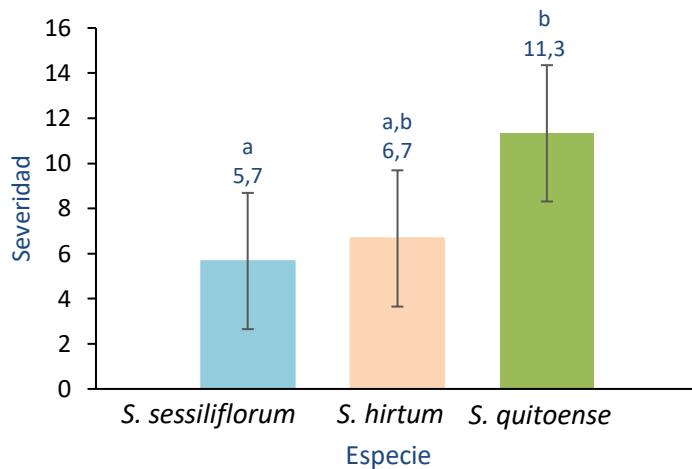


Figura 9. Severidad ocasionada por el aislado viral de San Francisco del Vergel Miraflores entre especies.

5.1.6.3. Severidad ocasionada por el aislado de Las Juntas en las 3 especies de la sección Lasiocarpa.

En la *Tabla 14* se puede apreciar el análisis de varianza la cual fue estadísticamente significativa, así mismo, muestra que en al menos una especie el nivel de daño fue diferente.

Tabla 14. Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de Las Juntas en las 3 especies de la sección Lasiocarpa

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Especies	32,67	2	16,33	7,35	0,0244
Error	13,33	6	2,22		
Total	46	8			

Fuente: Autor.

En los resultados que se muestra en la *Figura 10*, se puede apreciar una diferencia en el nivel de severidad en las 3 especies en estudio. Sin embargo, la prueba de Tukey solamente determinó dos rangos, *a* para *S. sessiliflorum* y *b* para *S. quitoense*, mientras que *S. hirtum* (*a, b*), compartió rango con *S. sessiliflorum* y *S. quitoense*. En tal sentido, podemos mencionar que la especie que presento menor daño fue *S. sessiliflorum*, y la que presentó un daño superior fue *S. quitoense*, mientras que *S. hirtum* mostró un nivel de daño intermedio entre *S. quitoense* y *S. sessiliflorum*.

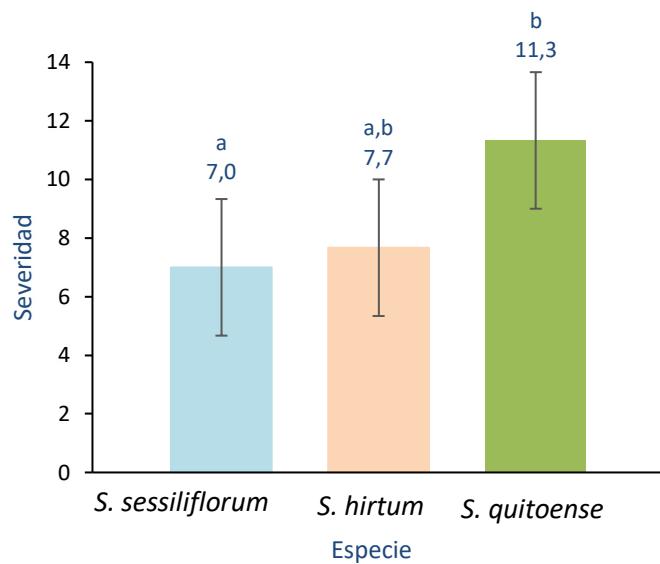


Figura 10. Severidad ocasionada por el aislado de Las Juntas entre especies.

5.1.6.4. Severidad ocasionada por el aislado de S. F. del Vergel en las 3 especies de la sección Lasiocarpa.

En el análisis del daño causado por el aislado de S. F. Francisco del Vergel, no se encontró diferencia estadística significativa en el análisis de varianza ($p>0.05$) como se muestra en la *Tabla 15*, lo cual sugiere que el nivel de severidad fue similar en las 3 especies en estudio.

Tabla 15. Análisis de varianza de la severidad inducida por el aislado de S. F. del Vergel en las 3 especies de la sección Lasiocarpa

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	p-valor
Especies	18,67	2	9,33	4,94	0,0539 _{NS}
Error	11,33	6	1,89		
Total	30	8			

Nota: NS= no significativo ($p>0.05$). Significativo en el análisis de varianza ($p<0.05$).

Fuente: Autor.

5.2. Identificación molecular de aislados virales por RT-PCR

En este trabajo, utilizando cebadores específicos de virus reportados anteriormente en solanaceas, se detectó la presencia del virus PYVV en muestras de *S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. sessiflorum* inoculadas con aislados provenientes de Valladolid, San Francisco del Vergel Miraflores y las Juntas, generando amplicones esperados de 495 pb (Figura 11). No se detectó la presencia de PYVV en el lote de San Francisco del Vergel.

