

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

Caracterización de aislados virales en *Solanum quitoense* y *Solanum lasiocarpum*

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniero
Agrónomo

Autor:

Henry Luis Amón Togra

Director:

Patricio Salvador Castro Quezada

ORCID:  0000-0002-2366-2256

Cuenca, Ecuador

2024-01-11

Resumen

El cultivo de naranjilla representa uno de los rubros económicos significativos a nivel de las comunidades orientales del Ecuador, siendo un cultivo de amplia aceptación en el mercado nacional como en el exterior. Entre las principales limitantes que afectan la producción y vuelve poco rentable son las plagas y enfermedades que delimitan su rendimiento, empleando el uso excesivo de pesticidas para contrarrestar los problemas presentados in situ. Tomando en cuenta la incidencia de insectos, estos pueden ser los principales diseminadores de enfermedades más complejas como los virus. En varias localidades del cantón Limón-Indanza, se ha presenciado la incidencia de posibles síntomas relacionados a virus tales como: clorosis, arrugamiento foliar, mosaicos internervales, subdesarrollo en plantas, aborto de frutos, poniendo en evidencia la presencia de posibles virus entre diferentes localidades. El objetivo de este estudio fue caracterizar los aislados virales de 4 localidades productoras de naranjilla en dos especies de la sección *Lasiocarpa*, (*S. quitoense* y *S. lasiocarpum*). Para esto se realizaron inoculaciones mecánicas en las dos especies, evaluando incidencia y severidad de los síntomas observados en las unidades experimentales, con un diseño completamente al azar. Para la variable severidad se midió a los 15, 35 y 56 d d i (días después de la inoculación) y se encontró diferencias entre el testigo y los aislados virales para cada una de las especies, siendo *S. quitoense* más susceptible a daños en comparación con *S. lasiocarpum*. También se caracterizó los síntomas observados para cada aislado viral, siendo este trabajo un aporte de continuidad e información para la región sur del país. En la parte molecular no se observó amplificaciones con los cebadores empleados para la PCR.

Palabras clave: virosis, pcr, caracterización molecular, asociaciones, propagación vegetativa



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The cultivation of naranjilla represents one of the significant economic sectors at the level of the eastern communities of Ecuador, being a crop widely accepted both in the national and foreign markets. Among the main limitations that affect production and make it unprofitable are pests and diseases that limit its performance, using excessive use of pesticides to counteract the problems presented in situ. Taking into account the incidence of pests, these can be the main spreaders of more complex diseases such as viruses. In several locations in the Limón-Indanza canton, the incidence of possible symptoms related to viruses has been witnessed, such as: chlorosis, wrinkling of leaves, internerval mosaics, underdevelopment in plants, fruit abortion, highlighting the presence of possible viruses among different locations. The objective of this study was to characterize the viral isolates from 4 naranjilla producing localities in two species of the *Lasiocarpa* group, (*S. quitoense* and *S. lasiocarpum*), mechanical inoculations were carried out in the two species, evaluating the incidence and severity of the symptoms. Observed in the experimental units, a completely randomized design was carried out, for the severity variable it was measured at 15, 35 and 56 dai (days after inoculation), there were differences between the control and the viral isolates for each of the species. It was also identified that *S. quitoense* was more susceptible to damage than *S. lasiocarpum*. In the molecular part, no amplifications were observed with the primers used for PCR. In addition, the symptoms observed for each viral isolate were characterized, this work being a contribution of continuity and information for the southern region of the country.

Keywords: virosis, pcr, molecular characterization, associations, vegetative propagation



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción.....	10
1. Objetivos	12
Objetivo general:	12
Objetivos específicos:.....	12
2. Hipótesis	13
3. Revisión Bibliográfica	14
3.1 Generalidades de la naranjilla	14
3.2 El cultivo de la naranjilla en el Ecuador	14
3.3 La sección Lasiocarpa en el género de las solanáceas	15
3.4 Generalidades de los virus	16
3.5 Síntomas de virus en solanáceas.....	17
3.6 Factores que influyen en la manifestación de los síntomas	18
3.7 Interacción virus-solanáceas.....	19
3.8 Prueba retro transcripción-PCR.....	20
4.1 Área de estudio	22
4.2 Materiales y equipos.....	22
4.3 Metodología.....	23
4.3.1 Metodología para la investigación experimental del objetivo 1: Recolección de muestras con síntomas de enfermedad viral	23
4.3.2 Diseño experimental para el objetivo 1	24
4.3.3 Variables a evaluar	25
4.3.4 Metodología para la investigación experimental del objetivo 2:	26
4.3.5 Análisis estadístico.....	28
5. Resultados	29
5.1 Caracterización de infecciones virales en <i>S. quitoense</i>	29
5.2 Caracterización de infecciones virales en <i>S. lasiocarpum</i>	30
5.3 Incidencia de los aislados virales en <i>S. quitoense</i> y <i>S. lasiocarpum</i>	31
5.4 Severidad ocasionada por aislados virales en <i>S. quitoense</i> y <i>S. lasiocarpum</i>	32
5.4.1 Severidad de síntomas en <i>Solanum quitoense</i>	32
5.4.2 Severidad de síntomas en <i>Solanum lasiocarpum</i>	33
5.5 Evaluación de la severidad de los aislados virales entre especies	33

5.5.2 Severidad provocada por el aislado viral de Zarambintza en <i>S. quitoense</i> y <i>S. lasiocarpum</i>	34
5.5.3 Severidad provocada por el aislado viral de San Jorge en <i>S. quitoense</i> y <i>S. lasiocarpum</i>	35
5.5.4 Severidad provocada por el aislado viral de La Victoria en <i>S. quitoense</i> y <i>S. lasiocarpum</i>	35
5.5.5 Identificación molecular de los aislados virales mediante la técnica RT-PCR.....	36
6. Discusión.....	36
Conclusiones.....	40
Recomendaciones.....	41
Referencias	42
Anexos.	46

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de localidades	23
Figura 2. Síntomas ocasionados en <i>S.quitoense</i> ; a) Anillos clorótico alrededor del área inoculada, b) Moteados y clorosis localizado, c) Clorosis y encrespamiento general en la hoja, e) Clorosis general, necrosamiento y enroscamiento de las hoja inoculada, f) Testigo asintomatológico.	29
Figura 3. Síntomas desarrollados por los aislados virales en <i>S. lasiocarpum</i> ; a) Clorosis internerval, b) Encrespamiento general en hojas jóvenes, c) Necrosamiento en los bordes de las hojas inoculadas, d) Anillos necróticos en las zonas inoculadas, e) Encrespamiento y clorosis leve en hojas jóvenes inoculadas f) Testigo sin sintomatología.....	31
Figura 4. Severidad entre especies por el aislado viral de Chiviaza	34
Figura 5. Severidad entre especies por el aislado viral de Zarambintza	35

Índice de tablas

Tabla 1. Equipos y materiales empleados en esta investigación	22
Tabla 2. Localidades de reconociendo y recolección de muestras	23
Tabla 3. Diseño empleado en la presente investigación.....	24
Tabla 4. Escala de Severidad	26
Tabla 5. Cebadores empleados para la identificación molecular de agentes virales	27
Tabla 6. Incidencia general de las unidades experimentales en las dos especies evaluadas en la semana 8 de toma de datos.	32
Tabla 7 Prueba de normalidad y homocedasticidad entre localidades	33
Tabla 8 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de Chiviaza en las 2 especies	34
Tabla 9 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de Zarambintza en las 2 especies evaluadas	34
Tabla 10 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de San Jorge en las 2 especies evaluadas	35
Tabla 11 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de La Victoria en las 2 especies evaluadas	35

Agradecimiento

A Dios, por la bendición más grande llamada vida, que me ha permitido desarrollar y formarme como persona de bien.

A mis padres Juan José Amón Abad y Julia Leticia Togra Rivera, por su dedicación y vocación de vida, el verme ya como un profesional.

A mis hermanos; Sandra Elizabeth, Paola Viviana y Christian Felipe, por su apoyo, motivación e inspiración.

A todas las personas que han sido parte de este logro; Profesores compañeros, amigos y familiares, por brindarme el conocimiento, experiencia, vocación y su generosidad.

Dedicatoria

A los que obran el campo, que te alimentan, que trabajan callados en la adversidad de los tiempos, de sonrisas sinceras, de corazones generosos, que se oponen a dejar la esencia de su vida por el ruidoso mundo llamado globalización, a los que disfrutan de las cosas simples de la vida, que cantan con el viento y hablan con las plantas, sembrando el porvenir de mejores tiempos.

A la memoria de: Julio Leopoldo Amón Arizaga y Luis Daniel Togra Zuña, quienes han sido mi principal inspiración, al enseñarme en valor del trabajo, la honradez y la generosidad.

Introducción

En el Ecuador, la naranjilla se cultiva en aproximadamente 10.000 ha y constituye la principal fuente de ingresos de miles de familias en las provincias de Tungurahua, Napo, Pastaza y Morona Santiago en la región amazónica. La producción ha aumentado significativamente en las últimas dos décadas. Las plagas como insectos y enfermedades afectan la producción de naranjilla y limitan los posibles beneficios e ingresos del cultivo por parte de los agricultores locales (Monteros, 2004).

Uno de los problemas que presenta la naranjilla son las infecciones virales. En el mundo sólo se ha confirmado plenamente la infección de una especie viral en plantas de naranjilla bajo condiciones naturales. Las enfermedades virales en diferentes cultivos causan enormes pérdidas alrededor de todo el planeta en términos de cantidad/calidad de los productos, a nivel mundial, que pueden atribuirse a pérdida por virus en daños al cultivo oscilan en \$ 30 mil millones anuales (Sastry, 2014).

La problemática de los cultivos de naranjilla y tomate de árbol se centra en la producción y los bajos rendimientos de estos frutales, debido a problemas sanitarios y a la baja disponibilidad de materiales genéticos mejorados (INIAP, 2019). En la Amazonía ecuatoriana la naranjilla constituye una importante fuente de ingresos económicos para los agricultores debido a las condiciones adecuadas para el desarrollo del frutal.

La principal variedad cultivada en la Amazonía del Ecuador es *S. quitoense* Var. *quitoense* sin espinas y los cultivares que más se siembran y comercializan son: el híbrido Puyo (61%), híbrido Palora (38 %) y la variedad común (1 %) (Andrade, et al., 2016). Además, Green y col, (2018) reportaron en la variedad híbrido Puyo la primera especie de virus en naranjilla ubicada en la familia *Tymoviridae*, a la que denominaron como “*Naranjilla chlorotic mosaic virus*” (NarCMV).

Estudios más recientes como el de Martínez (2021), reporta la incidencia de infecciones mixtas de complejos virales entre CMV Y PYVV, al igual que la caracterización sintomatológica, tales como: anillos cloróticos, hojas coriáceas clorosis intervenal (Bernal, 2004), arrugamientos de las hojas, necrosis, mosaicos entre otros, demostrando una amplia distribución y capacidad de generar una posible resistencia ante el manejo agronómico oportuno de este cultivo, viéndose afectado en el manejo y calidad del mismo. En las localidades vecinas de la cabecera cantonal de Limón-Indanza es frecuente encontrar cultivos de naranjilla que presentan incidencia de posibles ataques virales que limitan el rendimiento neto de producción, se presenta tales síntomas como: mosaicos cloróticos, anillos necróticos, subdesarrollo y aborto de frutos.

El presente estudio pretende realizar la identificación morfológica y sintomatológica de posibles virus presentes en el cultivo de naranjilla en la Amazonia Sur del Ecuador, que permitirá generar información para productores e investigadores con el propósito de reconocer las principales características que poseen los virus que afectan al cultivo de naranjilla y diseñar estrategias para prevenir pérdidas económicas en la producción.

1. Objetivos

Objetivo general:

- Caracterizar los síntomas de aislados virales en *S. quitoense* Lam. y *S. lasiocarpum*

Objetivos específicos:

- a) Identificar morfológicamente los síntomas de aislados virales en naranjilla
- b) Reconocer molecularmente los aislados virales en plantas de naranjilla por RT-PCR

2. Hipótesis

- Hipótesis nula (H_0) = No existe diferencias de la sintomatología entre los aislados virales.
- Hipótesis alterna (H_1) = Existe diferencia de la sintomatología entre aislados virales

3. Revisión Bibliográfica

3.1 Generalidades de la naranjilla

La naranjilla (*S. quitoense* Lam.) es un frutal que pertenece a la familia de las solanáceas. Es originaria de los sotobosques subtropicales de los Andes de Ecuador, y crece principalmente en los flancos de la cordillera andina en sitios con buena humedad, regiones frescas y sombreadas en torno a los 800 y 1400 m.s.n.m. (Andrade, et al., 2016).

Según Vásquez (2012), la naranjilla es una planta semisilvestre que crece en ecosistemas abiertos por el hombre, especialmente en sitios frescos, sombreados y con buena humedad (áreas de sotobosque en las partes bajas del bosque primario), bajo cuyas condiciones la planta es exuberante, muy verde y vigorosa.

Durante las últimas dos décadas, la producción de naranjilla ha aumentado significativamente en Ecuador, la comercialización de la fruta ha pasado de los mercados de pequeños agricultores a las cadenas de supermercados y jugos y las industrias de helados (Ministerio de Desarrollo agrario, 2022). En un esfuerzo por desarrollar mejores cultivares y considerando la baja variación intraespecífica observada en lo “común” naranjilla (*S. quitoense*), productores e investigadores han desarrollado híbridos interespecíficos que ahora se cultivan ampliamente. El potencial Sin embargo, no se ha considerado los daños causados por enfermedades virales en estos nuevos híbridos (Green y col. 2018).

3.2 El cultivo de la naranjilla en el Ecuador

En el Ecuador se cultivan y comercializan diferentes variedades e híbridos de naranjilla, por lo tanto, constituye la base de la economía de un importante sector productivo de este país. En 2002 en la Región Amazónica se encontraba el 93 % de la producción nacional de naranjilla, principalmente en las provincias de Napo, Pastaza, Morona Santiago y Sucumbíos; el 7 % restante se cultiva en las estribaciones oriental y occidental de la Sierra. Según datos consignados se observa que el rendimiento promedio de 3,56 t/ha es bajo, debido a la incidencia de plagas y a un manejo inadecuado; en el país se tiene una superficie de cultivo de aproximadamente 9.450 hectáreas (INIAP, 2011).

El cultivo de esta fruta tiene alta importancia tanto a nivel nacional como internacional, debido a las propiedades nutritivas tanto de olor como de color que la convierten en una fruta perfecta para la agroindustria, pues permite la elaboración de helados, conservas, mermeladas, bebidas refrescantes, entre otros productos (Acosta, Pérez y Vaillant, 2009; INIAP, 2011).

De acuerdo a Gallardo (2005), en Ecuador se cultivan 9459 ha de naranjilla, de las cuales 7983 ha corresponden a monocultivo y 1476 ha se asocian con otros cultivos; en las zonas de Morona Santiago, Pastaza, Tungurahua, Pichincha e Imbabura. Durante los años setenta, ciertas plagas y enfermedades fueron aparentemente responsables de la casi desaparición del cultivo de naranjilla “común” en Ecuador. Paralelamente al colapso de la naranjilla “común”, en el mercado aparece el híbrido Puyo y en 1994 se libera el híbrido INIAP-Palora.

3.3 La sección *Lasiocarpa* en el género de las solanáceas

El centro primario de diversidad genética del taxón comprende Colombia, Ecuador y Perú, encontrándose entre los 1200 y 2300 msnm (Heiser y col ,1999; Lobo y Medina, 2000).

Heiser (1993) indicó que, las plantas cultivadas actuales no deben diferir mucho de las halladas por los conquistadores al llegar a América por el poco trabajo de selección y mejoramiento que se ha practicado con esta entidad biológica; a lo cual adicionaron Whalen (1981) que a pesar del grado de domesticación de la planta, ésta exhibe una variabilidad escasa. La planta pertenece a la sección *Lasiocarpa*, clase que incluye entre 11 y 13 especies (Bohs, 2004), distribuidas principalmente en el noroeste de Sudamérica, con presencia de un taxón, *Solanum ferox*, en el continente Asiático.

Para ser una planta domesticada, la naranjilla muestra muy poca variabilidad. (Heiser, 1972). Las plantas cultivadas en Ecuador están desarmadas mientras que en el norte de ese país, generalmente tienen pequeñas espinas en las hojas y tallos (Schultes, 1962). En Ecuador se reconocen 5 "variedades": agria, Baeza, Baeza roja, bola, y dulce, que se distingue por muy ligeras diferencias en los frutos, porque poco se ha realizado un trabajo de mejoramiento con la naranjilla, las plantas que se cultivan hoy en día. Probablemente difieren poco de los encontrados por los españoles cuando llegaron a las Américas. Aunque la naranjilla ocasionalmente escapa del cultivo para establecen poblaciones de malezas, no se conoce ningún tipo verdaderamente salvaje (Heiser W. , 1972).

Las especies de la sección *Lasiocarpa* pueden ser distinguidas de otros miembros espinosos de *Solanum* por una combinación de varios caracteres. Las hojas son usualmente grandes, con bordes repandos. Las inflorescencias no son ramificadas y se presentan en los entrenudos. Las flores son estetiformes con corolas profundamente lobuladas. Las frutas son bayas pubescentes, con cuatro lóculos (raramente seis o más) y comestibles, y a menudo son grandes (Bernal, 2004).

Solanum lasiocarpum Dun. (*Solanum ferox*) es originaria de la India, Indochina e Indias Orientales; *S. lasiocarpum* está muy relacionada a *S. candidum* con la cual se cruza fácilmente. El fruto posee pelos más o menos persistentes; la pulpa de la fruta es de color naranja (Bermeo, 2015). Esta especie es muy relacionada a *S. candidum* con la cual se cruza fácilmente.