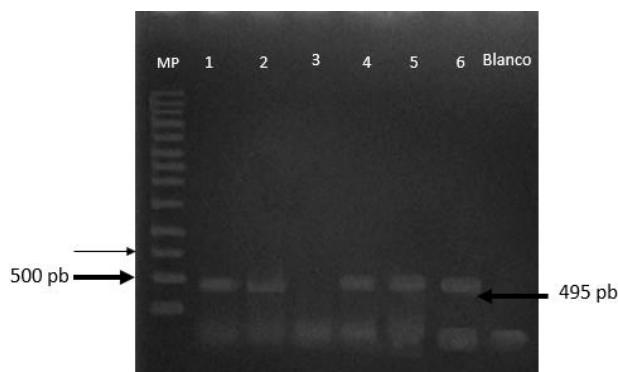


Figura 11. Detección de PYVV mediante RT-PCR usando Cebadores específicos (PYVV-F-CP y PYVV-R-CP).

Nota: La flecha de la izquierda indica el marcador de peso molecular y la flecha de la derecha, el producto PCR esperado (~495 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Promega), los números de izquierda a derecha indican; carril 1: Aislado de Valladolid extraído de *S. hirtum*; Carril 2: Aislado de S. F. del Vergel Miraflores extraído de *S. sessiflorum*; Carril 3: Aislado de S. F. del Vergel extraído de *S. quitoense*; Carril 4: Aislado de Las Juntas extraído de *S. hirtum*; Carril 5: aislado de Valladolid extraído de *S. sessiflorum* y Carril 6: Aislado de S. F. del Vergel Miraflores extraído de *S. sessiflorum*.

En los lotes de Valladolid, San Francisco del Vergel Miraflores, San Francisco del Vergel y las Juntas, se detectó la presencia del virus CMV en muestras de aislados virales de *S. quitoense*, *S. hirtum* y *Solanum sessiflorum*, generando amplicones de 750 pb (Figura 12). En 3 de los 4 lotes muestreados, se presentó una infección mixta entre CMV y PYVV.

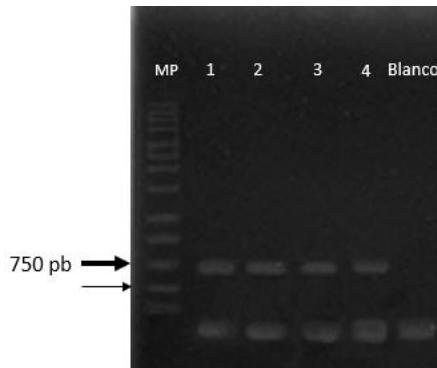


Figura 12. Detección de CMV mediante RT-PCR usando Cebadores específicos (CMV1RP-F y CMV1RP-R).

Nota: La flecha indica el producto de PCR (~750 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Promega). Los números de izquierda a derecha indican; carril 1: Aislado de Valladolid extraído de *S. sessiflorum*; Carril 2: Aislado de S. F. del Vergel Miraflores extraído de *S. sessiflorum*; Carril 3: Aislado de S. F. del Vergel extraído de *S. quitoense* y Carril 4: Aislado de Las Juntas extraído de *S. hirtum*.

Los síntomas inducidos por este complejo viral, dependió de la especie evaluada y del tiempo post inoculación. No obstante, se presentaron síntomas comunes en las 3 especies en estudio, los cuales consistieron en: anillos cloróticos y necróticos, arrugamientos, tejido coriáceo, necrosamiento de las bases de las hojas y brotes nuevos, clorosis intervenal y amarillamiento de las venas (Anexo 9).

Para el caso de NarCMV, los cebadores tymo1294F y tymo2278R no generaron amplicones en ninguna de las muestras evaluadas, descartando una posible infección de este virus en lotes comerciales de naranjilla en Palanda. Así mismo, los cebadores de los virus PLRV y TSWV, no generaron ningún amplicón, excluyendo su presencia en dichos lotes.

No se encontró en ninguna de las muestras analizadas la presencia de Potyvirus (PVY) ni de ANSV, que en infección mixta junto con CMV y PYVV, ocasionan daños graves en cultivos de naranjilla en Colombia. Este estudio reporta por primera vez una infección mixta entre (CMV y PYVV), además, en el Ecuador es el primer reporte de virus de otras especies que infectan a la naranjilla y a especies de la sección lasiocarpa (*S. sessiflorum* y *S. hirtum*).



6. DISCUSIÓN

Aunque en el mundo, los trabajos de virología en cultivos de naranjilla son muy reducidos, los pocos realizados han planteado la ocurrencia de complejos virales en este frutal, como lo sustenta Gallo y col., (2018) en Colombia. Esto coincide con los hallazgos en el presente estudio, en donde por medio de la técnica RT-PCR se detectó la presencia de una infección mixta entre CMV y PYVV. Sin embargo, los síntomas reportados por Gallo y col., (2018) no corresponden a los reportados en el presente estudio, esto debido probablemente, a que el complejo viral reportado por este autor, correspondió una infección mixta entre CMV, PYVV y ANSV. Los síntomas asociados al complejo viral de este autor, consistieron en deformación de brotes, mosaico y deformación de tejido foliar, moteados foliares, amarillamiento intervenal. No obstante, dichos síntomas comparten similitudes a los registrados en esta investigación.