Se postuló anteriormente que *S. lasiocarpum* desarrollado después de una introducción de *S. candidum* a Asia en el siglo XVI. *Solanum repandum* fue descubierto en su forma actual en las Islas de la Sociedad alrededor de 1770 (Forster, 1786). Por tanto, si *S. lasiocarpum* dio origen a *S. repandum* puede surgir la pregunta de si había transcurrido suficiente tiempo para que ocurriera la especiación y que *S. repandum* haya alcanzado su distribución actual. Si suponemos que esa semilla fue llevado a una de las islas por pájaros (si un solo plántula se haya establecido sería suficiente, ya que la especie es autocompatible) o mediante gente porque era una planta útil, el aislamiento sería inmediato y el principio fundado rompería esto, junto con la selección humana, podría dar lugar a una evolución muy rápida. Desde que la gente en esta parte del mundo era excelentes marineros, extendidos a las otras islas podrían haber tenido lugar en poco tiempo. (Simons, 1985), aunque se acepta que *S. repandum* sea un "cultivar" derivado de *S. lasiocarpum* y además está estrechamente relacionado con *S. sessiliflorum*.

3.4 Generalidades de los virus

Los virus son patógenos infecciosos demasiado pequeños para ser vistos en el microscopio de luz, pero que a pesar de su tamaño son capaces de causar un caos. Las formas más simples de virus están compuestas por una pequeña porción de ácido nucleico rodeado de una cubierta proteica (o envoltura proteica o cápside). Como en el caso de otros organismos, los virus portan información genética en sus ácidos nucleicos, los cuales típicamente codifican tres o más proteínas. Todos los virus son parásitos obligados que dependen de la maquinaria celular de sus hospedantes para reproducirse. Los virus no son activos fuera de sus hospedantes (o huésped u hospedero), lo cual ha llevado a que muchos sugieran que no son organismos vivos. Todos los tipos de organismos vivos incluyendo animales, plantas, hongos y bacterias son hospedantes de virus, pero la mayoría de los virus infecta solo un tipo de hospedante. Los virus causan muchas e importantes enfermedades vegetales y son responsables por pérdidas en el rendimiento y la calidad de los cultivos en todas partes del mundo (APS, 2013).

En Ecuador, se han encontrado sintomatologías severas de enfermedades virales en los valles de la provincia de Pichincha. Estos síntomas corresponden a amarillamiento de venas, manchas aceitosas, moteados y manchas cloróticas (Zapata y col, 2011).

Los potyvirus constituyen el género más grande y el de mayor importancia económica por las pérdidas que causan, de los cuarenta y siete reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV de su nombre en Inglés); fue propuesto en 1959 con tan solo 14 miembros llegando a alcanzar en 1992, un total de 180 (ICTV, 1993); (Martelli, 1996); (Matthews, 1991); (Shulka et.al, 1989).

Dentro de las patologías que más lo afectan está la denominada "Amarillamiento de la hoja u hoja en abanico" (Zuluaga, 1996) cuya sintomatología se asemeja a las causadas por virus en otras Solanáceas. Puesto que la mayoría de los agentes virales tienen un rango de hospedero relativamente estrecho, se sugiere que los mismos tipos de virus causen patologías semejantes entre plantas del mismo género como en el caso de la papa (*Solanum tuberosum* L.) que es afectada por el potyvirus (PVY) y potexvirus (PVX) mostrando la aparición de mosaicos tanto suaves como severos y un encrespamiento y desarrollo de rugosidades en la superficie de las hojas, síntomas semejantes a los descritos para la enfermedad descrita por Zuluaga (1996).

El Virus Mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus, CMV). Es uno de los virus de plantas más comunes, e infecta alrededor de 1000 especies. Muchas cepas de CMV han sido descritas difiriendo en su rango de hospederos, síntomas, y vectores, en las propiedades serológicas de las proteínas estructurales, y en la secuencia del ácido nucleico (Palukaitis & Roossinck, 1992). La mayoría de las cepas de CMV están actualmente divididas en dos grandes grupos (subgrupo 1 y 2) basadas en similitudes serológicas y secuenciales (Barzuna, 2000). Cepas comunes de CMV infectan típicamente solanáceas y cucurbitáceas, pero no leguminosas. El CMV, pertenece al género Cucumovirus de la familia Bromoviridae (Palukaitis & Roossinck, 1992)], este virus está formado por tres partículas isométricas de 29 nm de diámetro. Su ácido nucleico está constituido por 4 piezas de ARN monocordal, dos incluidas en una misma partícula y las otras dos encapsidadas separadamente (Esteva & Nuez, 1991). CMV es transmitido por áfidos de manera no persistente (Nault, 1997). La 9 proteína de la cápside viral interactúa con los componentes del estilete de áfidos para influir en la eficiencia de la transmisión (Chen & Francki, 1990), y no requiere de componentes proteicos que ayuden a la transmisión viral, tal como ocurre en la transmisión no persistente de potyvirus

3.5 Síntomas de virus en solanáceas

El patrón general de síntomas de la enfermedad incluye la ocurrencia de mosaicos, engrosamiento de nervaduras, ampollas y deformación foliar, amarillamiento, manchas

aceitosas o concéntricas, defoliación y la reducción dramática tanto en la producción de frutos como en la longevidad de las plantas (Betancouth C, 2003). En los frutos verdes se presentan manchas moradas que cambian a diferentes tonalidades rojizas con la maduración, además es frecuente encontrar frutos deformes y daños en la calidad de la pulpa (Tamayo, 1996).

A nivel mundial, los únicos reportes de Virosis se han realizado en Nueva Zelanda y Ecuador. En el primer país se han identificado seis virus (Eagles y col,1994), entre los cuales se encuentran: Virus del mosaico del tamarillo (TaMV, *Potyvirus*), que causa síntomas como moteado y bandeamiento de venas en las hojas y manchas oscuras en los frutos (Brunt *et al.*, 2009); Virus del mosaico del pepino (CMV, *Cucumovirus*), con síntomas en hojas y frutos en forma de manchas y anillos; Virus del mosaico de la papa (PAMV, *Potexvirus*), que aparentemente es dependiente del TaMV para la transmisión por áfidos; Virus del mosaico de la alfalfa (AMV, *Alfamovirus*) que causa un mosaico amarillo brillante y bandeamiento de venas, pero al parecer no afecta el fruto (Fletcher, 1987). Hasta el momento no se han reportado contagios virales en naranjilla; entre las posibles razones de esto podría estar la falta de síntomas destacados, infecciones latentes o simplemente una subestimación de la el daño potencial causado por estos patógenos, especialmente cuando presente en infecciones mixtas. Además, la propagación vegetativa. La naturaleza de los híbridos interespecíficos comunes plantea una amenaza directa a la sostenibilidad de este cultivo por falta de certificación de naranjilla. Además, la continua búsqueda de híbridos y variedades dotados de rasgos de producción óptimos puede desencadenar la aparición de virus nuevos o reemergentes, que generalmente son asintomáticos en la naturaleza especies. Tamarillo (*S. betaceum*) sintomático (mosaico, moteado, deformación de las hojas y retraso del crecimiento), un cultivo frutal que se cultiva comúnmente junto con la naranjilla y otros cultivos solanáceos en el Amazonas. La región, fue reportada recientemente como infectada con el virus Y de la papa, Papa virus V, virus del enrollamiento de la hoja de la papa y otros tradicionalmente considerados virus de la papa (Espinoza *et al.* 2017; Insuasti *et al.* 2016).

3.6 Factores que influyen en la manifestación de los síntomas

Según (ASTA, 2018), entre los principales factores que influyen en la manifestación de los síntomas se encuentran:

- Medio ambiente (temperatura, iluminación): Generalmente, las temperaturas bajas a comienzos de la temporada de crecimiento, en la primavera, asociada con baja

intensidad de luz, tienden a causar en síntomas más graves que durante el verano caluroso.

- Cepa del virus: Algunas cepas del CGMMV pueden producir síntomas más graves que otras. Actualmente, se han identificado dos genotipos diferentes: el asiático y el europeo.
- Condiciones de crecimiento: Los sistemas de producción de cultivos protegidos, con actividades tales como el tutorado del cultivo y la recolección de los frutos, tienden a favorecer la diseminación del virus debido a la facilidad de la transmisión mecánica.
- Tipo de tejido (hojas, frutos): Los síntomas del mosaico moteado y la distorsión son generalmente más visibles en hojas jóvenes en crecimiento activo. En plantas severamente infectadas, pueden manifestarse síntomas en los frutos.
- Huésped (especies, variedad): Muchas cucurbitáceas son huéspedes del CGMMV pero el pepino es más susceptible que otras especies y muestra una sintomatología intensa. Actualmente, algunas variedades resistentes (tolerantes) al CGMMV están disponibles comercialmente.
- Momento de infección (etapa del cultivo): Hay generalmente menores cantidades de inóculo viral al inicio de la temporada (comienzos de la primavera) que hacia el final de la temporada (otoño).
- Etapas de crecimiento (plántulas-planta madura): Una infección temprana en la etapa de las plántulas jóvenes genera síntomas más intensos, que resultan en pérdidas más cuantiosas. Por lo tanto, se aconseja minimizar la manipulación innecesaria de las plantas en las primeras semanas luego del trasplante

3.7 Interacción virus-solanáceas

Las plantas poseen mecanismos activos y pasivos para prevenir la infección viral. Las defensas pasivas se dan cuando la planta no produce uno o más de los factores requeridos para la reproducción del virus y su dispersión en el hospedante. Las defensas activas incluyen la detección y destrucción de células infectadas con el virus, y son producidas por genes de resistencia específicos en la planta (Espinoza, 2007).

Normalmente, los genes de resistencia son efectivos solamente contra un virus en particular. Además, las plantas poseen un sistema general de defensa comparable con el sistema inmune animal. La principal diferencia entre ambos es que el sistema inmune animal actúa sobre las proteínas del patógeno, mientras que el sistema de defensa vegetal, conocido como silenciamiento por ARN ("RNA silencing"), detecta y degrada las moléculas de ARN viral (APS, 2014).

Las plantas infectadas prontamente son atrofiadas con malformación de hojas, los frutos no son comercializables debido a la rugosidad pronunciada que presentan. No todos los frutos infectados pueden mostrar síntomas, algunas variedades de cucurbitáceas pueden mostrar patrones de manchas verdes. Los síntomas más comunes son: epinastia severa, doblamiento de la superficie del pecíolo y la hoja hacia abajo y reducción de las hojas (Zitter & Murphy, 2009). CMV tiene un amplio rango de hospederos incluyendo más de 1200 especies de plantas en alrededor de 100 familias de dicotiledóneas y angiospermas monocotiledóneas (Palukaitis & Roossinck, 1992). Las familias hospederas más comunes son: *Amaranthaceae*, *Apocynaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Convolvulaceae*, *Cruciferae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae-Papilionoideae*, *Malvaceae*, *Phytolaccaceae*, *Polygonaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Tetragoniaceae*, *Tropaeolaceae*, *Umbelliferae*. El CMV es transmitido por unas 80 especies de áfidos en 33 géneros, de forma no persistente no circulativa, aunque se ha reportado la transmisión semipersistente de algunas cepas de CMV en Japón (Kameyawa & Murakami, 1987)

3.8 Prueba retro transcripción-PCR

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 en diferentes poblaciones de muestras, o agentes infecciosos (Orlando y col, 1998; Hierro y col, 2006)

La reacción de la cadena polimerasa (PCR) es una herramienta poderosa para amplificar pequeñas cantidades de ADN para varios análisis moleculares. La combinación de la reversa transcripción (RT) con subsecuentes amplificaciones por PCR (RT-PCR) ha sido usada en el diagnóstico de distintos virus con genoma ácido ribonucleico (ARN) (Blas y col, 1994).

La PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación.

Estas tres etapas:

- 1) Desnaturalización,
- 2) Alineamiento
- 3) Extensión del ADN.

Se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias (Espinoza, 2007).

3.9 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (Reverse Transcription-PCR, RT PCR)

Es una variante de la PCR donde la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es precedida por una transcripción reversa (RT). En el paso de RT, previo a la PCR, se produce la síntesis del cDNA, es decir, a partir de una cadena de ARN por acción de una enzima transcriptasa reversa (ADN polimerasa, ARN-dependiente). Esta primera cadena de cDNA sirve como molde para la reacción de PCR. Es la más utilizada para detección de virus vegetales pues una gran parte de ellos son virus de ARN. Para el proceso se necesita ARN molde de la planta infectada y una enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa (RT), además de los elementos necesarios indicados anteriormente para la realización de la PCR. En la RT-PCR por tanto se emplean los dos enzimas (RT y Taq polimerasa) en condiciones diferentes y puede realizarse en dos pasos o en un solo paso. En la RT-PCR de dos pasos, básicamente consiste, en obtener ADN complementario (cDNA) con ayuda de la retrotranscriptasa, y el segundo paso en una PCR normal, se lleva a cabo en dos reacciones diferentes. En cambio, la de un solo paso se lleva a cabo en una sola reacción, utilizando un mix con ADN polimerasa y retrotranscriptasa. En la reacción primero actúa la retrotranscriptasa a 50° C durante 30 minutos para la obtención de cDNA y luego aumentar la temperatura a 94° C para desnaturalizar la retrotranscriptasa y activar la Taq ADN polimerasa, continuando el proceso con una PCR normal (Walker & Ralph, 2009).

4. Materiales y métodos

4.1 Área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en los invernaderos y en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en las coordenadas UTM X, -719508.90; Y, 9677039.40a una altitud de 2.567msnm, instalaciones dotadas de los recursos para la ejecución del presente trabajo.

4.2 Materiales y equipos

Tabla 1. Equipos y materiales empleados en esta investigación

Biológico	Físicos	De laboratorio
– Plántulas de <i>S. quitoense</i> , <i>S. Lasiocarpum</i> .	– Sustrato estéril	– Vasos de precipitación
– Muestras de hojas sintomáticas	– Fundas plásticas	– Erlenmeyer
	– Libreta de campo	– Tubos de ensayo
	– Rótulos de identificación	– Puntas para micro pipeta
	– Cubas de hielo	– Bisturí
		– Mechero Bunsen
		– Pinzas
		– Gradillas

Equipos	Reactivos	Programas
– Cámara de flujo	– Alcohol 70 y 90%	– Software Excel
– Vórtex	– Agua sin	– Infostat
– Balanza analítica	ARNasas	– Gen5 3.03
– Estufa	– Isopropanol	
– Incubadora	– Trizol	
– Refrigeradora	– Fosfato de sodio	
– Centrifugadora	50 mM pH 7.0	
– Termociclador	– Sulfito de sodio	
– Cámara de electroforesis	20 Mm	
– Autoclave	– Reactivos para RT-PCR	
– Trans-luminador		
– Micropipetas		
– Espectrofotómetro		

4.3 Metodología

4.3.1 Metodología para la investigación experimental del objetivo 1: Recolección de muestras con síntomas de enfermedad viral

Se realizó recorridos de reconocimiento de enfermedades virales en cultivos de naranjilla en las 4 localidades del cantón Limón-Indanza provincia de Morona Santiago (Tabla 2). Se recolectaron entre submuestras de 1 a 2 hojas jóvenes de planta con posible sintomatología de infección viral, tales como: clorosis internerval, mosaicos cloróticos, encrespamiento, anillos necróticos etc., tratando de obtener entre 100 y 500 g de submuestras por localidad. Posteriormente se rotulará y se conservarán en refrigeración a -80°C en el Laboratorio de biología molecular en la ciudad de Cuenca.

Tabla 2. Localidades de reconociendo y recolección de muestras

Código	Localidades	Coordenada		
		X	Y	Z
A 1	Chiviaza	791198	9677227	1.342
A 2	Zarabintza	789450	9659541	1.024
A 3	San Jorge	791116	9657803	979
A 4	La Victoria	793782	9660539	877

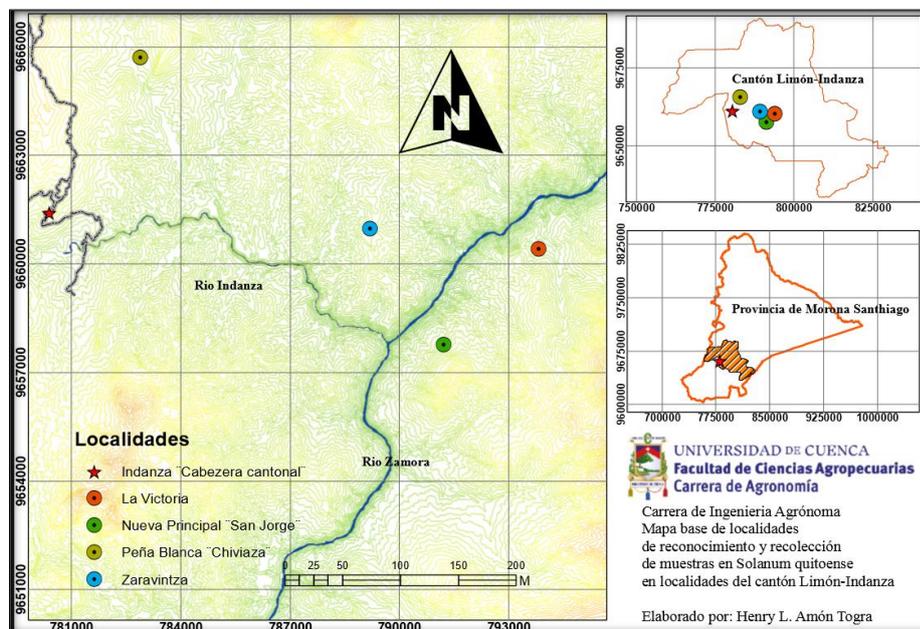


Figura 1. Mapa de localidades

Extracción del inoculo (Aislados virales)

Se trituraron 300 g de cada muestra individualmente en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0 más sulfito de sodio 20 mM, se tamizo y almacenó en atomizadores para posteriormente inocular en plantas sanas (Green et al, 2018).

Material vegetal

Se utilizó semillas de las 2 especies en estudio almacenadas en el laboratorio de biología molecular obtenidas de ensayos anteriores. Las semillas fueron sembradas en una bandeja de germinación en sustrato estéril compuesto por 2 partes de limo por 1 parte de materia orgánica y 1 parte de bochashi. Las plántulas de 2 meses de edad fueron trasplantadas en fundas de polietileno negras de 13,5x18cm de 0,5 kg previo a su inoculación en los invernaderos de la facultad.