La variedad de síntomas encontrados en el presente estudio, dificultó asociar a un agente causal de la sintomatología con alguno de los virus en particular por la sola observación, hipótesis inicialmente sustentada por la diversidad de síntomas presentes en cultivos de naranjilla en Colombia (Gallo y col., 2018) y en otros cultivos de solanaceas como tomate de árbol y papa (Zapata y col., 2011). Según Pérez y col., (2016), esto es debido a que dichos síntomas, van a depender de muchos factores como; la especie hospedera, factores climáticos, estado fenológico de la planta, como también por la época del año, nutrición de la planta, manejo, vectores, etc., que varían de región en región (Blancard, 1996 citado por Holguín Peña, R. J., 2004).

Por otro lado, al analizar la severidad de los aislados virales entre especies, los niveles de daño ocasionados fueron mayores para *S. quitoense* y *S. hirtum*, por lo contrario, los niveles de daño fueron menores para *S. sessiflorum*, hipótesis similar a lo que sugiere Betancourth y col., (2007), en donde considera a *S. sessiflorum* como una especie que presenta características de resistencia. Sin embargo, este mismo autor, menciona que *S. hirtum*, también muestra características de resistencia a enfermedades típicas de la naranjilla, por lo tanto, menciona que estas especies pueden ser tolerantes a enfermedades virales, y a futuro, podrían ser utilizados en programas de fitomejoramiento en donde se trate de obtener híbridos que supriman o toleren la manifestación de enfermedades virales, o como patrones en injertos de naranjilla común. No obstante, Green y col., (2018) sugiere que estas especies pueden ser reservorios naturales de virus nuevos o reemergentes, planteando una amenaza directa para la sostenibilidad del cultivo de



naranjilla común debido a la búsqueda continua de híbridos y variedades dotadas de características de producción óptimas que se ensayan en cruces interespecíficos con estas especies. Lo cual concuerda con el presente estudio, debido a que, en algunas plantas de las especies silvestres, a los 40 dpi, los síntomas manifestados inicialmente, tendieron a desaparecer.

La utilización de los cebadores CMV1RP-F y CMV1RP-R que amplifica la región que codifica la proteína (1a) responsable de la replicación viral, generó un amplicon de 750 pb aproximadamente, distinto de lo reportado por Gallo y col., (2018), en donde utilizando los mismos cebadores, determinó la presencia de CMV en aislados virales de muestras de naranjilla en Colombia, obteniendo amplicones de 920 pb. Sin embargo, la diferencia entre los tamaños del amplicon, según Thompson y col., (2015), puede ser explicado en vista de la muy alta tasa de diversidad de CMV como consecuencia de los altos niveles de mutación típica de los virus de ARN, como también de la frecuencia de eventos de recombinación homóloga y heteróloga de las especies de este virus y del reordenamiento del genoma entre fragmentos de las cepas de diferentes subgrupos de CMV y entre especies de cucumovirus.

Por otro lado, según Pérez y col., (2016), la distribución geográfica juega un rol fundamental en la evolución de los virus. La distancia geográfica existente entre las zonas donde se realizaron los aislamientos virales de los dos países, sugiere una gran diversidad de especies arvenses hospederas, como también de los insectos vectores. Aseveración sustentada por Thompson y col., (2015), ya que el CMV tiene posiblemente la mayor variedad de hospedadores de todos los virus con al menos 1241 especies susceptibles en 101 familias de plantas que incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, entre ellas las solanaceas. Ya que originalmente estos cebadores fueron diseñados para una cepa viral de Colombia, probablemente, nuestro hallazgo se trate de una nueva variante de este virus.

Por otro lado, con base en la utilización de los cebadores específicos PYVV-F-CP y PYVV-R-CP que amplifican la región de la proteína de la cápside (CP) de los crinivirus, se identificó molecularmente la presencia de PYVV. Los cebadores generaron amplicones esperados de 495 pb aproximadamente, similar a lo reportado por Álvarez – Yepes y col., (2017) en *Solanum phureja* y Gallo y col., (2018) en naranjilla. Este virus es reconocido como limitante de la circulación del floema por inducir amarillamientos de venas secundarias y terciarias, acompañada de coloración amarilla intensa en las hojas y es transmitido de forma natural por moscas blancas de la especie



Trialeurodes vaporariorum (Álvarez y col., 2017; Salazar y col., 2000), lo cual explica el amarillamiento de las venas principales, y la clorosis intervenal en el presente estudio. Además de la papa, su rango de hospedantes es amplio, infectando al tomate de mesa (*Lycopersicum esculentum*) y diversas arvenses como: *Catharanthus roseus*, *Heliotropis buphthalmoides*, *Malva sp.*, *Polygonum segetum*, *Tagetes sp.*, *Apium graveolens*, *Beta vulgaris*, *Rumex sp.*, entre otras (Salazar y col., 2000). Lo cual podría explicar la presencia de PYVV en naranjilla en Palanda, dado que la mosca blanca ha aumentado su incidencia en la región, siendo la posible conexión entre arvenses hospederas infectadas con virus y la naranjilla. Por otra parte, en este estudio se sugiere a la transmisión mecánica, como una vía favorable para inducir infección de este virus en plantas sanas. Argumento previamente cuestionado por Salazar y col., (2000), en el cual sugiere como único medio de diseminación del virus en papa y tomate, a la transmisión por semillas, injertos, y por vectores como la mosca blanca (*T. vaporariorum*).