Inoculación en material vegetal

La suspensión obtenida de los aislados virales, se aplicó sobre las hojas previamente frotadas con carburo de silicio (Hull 2009 citado por (Cornejo-Franco, 2019)). Se atomizó 3 ml de la suspensión de cada muestra sobre las hojas (en plantas de 4 meses de edad). En el testigo se inducirá un mock con agua estéril. Las plantas inoculadas se mantuvieron en el invernadero con cubiertas a prueba de insectos. Se realizó revisiones periódicas cada 3 días para observar su evolución.

4.3.2 Diseño experimental para el objetivo 1

Para el siguiente ensayo se realizó un diseño completamente al azar, cuya unidad experimental fue 1 planta. El ensayo contó con 4 tratamientos (4 inóculos diferentes), 5 repeticiones por tratamiento y una planta de testigo por tratamiento por especie, teniendo un total de 48 plantas (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño empleado en la presente investigación

Especies	Repetición					Testigo
S. quitoense	<i>B1R1</i>	<i>B1R2</i>	<i>B1R3</i>	<i>B1R4</i>	<i>B1R5</i>	<i>TB1</i>
	<i>B2R1</i>	<i>B2R2</i>	<i>B2R3</i>	<i>B2R4</i>	<i>B2R5</i>	<i>TB2</i>
	<i>B3R1</i>	<i>B3R2</i>	<i>B3R3</i>	<i>B3R4</i>	<i>B3R5</i>	<i>TB3</i>
	<i>B4R1</i>	<i>B4R2</i>	<i>B4R3</i>	<i>B4R4</i>	<i>B4R5</i>	<i>TB4</i>

S. <i>lasiocarpum</i>	<i>B1R1</i>	<i>B1R2</i>	<i>B1R3</i>	<i>B1R4</i>	<i>B1R5</i>	<i>TB1</i>
	<i>B2R1</i>	<i>B2R2</i>	<i>B2R3</i>	<i>B2R4</i>	<i>B2R5</i>	<i>TB2</i>
	<i>B3R1</i>	<i>B3R2</i>	<i>B3R3</i>	<i>B3R4</i>	<i>B3R5</i>	<i>TB3</i>
	<i>B4R1</i>	<i>B4R2</i>	<i>B4R3</i>	<i>B4R4</i>	<i>B4R5</i>	<i>TB4</i>

Bulk (B); Repetición(R); Testigo (T)

Fuente: Autor

4.3.3 Variables a evaluar

Se monitorearon los síntomas a partir de los 10 días posteriores a la inoculación (dpi) durante 8 semanas y se describieron las características mediante la utilización de dos variables: incidencia y severidad. La variable incidencia fue medida en proporción, para lo cual se utilizó la fórmula propuesta por Holguín Peña, (2004).

Incidencia (I) = (No. plantas enfermas) / (No. total plantas)

La variable severidad, fue evaluada mediante la utilización de una escala propuesta por Bolaños, (1996) citado por Holguín Peña, (2004), modificada por Martínez, (2021), para la descripción y toma de datos para el presente estudio, en referencia 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 criterio 1 se consideró a las plantas que no presentaron síntomas ni daño aparente. En el criterio 2 se consideró a las plantas que presentaron síntomas imperceptibles, mosaicos suaves en la zona de inoculación, hojas brillosas y arrugamientos suaves. En el criterio 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 criterio 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. Por último, el criterio 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).

Tabla 4. Escala de Severidad

Escala	Severidad de síntomas
0	Sin daños aparentes
1	Imperceptibles
2	Hojas nuevas con mosaicos leves
3	Mosaico leve, lámina levemente corrugada
4	Hojas nuevas y lámina con mosaicos y arrugamientos moderados
5	Todo el follaje con mosaicos y arrugamientos

Fuente: Bolaños, (1996), modificada por (Martínez, 2021)

4.3.4 Metodología para la investigación experimental del objetivo 2:

- **Preparación de las muestras y Extracción de ARN total**

Preparación de las muestras: Las muestras recolectadas en las 4 localidades, fueron homogeneizadas y trituradas para cada localidad en reactivo Trizol, como lo recomienda los kits comerciales (TRI reagent). Con ello, se utilizó 1 ml de reactivo TRI por cada 50 a 100 mg de tejido de cada localidad, se introducirá cada muestra en tubos de Eppendorf de 1 ml diferentes y se colocará 4 perlas de acero por tubo para triturar el tejido.

- **Extracción de ARN total:**

Las muestras preparadas se centrifugaron a 12 000 rpm por 10 minutos, luego se agregó 200 µl de cloroformo y se siguió con el protocolo del fabricante (TRI reagent).

- **RT-PCR (Retro- transcripción)**

El ARN obtenido de la extracción de ARN de las muestras, se combirtió en ADNc utilizando la enzima RT (Retro-transcriptasa). Para ello, empleando el protocolo propuesto por Gallo y col., (2018). En donde se utilizó 100 pmol de cada cebador (Tabla 5), 200 U de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase, 1X de buffer RT, 0,5 mM de los cuatro dNTPs, 20 U de inhibidor de RNAsas y de 100 a 500 ng. de ARN.

- **Prueba PCR**

Las reacciones fueron incubadas a 42°C por 60 min y finalmente la enzima se desactivó a 70°C por 10 min. De esta forma, se obtuvo 50-100 ng del ADNc para luego emplear en las reacciones de PCR en un volumen total de 25 µL, que contendrán 1 U de la enzima Taq DNA polymerase (INVITROGEN), 1X de buffer, 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de los cuatro dNTPs, 0,2 µM de los cebadores específicos para cada virus (Tabla5), y 1 µL de albumina de suero bovino (10 mg mL⁻¹). La amplificación se realizó en un termociclador T3 (Eppendorf Mastercycler NexusGSX1) y consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de: 94°C (30 s), 52°C (1 min) y 72°C (1 min); y una extensión final por 5 min a 72°C. La presencia de ampliaciones se observó por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% y tinción con GelRed 1X (Biotium, Fremont, CA, USA), donde se utilizó un visualizador de luz ultravioleta Bio Doc Analyze transilluminator (Kelsie J. Green, 2017)

Tabla 5. Cebadores empleados para la identificación molecular de agentes virales

Cultivo	Patógeno	Cebador	Se nti do	Secuencia	Referencia
Tomate	ToMV	ToMv3R	R	5'- CAACCCTAGTTAATTTTCGTTGG TG-3'	Aguado;(2014)
			F	5'- GCCATTGTTCTCCGGAAGATTC AG-3	
Naranja	NarCMV	TyMo3432R	R	CAGCTGACATTGGGAAATAGTC GG	Green y col,(2018)
			F	GAACGTATCTTTTGGCTCTCAC CC	
Tomate de árbol	TALMV	TaIMvRcl	R	5'- CAGAATCAGGCTGCATTTAATT TCC- 3'	Gallo;(2011)
			F	5'- CAACGCTTCCTTTAGCATTAGG -3'	
Alfalfa	AMV	AMVR2	R	5'- TCAATGACGATCAAGATCGTC- 3'	Jaramillo;(2011)

			F	5'- ATCATGAGTTCTTCACAAAAGA A-3'	
Naranja	NarCMV	Tymo1844R	R	GAACGTATCTTTTGGCTCTCAC CC	Green y col(2018)
			F	CAGCTGACATTGGGAAATAGTC GG	
papa	PTVR	PTVR	R	5'- ACGTCCAAAATGAGAATGCC-3'	Hernández; (2014)
			F	5'-TGGTGTTCTGTGAGACCT-3'	
Tomate de árbol	TALMV	TaIMvRCP	R	5'- CGCGCTAACAGAGTTCAGCC-3	Gallo;(2011)
			F	5- GCAATGGGGGTCCAACCTCAA CTCAT-3'	
Naranja	NarCMV	Tymo2612R	R	5'- TCAGGTTAGAGCAGACAGAGG- 3'	Green y col;(2018)
			F	5'- AGTTGCTGCATTCTTGAACAGG -3'	
Papa	PYVVV	PYVVRCP	R	5'- CGTCCACTGACATGATTGTTAC C-3	Muñoz;(2016)
			F	5'- CTCCACGACTGACCATTTTAGC -3''	

4.3.5 Análisis estadístico

La información obtenida en campo se colocó en el programa estadístico de Microsoft Excel para calcular las variables para este estudio, seguido de esto se utilizó el programa estadístico *InfoStat* para el respectivo análisis de la variable severidad, donde se empleó una prueba no paramétrica al no cumplir con los supuestos estadísticos, posterior a esto se realizó pruebas de comparación de medias empleando Kruskal- Wallis para obtener diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$), además de pruebas de Wilcoxon para identificar diferencia de daño entre especies por cada aislado viral.

5. Resultados

En el siguiente apartado se detallará las diferentes variables evaluadas para este estudio, tanto como la caracterización de los aislados virales y su etiología en el periodo de tiempo considerado para el presente estudio, además de la descripción detallada para las variables ya mencionadas en cuanto a incidencia para *S. quitoense* y *S. lasiocarpum* y severidad para las dos especies, también se describirá según los resultados estadísticos el daño ocasionado por los aislados virales provenientes de las cuatro localidades a las dos especies a considerarse para este estudio.

5.1 Caracterización de infecciones virales en *S. quitoense*

Las plantas de *Solanum quitoense* presentaron un patrón sintomatológico homogéneo con los aislados virales provenientes de las 3 localidades; Chiviaza; Zarambintza y San Jorge, a los 15 ddi (días después de la inoculación,) entre los síntomas que se pudieron apreciar en las unidades experimentales; mosaicos cloróticos alrededor de la superficie inoculada, seguido de encrespamiento y arrugamientos suaves en las hojas.

A los 35 ddi estos síntomas se mantuvieron y en algunos casos se presentó necrosamiento en las hojas nuevas, además de senescencia a nivel de toda las plantas, para la semana 8 a los 56 ddi, se observó en las hojas inoculadas necrosamiento en el margen de las hojas al igual que clorosis general y necrosamiento en la parte inoculada, a diferencia del testigo que se mantuvo sana a lo largo del periodo de observación (Figura 2).

Por otra parte el aislado viral correspondiente a la localidad de La Victoria, presentó sintomatología más imperceptible; a los 15 días posterior a la inoculación se evidenció mosaicos suaves y ligero encrespamiento en la zona inoculada, a partir de los 35 ddi, las hojas inoculadas presentaron clorosis general y apariencia corchosa en la nervadura principal, seguido de un necrosamiento y senescencia general de la planta hasta la semana 8 a los 56 ddi donde se mantuvo estos síntomas además de moteados en el área inoculada.

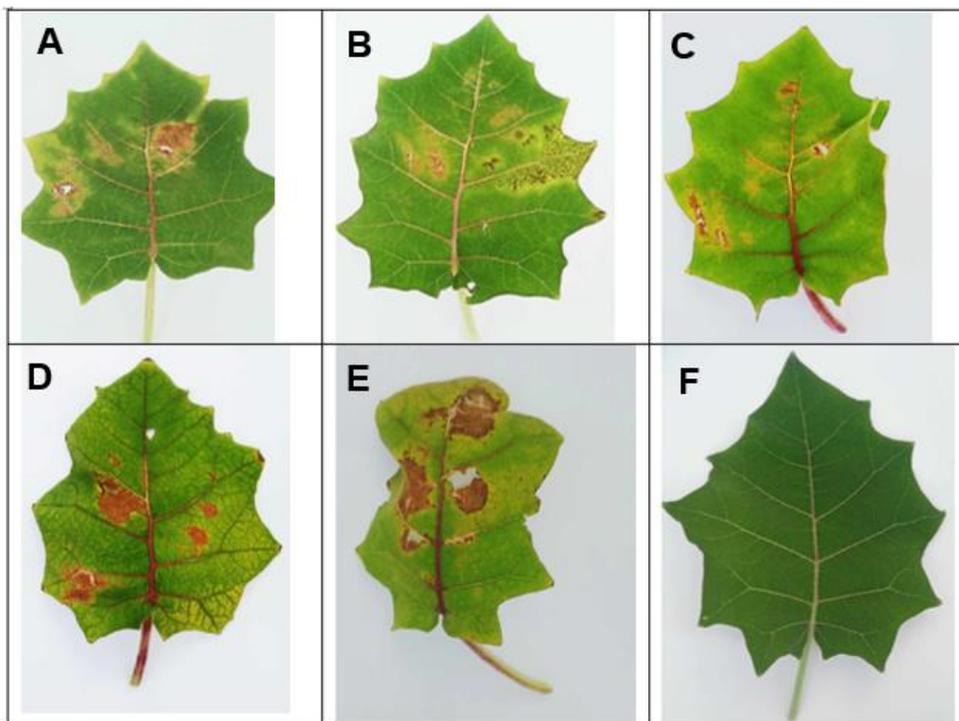


Figura 2. Síntomas ocasionados en *S. quitoense*; A) Anillos clorótico alrededor del área inoculada, B) Moteados y clorosis localizado, C) Clorosis y encrespamiento general en la hoja, D-E) Clorosis general, necrosamiento y enroscamiento de las hoja inoculada, F) Testigo asintomatológico.

5.2 Caracterización de infecciones virales en *S. lasiocarpum*

El aislado viral proveniente de Chiviaza, a los 15 ddi (días después de su inoculación) presento ligeros síntomas de virus, en las unidades experimentales se pudo apreciar encrespamiento leve, al igual que mosaicos cloróticos alrededor de la zona inoculada,

A la semana 5, a los 35 ddi se pudo apreciar un encrespamiento en las hojas adultas y nuevas, pero para la semana 8 a los 56 ddi, estos síntomas se mantuvieron sin mayor daño progresivo, en algunos casos se evidencio senescencia de las hojas inoculadas, con clorosis en el borde de las hojas y encrespamiento de estas.

Para los aislados de Zarambintza y San Jorge se apreció sintomatología similar, a los 15 ddi (días después de la inoculación), se observó un halo clorótico alrededor del área inoculada, además de encrespamientos suaves. A la semana 5 a los 35 ddi se observó clorosis moderada alrededor del área inoculada, para la semana 8 a los 56 ddi, en algunos casos se observó senescencia en algunas plantas, además de ligero encrespamiento en las hojas adultas nuevas, sin mayor daño hasta la última toma de datos.

Para el aislado viral de La Victoria, los síntomas observados a los 15 ddi, fue un halo clorótico alrededor del área inoculada, al igual que ligeros encrespamiento. A la semana 5, a los 35 ddi, se apreció necrosamiento en el área inoculada y mantenía su halo clorótico acompañado de un ligero encrespamiento, los síntomas se mantuvieron hasta la semana 8 a los 56 ddi donde no hubo mayor daño en las hojas. No hubo mayor daño donde se volvió imperceptible los síntomas hasta la última toma de datos (Figura 3).

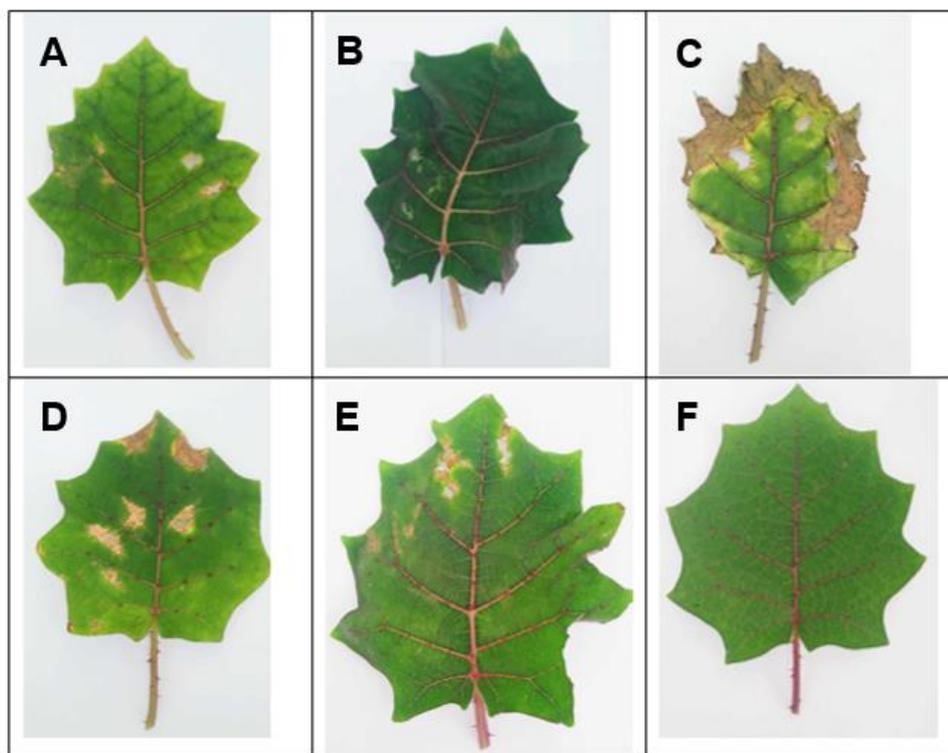


Figura 3. Síntomas desarrollados por los aislados virales en *S. lasiocarpum*; A) Clorosis internerval, B) Encrespamiento general en hojas jóvenes, C) Necrosamiento en los bordes de las hojas inoculadas, D) Anillos necróticos en las zonas inoculadas, E) Encrespamiento y clorosis leve en hojas jóvenes inoculadas F) Testigo sin sintomatología

5.3 Incidencia de los aislados virales en *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*

Para la especie *S. quitoense* entre las revisiones y observaciones realizadas, a las 8 semanas de la inoculación se pudo apreciar que en 17 de 24 unidades experimentales presentaron incidencia típica de virus, de las cuales 4 de 5 unidades experimentales presentaron sintomatología para el aislado viral 1 correspondiente de Chiviaza (A.v1), al igual que Zarambintza (A.v2) y San Jorge (A.v3) con la misma cantidad de unidades experimentales a diferencia del (A.v4) correspondiente a la localidad de La Victoria con 5 de 5 plantas que presentaron incidencia, por otra parte para el testigo (T) corresponde a 0 de 4 unidades experimentales como resultado no hubo incidencia alguna (Tabla 6). Por otra parte para *S.*

lasiocarpum, el aislado viral que obtuvo mayor incidencia fue de la localidad de La Victoria, presentando 4 de 5 plantas sintomatología viral, a diferencia de los aislados virales de las localidades de Chiviaza aislado viral (Av1), San Jorge (Av3) y Zarambintza (A.v2), siendo 3 de 5 plantas respectivamente que presentaron incidencia, para la semana 8 no hubo mayor daño y los síntomas se mantuvieron hasta tornarse imperceptibles a nivel de toda la planta para todos los aislados virales evaluados en esta especie, por otra parte el testigo (T) no presentó síntoma alguno dando un valor de 0 de 4 plantas en incidencia, dando un total de 13 de 24 unidades experimentales que presentaron incidencia en esta especie (Tabla 6).