La identidad molecular de los aislados virales provenientes de muestras de los 4 lotes (Valladolid, S. F. del Vergel Miraflores, S. F. del Vergel y Las Juntas) correspondió al virus CMV y juntamente se presentó una infección con el virus PYVV en los lotes de Valladolid, S. F. del Vergel Miraflores y Las Juntas. A pesar de que la identidad molecular de los aislados virales de la muestra proveniente del lote 3 (S.F. del Vergel) correspondió solamente al CMV, al analizar los síntomas causados por dicho aislado, los daños no se diferenciaron estadísticamente entre aislados y presentó síntomas similares al resto de aislados. Por lo tanto, abre un hilo de discusión en cuanto al antagonismo, sinergismo o neutralismo entre estos virus.

La infección de plantas con múltiples virus es un fenómeno común, que puede resultar o no en la interacción entre virus, en el neutralismo o alternativamente generar reacciones de antagonismo o sinergismo. En el sinergismo, la interacción resulta en el aumento de la severidad de los síntomas y en la acumulación de partículas de los grupos virales participantes y en el antagonismo, la infección o acumulación de uno de los virus es completa o parcialmente reducida por efecto de la presencia del otro y a menudo puede conducir al fenómeno de la protección cruzada (Matthews, 1993; Untiveros y col., 2007 citados por Zapata y col., 2011). Ya que la naturaleza de la interacción entre los diferentes virus detectados en esta investigación se desconoce, es necesario indagar a profundidad estudios que permitan determinar la posible



existencia de sinergismos, antagonismos o neutralismos entre dichos virus (PYVV, CMV); variantes de los subgrupos de CMV o entre especies de cucumovirus.

Según Revelo y col., (2010) se conocen 2 enfermedades de origen viral en naranjilla (Virus del mosaico rugoso y Virus del amarillamiento) que, hasta la actualidad, se desconoce la etiología y el agente causal de dichas patologías. No obstante, el presente estudio sugiere al complejo viral entre CMV y PYVV, responsable de dichas enfermedades por la similitud de síntomas descritos en este estudio.

Los hallazgos de estas dos especies de virus que afectan a los cultivos de naranjilla en nuestro país, llevan a plantear muchas preguntas sobre la biología, patogenicidad, mecanismos de transmisión, métodos específicos de detección y estrategias de manejo de estos problemas fitopatológicos, lo cual sugiere más estudios. Aunque inicialmente será fundamental evaluar los síntomas específicos que cada virus induce en plantas de naranjilla de las diferentes variedades cultivadas en Ecuador, también será fundamental evaluar su posible patogenicidad cruzada entre las solanáceas y otros cultivos que a menudo, son utilizados en asociación con la naranjilla en los Andes Ecuatorianos (ej. tomate de árbol, berenjena, etc.). Finalmente, será fundamental evaluar su posible transmisión por semilla sexual en naranjilla común, y por esquejes, chupones o injertos para los materiales híbridos que se cultivan en el país.



7. CONCLUSIONES

Del presente estudio se puede concluir lo siguiente:

- Se presentaron patrones comunes en los síntomas de los aislados virales como: anillos cloróticos y necróticos, arrugamientos, tejido coriáceo, necrosamiento de las bases de las hojas y brotes nuevos, clorosis intervenal y amarillamiento de las venas.
- La incidencia de virosis fue mayor en *S. quitoense* que en las especies silvestres (*S. sessiflorum*, *S. hirtum*) y los niveles de severidad de los aislados virales fueron similares entre sí.
- *S. sessiflorum* presentó menor daño en todos los aislados a diferencia de *S. quitoense* y *S. hirtum*. Y *S. quitoense* fue la especie con niveles de daño superior a las especies silvestres.
- Se identificó un complejo viral en 3 de 4 lotes estudiados (Valladolid, San Francisco del Vergel Miraflores y Las Juntas) entre *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Potato yellow veins virus* (PYVV), y en el lote de San Francisco del Vergel, solamente se observó la presencia de CMV.
- No se diferenció significativamente los síntomas entre los aislados virales, lo cual concuerda con la identificación molecular, ya que se encontraron dichos complejos virales en 3 lotes. Sin embargo, el aislado 3 (S. F. del Vergel), debió diferenciarse ya que la identidad molecular de dicho aislado fue solamente CMV, lo que probablemente se pueda explicar por la dominancia de algunos virus sobre otros, y posiblemente, sea este virus el dominante y por ende responsable de la sintomatología de todos los aislados.



8. RECOMENDACIONES

En base a los resultados de nuestro estudio se recomienda:

- Profundizar el estudio de las diferentes variables epidemiológicas involucradas en el establecimiento y expansión de este complejo viral en las regiones orientales del país.
- Realizar estudios a profundidad sobre los mecanismos de transmisión de cada uno de los virus (semillas, injertos, etc.) en la naranjilla.
- Evaluar la susceptibilidad de las variedades cultivadas de naranjilla disponibles en el mercado.
- Evaluar la presencia de hospedantes alternos de estos virus entre plantas arvenses y cultivos de importancia económica que comparten las zonas agroecológicas de la naranjilla.
- En vista de la dificultad de diagnosticar mediante la observación la presencia de determinado virus dada la ocurrencia de complejos virales, se recomienda evaluar la sintomatología que ocasiona CMV y PYVV individualmente en cultivos de naranjilla.
- Secuenciar los productos de PCR para determinar variabilidad de las cepas de los virus encontrados.



9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arias, M. L., Cano, C. I. M., Paz, O. A. D., y Giraldo, A. B. (2007). Variabilidad morfológica de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y especies relacionadas de la sección lasiocarpa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 60(2), 3939-3964.
- Álvarez, Daniela y Gutiérrez-Sánchez, Pablo y Marín, Mauricio. (2017). Secuenciación del genoma del *Potato yellow vein virus* (PYVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro*. 29.
- Betancourth, C., Zambrano, M.; Narváez, A. 2007. Reacción de diferentes genotipos de lulo (*Solanum quitoense* Lam) al ataque de *Fusarium oxysporum*. *Fitotecnia Colombiana*: Vol. 7 No. 1. 43-50p.
- Chisholm, S.T., S.K. Mahajan, S.A. Whitham, M.L. Yamamoto, and J.C. Carrington. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* RTM1 gene, which testigos restriction of long-distance movement of *Tobacco etch virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97:489-94.
- Cornejo-Franco, J. F., Álvarez-Quinto, R. A., Grinstead, S., Mollov, D., Karasev, A. V., Ochoa, J., & Quito-Ávila, D. F. (2019). A New Tymovirus Isolated from *Solanum quitoense*: Characterization and Prevalence in Two Solanaceous Crops in Ecuador. *Plant disease*, 103(9), 2246-2251.
- Dávila Aldas, W. D. (2016). *Detección y caracterización de tres aislados virales presentes en plantas de pimiento (Capsicum annuum) de Ecuador* (Tesis de Maestría). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia España.
- Fiallos, J. (2000). Naranjilla INIAP-Palora: Híbrido interespecífico de alto rendimiento. Palora, Ecuador: INIAP, Granja Experimental Palora. (*Boletín Divulgativo no. 276*).
- Fuerte, V. L. R., Zapata, M. M. J., Mora, L. E. L., Gutiérrez, P. A., & Montoya, M. M. (2011). Identificación serológica y molecular de virus del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en cultivos de Córdoba (Nariño, Colombia). *Revista Lasallista de Investigación*, 8(1), 50-60.
- Gallo, Y., Toro, L. F., Jaramillo, H., Gutiérrez, P. A., y Marín, M. (2018). Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum*



- quitoense) de Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2), 281-292.
- Green, J., D. Mollov, L. Tran, R. Álvarez-Quinto, J. Ochoa, D. Quito-Ávila y A. Karasev. (2018). Characterization of a new tymovirus causing stunting and chlorotic mosaic in naranjilla (*Solanum quitoense*). *Plant Dis.* 102(5), 911-918. Doi: 10.1094/PDIS-10-17-1534-RE
- Heiser, C. B. (1972) "The Relationships of the Naranjilla, *Solanum quitoense*", *Biotropica*, 4(2), 77-84.
- Hierro N, Esteve-Zarzoso B, González A, Mas A, Guillamón J., M. (2006). "Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine". *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (11) :7148–55. Doi:10.1128/AEM.00388-06. PMC 1636171. PMID 17088381.
- Holguín Peña, R. J. (2004). *Geminivirus en tomate en baja california sur: identificación, caracterización y epidemiología* (Tesis Doctoral). Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. Programa. Retrieved from:https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/456/1/holguin_r.pdf.
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones – Pro-Ecuador. (2014). *Ánalisis sectorial de frutas exóticas*. Recuperado de: <https://issuu.com/pro-ecuador/docs/analisissectorialfrutas>.
- Lobo, M. (2000). "Papel de la variabilidad genética en el desarrollo de los frutales andinos como alternativa productiva", Memorias. *3er Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado, Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales*. Manizales, Colombia, p. 36
- Marín Montoya, M., y Gutiérrez Sánchez, P. A. (2016). *Principios de virología molecular de plantas tropicales*. (Corpoica, Ed.) (Primera Ed). Mosquera- Colombia. Retrieved from www.corpoica.org.co.
- Mora C., E. (1986). Principales enfermedades virosas que afectan a la papa en el Ecuador y como detectarlas. *En Quinto Curso sobre Producción de Semillas de Papa a Partir de Cultivo de Tejidos, Mejoramiento y Tecnología del Cultivo* (pp. 87-97). Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina.