Tabla 6. Incidencia general de las unidades experimentales en las dos especies evaluadas en la semana 8 de toma de datos.

AISLADO	INCIDENCIA	
	<i>S. quitoense</i>	<i>S. lasiocarpum</i>
Av1	4/5	3/5
Av2	4/5	3/5
Av3	4/5	3/5
Av4	5/5	4/5
T(Testigo)	0/4	0/4
Total	17/24	13/24

Av: aislado viral

Fuente: Autor

5.4 Severidad ocasionada por aislados virales en *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*

Al distinguir los datos de la variable severidad en función de los síntomas y daños presenciados en las unidades experimentales ocasionadas por los diferentes aislados virales, para evaluar cual fue más intolerante entre las dos especies en estudio, se procedió a desarrollar pruebas de normalidad y homocedasticidad, de las cuales cumplieron con los supuestos ($p > 0.005$), en el caso de normalidad presentaron valores ($p < 0.05$) por lo cual no hay normalidad entre sus datos, seguido de esto se procedió a hacer una prueba no paramétrica de comparación de Kruskal Wallis, se comprueba que existen diferencias en el daño entre las especies evaluadas.

5.4.1 Severidad de síntomas en *Solanum quitoense*.

Al cumplir con los supuestos estadísticos se procedió a realizar la respectiva prueba de análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal Wallis, para conocer si hubo diferencias

estadísticas entre los aislados virales (tratamientos) de los cuales se cumplió con el supuesto estadístico ($p < 0.0001$), obteniendo diferencias entre los aislados virales para esta especie. La severidad presente entre los aislados virales, se pudo verificar según las medias las diferencias entre los aislados virales y el testigo, mas no entre aislados virales, ya que estadísticamente presentaron el mismo valor.

5.4.2 Severidad de síntomas en *Solanum lasiocarpum*

Al cumplir con los supuestos estadísticos se procedió a realizar una respectiva prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para conocer si hubo diferencias estadísticas entre los aislados virales (tratamientos) de los cuales se cumplió con el supuesto estadística ($p < 0.05$), obteniendo diferencias entre los tratamientos para esta especie, del mismo modo la severidad entre tratamientos corresponde u mismo rango de medias entre aislados virales, más sin embargo difieren únicamente del testigo, mostrando diferencia estadística significativas entre aislados y testigo.

5.5 Evaluación de la severidad de los aislados virales entre especies

Tabla 7 Prueba de normalidad y homocedasticidad entre localidades

Localidades	Normalidad		Homocedasticidad	
	Shapiro Willks		Prueba de Levene	
	W	P-valor	F	p-valor
Chiviaza	0.882	0.009*	0.809	0.5347
Zarambintza	0.8215	<0.05*	1.159	0.3598
San Jorge	0.69	<0.05	0.33	0.0215
La Victoria	0.63	<0.05	1.62	0.3023

Fuente: Autor

5.5.1 Severidad provocada por el aislado viral de Chiviaza en *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*.

Al cumplir con los supuestos estadísticos, aplicamos una prueba no paramétrica de Wilcoxon para el primer grupo de datos para las dos especies, de los cuales resultaron significativos estadísticamente con un valor ($p < 0.05$) (Tabla 8) presentando que hubo diferencia de daño entre las especies evaluadas (Figura. 4).

Tabla 8 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de Chiviaza en las 2 especies

Clasificación	Media	W	p-valor
<i>S. quitoense</i>	2.80	308.00	0.0032
<i>S. lasiocarpum</i>	2.00		

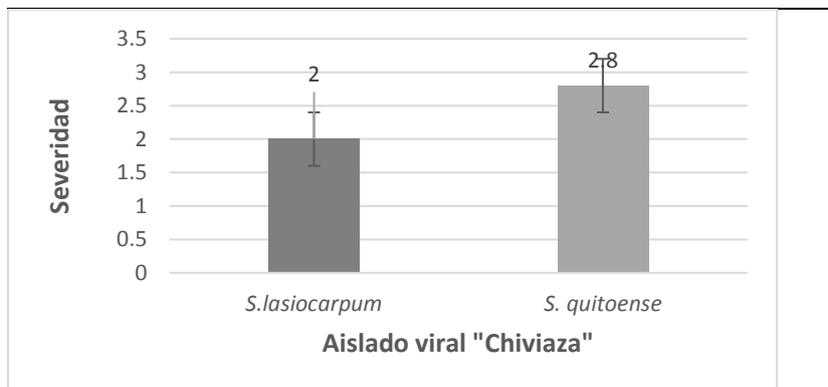


Figura 4. Severidad entre especies por el aislado viral de Chiviaza

5.5.2 Severidad provocada por el aislado viral de Zarambintza en *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*.

En el siguiente apartado se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para las dos especies a evaluar, de lo cual si hubo diferencias significativas entre las especies evaluadas donde se encontró significancia ($p < 0.05$), (Tabla 9) para el aislado viral de esta localidad (Figura.5).

Tabla 9 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de Zarambintza en las 2 especies evaluadas

Clasificación	Media	W	p-Valor
<i>S. quitoense</i>	3.37	302.00	0.0013
<i>S. lasiocarpum</i>	2.45	-0.42	

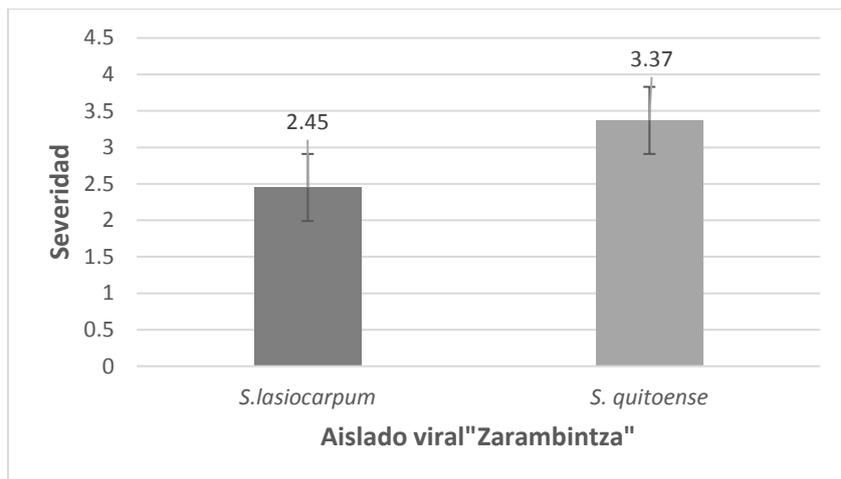


Figura 5. Severidad entre especies por el aislado viral de Zarambintza

5.5.3 Severidad provocada por el aislado viral de San Jorge en *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*

Para el caso de este aislado viral se realizó la respectiva prueba no paramétrica para evaluar si hubo diferencias estadísticas entre las dos especies evaluadas, las cuales constatan que no se presenta dicho principio ($p < 0.05$), (Tabla 10).

Tabla 10 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de San Jorge en las 2 especies evaluadas

Clasificación	Media	W	P-valor
<i>S. quitoense</i>	2.8	450.00	0.1790*ns
<i>S. lasiocarpum</i>	2.25		

*n.s=no significativo

5.5.4 Severidad provocada por el aislado viral de La Victoria en *S. quitoense* y *S. lasiocarpum*

El respectivo análisis de varianza para el presente aislado viral no se encontró diferencias estadísticas significativas, obteniendo un valor $p > 0.05$, indicando que no hubo diferencias estadísticas significativas en el nivel de daño entre las dos especies evaluadas (Tabla 11).

Tabla 11 Prueba de Wilcoxon correspondiente al aislado viral de La Victoria en las 2 especies evaluadas

Clasificación	Media	W	P-valor
<i>S. quitoense</i>	2.30	423.00	0.06665*ns
<i>S. lasiocarpum</i>	2.40		

n.s=No significativo

5.5.5 Identificación molecular de los aislados virales mediante la técnica RT-PCR

No se obtuvo amplificaciones con los cebadores empleados para las pruebas de PCR.