- Nie, X., & Singh, R. P. (2001). A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *Journal of virological Methods*, 91(1), 37-49.
- Ochoa L., J., Galarza, V., y Insuasti, M.L. (2000). Diagnóstico de las enfermedades de la naranjilla en el valle del Pastaza en Ecuador. (Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Azuay). *En Informe anual 2000 (pp. 17-22)*. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento Nacional de Protección Vegetal.
- Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. (1998). Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:255-69.
- Pagán I, Montes N, Milgroom MG, García-Arenal, F. (2014). Vertical Transmission Selects for Reduced Virulence in a Plant Virus and for Increased Resistance in the Host. *PLoS Pathog* 10(7): e1004293. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004293>.
- Pazmiño, J. (2008). *Comportamiento de la sección Lasiocarpa del género Solanum a Phytophthora infestans en Ecuador*. (Tesis pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Pérez Moreno, L., Niño Mendoza, G. H., Mendoza Celedón, B., León Galván, M., Robles Hernández, L., & González Franco, A. C. (2016). Incidencia, severidad y detección de virus fitopatógenos en lechuga, en el estado de Querétaro, México. *Acta universitaria*, 26(2), 3-11.
- Revelo, J., Viteri, P., Vásquez, W., Valverde, F., León, J. y Gallegos, P. (2010). Manual del Cultivo Ecológico de la Naranjilla. Quito, Ecuador. (pp. 11-14). Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Fruticultura. (*Manual Técnico no. 77*).
- Revelo, J y Sandoval, P. (2003). Factores que afectan la producción y productividad de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la región amazónica del Ecuador. Quito, EC. 108p.
- Salazar, L., G. Muller, M. Querci, J. Zapata y Owens, R. (2000). *Potato yellow vein virus*: its host range, distribution in South America and identification as a Crinivirus transmitted by



Trialeurodes vaporariorum. Ann. Appl. Biol. 137(1), 7-19. Doi: 10.1111/j.1744- 7348. 2000.tb00052. x.

- Silva, W., Gómez, P., Viera, W., Sotomayor, A., Viteri D., P., y Ron, L. (2016). Selección de líneas promisorias de naranjilla para mejorar la calidad de la fruta. *Revista Científica Ecuatoriana*, 3, 23-30.
- Soria, J. (1997). Mejoramiento genético de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) mediante cruzamientos interespecíficos. En uso y manejo de recurso Vegetales. *Memorias del segundo simposio ecuatoriano de etno-botánica y botánica*, Quito, Ecuador.
- Stange, C. (2006). Interacción planta-virus durante el proceso infectivo, 33(1), 3–21.
- Vaca, J., Torres, I., Peñaranda, J., y Aristizábal, F. (1999). Identificación de *Potyvirus* presentes en plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(2), 9-15. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30046/30245>.
- Vásquez C., W., Viteri D., P., Martínez, A., Villares, M., Ayala, G., y Jácome, R. (2011). Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.): Tecnologías para mejorar la productividad y la calidad de la fruta. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Fruticultura. (*Plegable no. 275*).
- Valverde RA and De La Torre-Almaraz R. (2017). Extraction and purification of large dsRNAs from virus infected plants and fungi: Applications in virus detection and identification. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:80-105. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-9.
- Viteri D., P., Vásquez C., W., León F., J., Viera, W., Posso M., M., Hinojosa A., M., Ochoa L., J. (2009). INIAP Quitoense 2009: Naranjilla de jugo (*Solanum quitoense* Lam.) injerta en patrones de solanaceas silvestres resistentes a *Fusarium oxysporum* y a *Meloidogyne incognita*. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura. (*Boletín Divulgativo no. 354*).
- Vizuete, B., Insuasti, M. L., Ochoa, J., y Ellis, M. (1990). Biological and serological characterization of tree tomato virus diseases in Ecuador. *INIAP, Ohio State University*.



- Xu, H., & Nie, J. (2006). Identification, Characterization, and Molecular Detection of *Alfalfa mosaic virus* in Potato. *Phytopathology*, 96(11), 1237–1242. doi:10.1094/phyto-96-1237
- Thompson, J. R., Langenhan, J. L., Fuchs, M., & Perry, K. L. (2015). Genotyping of *Cucumber mosaic virus* isolates in western New York State during epidemic years. *Virus Research*, 210, 169–177. doi: 10.1016/j.virusres.2015.07.028
- Zapata, M. J., Sánchez, P. A. G., Torres, J. M. C., Jaimes, E. P. G., & Montoya, M. M. (2011). Detección de los virus *AMV*, *CMV* y *PLRV* en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en Antioquia, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(1), 5831-5844.



10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ARN con Reactivo TRIzol (Invitrogen)

1. Añadir 1 mL de Trizol por cada 50-100 mg de tejido y homogeneizar.
2. Agregar 4 perlas de acero y someter en el triturador de tejido TissueLyser LT (QUIAGEN) por 10 minutos para romper y homogenizar el tejido.
3. Añadir 200 μ L de cloroformo al homogenizado.
4. Agite en el vortex vigorosamente.
5. Incubar en hielo durante 15 minutos.
6. Centrifugar para obtener la separación de fases (12.000 g durante 15 minutos a 4°C)
7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
8. Precipitar el ARN con 0,5 mL de isopropanol o 1mL de etanol al 95% e incubar en hielo durante diez minutos.
9. Centrifugar durante 10 minutos a 12.000 g a 4°C.
10. Remover el sobrenadante.
11. Lavar el tubo con 1 mL de etanol al 70% agitando.
12. Centrifugar durante 10 minutos a 7.500 g a 4°C.
13. Nuevamente remover el sobrenadante.
14. Dejar reposar a temperatura ambiente.
15. Disolver el sedimento de ARN en un volumen adecuado de H₂O sin ARNasa o agua de DEPC.
16. Almacenar a -80°C para usar en la RT-PCR



Anexo 2. Protocolo de retro-transcripción (RT)

Concentración de los reactivos

Reactivos	Ci	Cf	Vf= 20 µL
Primers específicos “R”	100 µM	2 µM	1 µL
dNTP mix	100mM	10mM	1 µL
ARN total	-	-	Hasta 11 µL
Agua DEPC	-	-	Hasta 13 µL
Buffer SSIV	5x	1x	4 µL
DTT	100mM	10mM	1 µL
Transcriptasa reversa	200 U/ µL	200 U	1 µL

Procedimiento

1. Agregar en un tubo Eppendorf de 200 µL primers específicos “R”, dNTP mix, ARN total hasta 5 µg y agua hasta 13 µL.
2. Mezclar y centrifugar brevemente.
3. Calentar la mezcla a 65°C por 5 minutos para desnaturar el ARN y luego incubar en hielo por al menos 1 min.
4. En un segundo tubo mezclar el Buffer SSIV, DTT y las Transcriptasa reversa, mezclar y centrifugar brevemente.
5. Agregar el tubo 2 en el 1, mezclar y llevar al termociclador.
6. Ejecutar en el termociclador el siguiente programa:
 - 10 minutos a 55°C
 - 10 minutos a 80°C para inactivar la reacción
7. Dejar enfriar a temperatura ambiente
8. Almacenar a -20°C hasta utilizar para realizar la PCR.



Anexo 3. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Concentración de reactivos

Reactivos	Ci	Cf	Vf = 25 µL
Buffer	10x	1x	2,5 µL
MgCl ₂	50mM	1,8mM	0,9 µL
dNTPs mix	100mM	0,2mM	8 µL
Agua DEPC	-	-	11,58 µL
Cebadores "R" y "F"	100 µM	0,2 µM	0,2 µL
ADNc	-	-	1 µL
Taq polimerasa	200 U/ µL	200 U	1 µL

Procedimiento

1. Agregar en un tubo Eppendorf de 200 µl, todos los componentes de la tabla anterior, dejando para al final la Taq polimerasa y el ADNc.
2. Según los cebadores empleados, seleccionar en el termociclador el programa de PCR.

PYVV	CMV	ANSV
- 95°C x 30''	- 95°C x 3'	- 95°C x 3'
- 40x 95°C x 30''	- 40x 94°C x 30''	- 40x 94°C x 30''
- 50°C x 45 ''	- 52°C x 1'	- 52°C x 1'
- 72°C x 1'	- 72°C x 1'	- 72°C x 1'
- 72°C x 5'	- 72°C x 5'	- 72°C x 5'

TSWV	PLRV	AMV
- 95°C x 3'	- 95°C x 5'	- 94°C x 5'
- 35x 94°C x 1'	- 35x 94°C x 1'	- 35x 95°C x 30''
- 55°C x 1'	- 55°C x 1'	- 58°C x 3''
- 72°C x 1,30'	- 72°C x 1'	- 72°C x 30''
- 72°C x 10'	- 72°C x 10'	- 72°C x 7'



PVV

- 95°C x 5'
 - 30x 92°C x 1'
 - 57°C x 1'
 - 72°C x 1'
 - 72°C x 10'
-
- 94°C x 4'
 - 40x 94°C x 45''
 - 55°C x 30''
 - 72°C x 45''
 - 72°C x 10'

NarCMV

Anexo 4. Resumen de los estudios de identificación molecular de virus presentes en 4 lotes comerciales de naranjilla del cantón Palanda.

Especie	Zona	Virus identificados		
		PYVV	CMV	NarCMV
<i>S. hirtum</i>	Valladolid	+		-
<i>S. sessiflorum</i>	S. F. Miraflores	+		-
<i>S. quitoense</i>	S. F. Vergel	-	+	-
<i>S. hirtum</i>	Las Juntas	+	+	-
<i>S. sessiflorum</i>	Valladolid	+	+	-
<i>S. sessiflorum</i>	S. F. Miraflores	+	+	-

Anexo 5.



S. sessiflorum



S. hirtum



S. quitoense

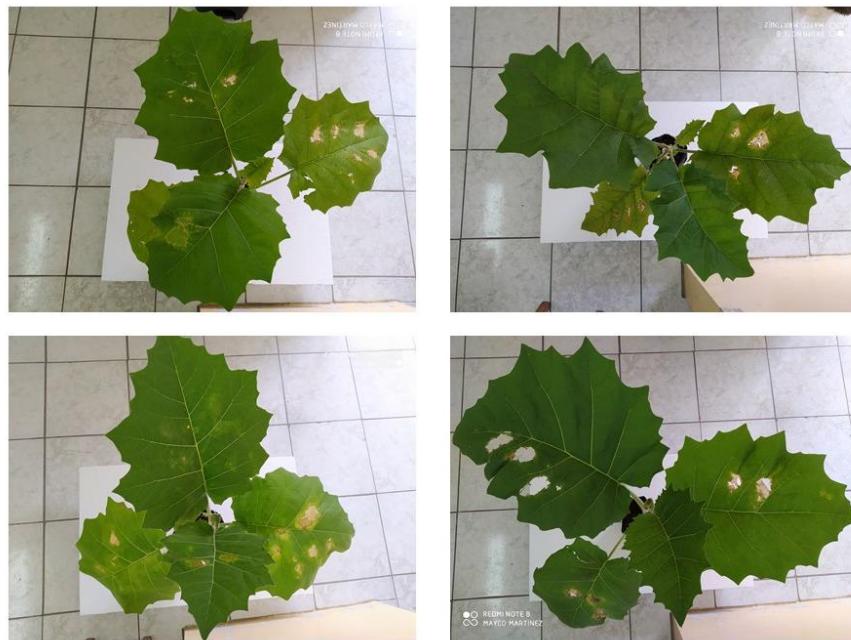
Plantas inoculadas con agua estéril (testigo).

Anexo 6.



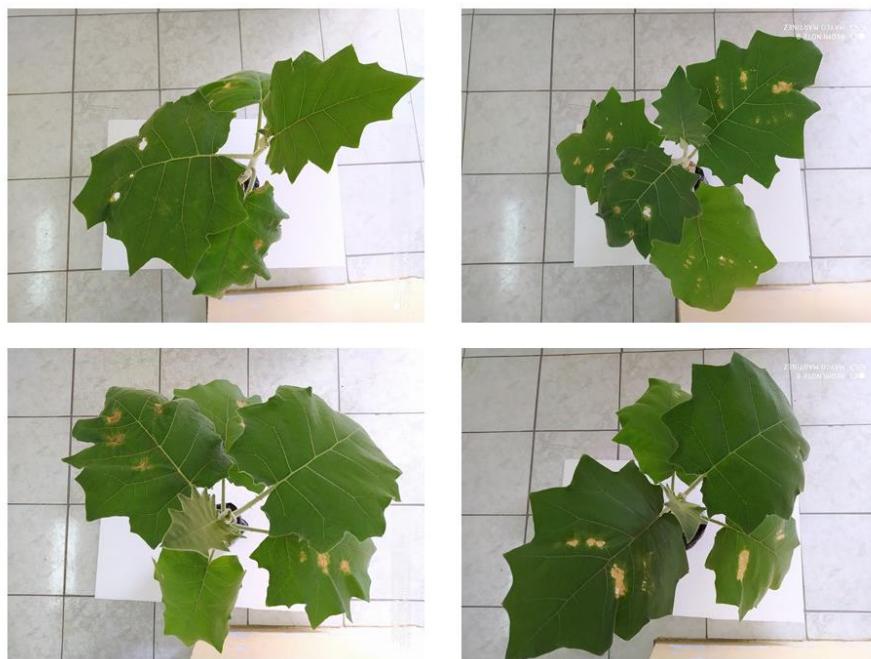
*Síntomas de virosis en *S. quitoense*.*

Anexo 7.



*Síntomas de virosis en *S. sessiflorum*.*

Anexo 8.



*Síntomas de virosis en *S. hirtum**

Anexo 9.



Síntomas de virosis en hojas nuevas de especies silvestres; **a.** *S. hirtum*; **b.** *S. sessiflorum*



Anexo 10. Resumen de síntomas ocasionados por los aislados virales en las 3 especies en estudio.

Aislado	Identidad molecular	Especie	Síntomas
A1, A2, A4	CMV, PYVV	<i>S. quitoense</i>	Anillos cloróticos, mosaicos de leves a intensos, hojas color morado y marrón, enrollamiento de hojas hacia arriba y hacia abajo, hojas corchosas y amarillamiento de las venas, arrugamientos de las hojas de suaves a intensos, necrosis en bordes de las hojas, enrollamiento de los ángulos de inserción, color azulado de las hojas nuevas.
A1, A2, A4	CMV, PYVV	<i>S. sessiflorum</i>	Anillos cloróticos y arrugamientos de suaves a intensos, mosaicos de suaves a intensos, necrosis en la zona de inoculación, bronceado del limbo de la hoja, amarillamiento de la nervadura principal, senescencia de las hojas inoculadas.
A1, A2, A4	CMV, PYVV	<i>S. hirtum</i>	Anillos cloróticos, necrosis del tejido inoculado, arrugamientos de suaves a intensos, color azulado de las hojas nuevas, hojas brillosas, enrollamiento de hojas, hojas coriáceas, senescencia de las hojas inoculadas.
A3	CMV	<i>S. quitoense</i>	Hojas color morado intenso, coriáceas, senescencia de las hojas inoculadas, mapas amarillos en forma de “v”, amarillamiento de las venas principales.
A3	CMV	<i>S. sessiflorum</i>	Arrugamientos de suaves a intensos, ondulamiento de los bordes de las hojas, anillos cloróticos y necróticos, deformación de hojas nuevas.
A3	CMV	<i>S. hirtum</i>	Arrugamientos de suaves a intensos, anillos cloróticos y tejido color marrón, clorosis de suave a intenso en la zona de inoculación, senescencia de las hojas.

Nota: A1: aislado proveniente de Valladolid; A2: aislado proveniente de San Francisco del Vergel Miraflores; A3: aislado proveniente de San Francisco del Vergel; A4: aislado proveniente de las Juntas.