6. Discusión

Para el presente estudio se consideró que la importancia de los patógenos y de forma puntual en virus, son relevantes para el reporte, descripción y etiología de este grupo que afectan un amplio rango de especies de interés agrícola, que a su vez evoluciona y su rango de afectación puede ser mayor, además de convertirse en una interacción con otros agentes patológicos que causarían un problema irremediable, si bien el mundo de la virología es poco estudiado en nuestro país, pocas son las instancias que se dedican a un estudio a profundidad con el propósito de generar información con respecto a este grupo importante de patógenos que generan pérdidas considerables (Gallo y col., 2018).

En cuanto a la variable incidencia para el presente estudio se demostró que la especie *Solanum lasiocarpum* presenta menor influencia de los diferentes aislados virales de forma general, llegando a convertirse inapreciable a diferencia de la especie *Solanum quitoense* que demostró susceptibilidad en cuanto a los diferentes síntomas ocasionados por los aislados virales, esto se debe a una posible resistencia en algunas especie silvestres de la sección Lasiocarpa que tienen esa capacidad, autores como García y col., (2016), hablan de la capacidad de resistencia hacia agentes patógenos que cubren un umbral mínimo para lograr generar resistencia, caso contrario se vuelve inviable la capacidad de resiliencia contra un patógeno externo. Del mismo modo Muthamilarasan y Prasad., (2013) sostienen que, en las especies de papa silvestre (perteneciente al grupo de las solanáceas) se pueden distinguir varios tipos de resistencia natural a los virus y, por su aplicación en los procesos de mejoramiento, la producción de cultivares de papa resistente a los virus se hizo posible.

Las resistencias están codificadas por distintos genes y actúan contra una cepa de virus específica o un amplio espectro de cepas. Por otras parte Pérez y col., (2010) quienes argumentan que, la incidencia viral en el cultivo depende del virus, de la localidad y de la etapa fenológica del cultivo, es decir el medio, y el ciclo del cultivo determinan la capacidad de resistencia o susceptibilidad ante el ataque de un agente viral, siendo varios factores los que influirán sobre el desarrollo de ciertos aislados virales. Para Betancourth y col., (2007), considera a *S. sessiflorum* como una especie que presenta características de resistencia. Sin embargo, este mismo autor, menciona que *S. hirtum*, siendo una especie silvestre y estudiada también muestra características de resistencia a enfermedades típicas de la naranjilla, por lo

tanto, se dice 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, además Green y col., (2018) sugiere que, estas especies (sección *Lasiocarpa*) 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, concordando con el presente estudio en función a los síntomas y la incidencia que se volvieron imperceptibles para la especie *lasiocarpum* a diferencia de la especie *quitoense* en cuanto a la respuesta de los aislados virales.

Entre los síntomas que desarrollaron mayor severidad, está el aislado viral de Chiviaza donde presento: moteados, encrespamiento y necrosis entre los síntomas más notorios, dicha sintomatología se lo puede relacionar a CMV (Virus del mosaico de las cucurbitáceas), dicho síntomas son parecidos a los observados por Rojas y col., (2005), tales como mosaicos amarillos brillantes, epinastia, clorosis foliar marginal, abultamientos foliares, reducción del área foliar, enanismo, reducción en tamaño de los frutos hasta la abscisión floral en casos extremos que se los puede asociar debido al nivel de daño presencia en este trabajo, por otra parte según Thompson y col., (2015), se refieren a la 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 con al menos 1241 especies susceptibles en 101 familias de plantas que incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, entre ellas las solanáceas, llegando a cubrir un amplio grupo de especies de interés agrícola, y de arvenses en algunos casos. Además 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), siendo estos síntomas similares a los reportados en este primer aislado viral de esta localidad.

Para el caso del aislado viral de Zarambintza donde uno de los síntomas más representativos se pudo observar es la deformación de la lámina foliar hasta volverse en estado filiforme, acompañado además de anillos necróticos y un encrespamiento pronunciado se lo puede asociar una infección mixta entre PLRV y PVY ya que autores como Espinoza y col., (2017),

reportan en *S. betaceum* está sintomatología como la deformación de la hoja, se pudo observar necrosamiento de color café claro acompañado de un halo color amarillento a lo largo de los márgenes de las hojas. Los folíolos en estas condiciones presentaron además consistencia quebradiza, específicamente en el ápice de la hoja, al igual para Ayala y col., (2010), tomando en cuenta la deformación de la lámina foliar en *S. betaceum*, es el PVY, en conjunto a los síntomas observados siendo similares a lo obtenido en el presente trabajo.

Para el caso del aislado viral correspondiente a la localidad de San Jorge entre los síntomas que presentaron mayor severidad corresponden a moteados, seguidos clorosis internerval y encrespamiento a nivel del área inoculada, estos síntomas se los puede asociar a AMV (Virus del mosaico de la alfalfa). Para Pérez y Cruz, (2017) los síntomas que describe están enanismo y malformaciones con moteado, bronceado de las yemas terminales folíolos curvados hacia abajo, necrosis de la nervadura y manchas necróticas en hojas, más sin embargo se lo puede asociar también a Tamarillo Malformation Virus (TaMV). Espinoza, y col., (2017), sostienen que, los síntomas más representativos son ampollamiento y deformación foliar, siendo similar a lo observado en campo en este aislado viral una posible interacción entre estos dos grupos virales para este estudio.

Para el aislado viral correspondiente a la Victoria la sintomatología que se pudo apreciar fue clorosis general, encrespamiento moteados, y deformación foliar, estos síntomas son similares a lo reportado por Bonilla,(2016) en el TMV (Tobacco Mosaic Virus), originario de las plantas de tabaco y algunas malezas, este virus tiene una amplia gama de hospederos, se las encuentra con mayor frecuencia en solanáceas y cucurbitáceas, que al juntarse con el CMV, pueden llegar a ocasionar daños más severos y notorios, similar a lo reportado en nuestro estudio, donde se pudo apreciar dicha sintomatología.

En los tres casos resulta complejo definir puntualmente a que grupo de virus pertenece ya que son varios los factores que intervienen en la interacciones de los diferentes tipos de virus, como lo manifiestan 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, además Blancard, (1996) citado por Holguín Peña, R. J., (2004), señala de otros factores como la época del año, nutrición de la planta, manejo, vectores, etc., que varían de región en región, sustento que nos permite conocer la complejidad de este importante grupo de patógenos.

Mas sin embargo al realizar el respectivo análisis en cuanto a las variables consideradas para este estudio, entre aislados virales no se presentó diferencias significativas, al igual en los dos últimos casos entre especies, en daño y en la complejidad de caracterizar su

sintomatología siendo similar a lo reportado por Martínez (2021) en cuanto al daño ocasionado por los agentes virales y su expresión con la especie a evaluar, dicha información se lo puede sustentar a lo mencionado por Matthews (1993); Untiveros y col., (2007) citados por Zapata y col.(2011) en cuanto a este agente patológico, donde señalan que, 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 entre los grupos observados en este trabajo. Por ello se debe considerar el estudio a profundidad sobre la interacción de estos agentes causales para conocer de forma puntual como se expresan.

Conclusiones

Según los resultados obtenidos concluimos:

- En todos los casos se pudo evidenciar respuestas sintomatológicas asociadas a virosis, tales como: encrespamiento, deformación foliar, necrosamiento, clorosis internerval, y clorosis general, senescencia de las unidades experimentales y moteados.
- La incidencia de virosis en *Solanum quitoense* fue mayor que en *S. lasiocarpum*.
- *Solanum lasiocarpum* presentó menor daño que *Solanum quitoense* a nivel de los aislados virales de Chiviaza y Zarambintza, a diferencia de los aislados virales de San Jorge y la Victoria, que no mostraron mayor significancia a nivel de severidad.
- Se pudo asociar a CMV (virus del mosaico de las cucurbitáceas) el aislado viral de Chiviaza, según la sintomatología observada y la similitud de esta con lo descrito en obras anteriores, por otra parte para los aislados virales de Zarambintza, se lo puede asociar a una infección asociada a AMV (Virus del mosaico de la alfalfa) además de TaMV (Virus de la malformación de la hoja del tamarillo),
- El aislado viral de “San Jorge”, presentó una posible infección, de PLRV (Virus del enrollamiento de la hoja de la papa) y PVY (virus Y de la papa), según las características de los síntomas mostrados.
- El aislado viral de “La Victoria” se lo puede relacionar a TMV (Virus del mosaico del tabaco) y CMV (Virus del mosaico de las cucurbitáceas según los síntomas presentados).
- No se identificó molecularmente ningún virus ya que no se obtuvo amplificaciones con los primers empleados para este estudio.

Recomendaciones

- Profundizar estudios epidemiológicos y variables bióticos relacionados a la diseminación de patógenos virales relacionados a este cultivar en las localidades de la región oriental del país.
- Emplear marcadores moleculares para cada ensayo a realizar con la finalidad de identificarlos agentes virales.
- Realizar reinoculaciones mecánicas para mantener la vida útil de las muestras obtenidas en campo, previo a su evaluación e identificación
- Emplear el material obtenido de campo lo más breve posible para evitar daño y disminuir la virulencia del patógeno a evaluar
- Dar continuidad a la evaluación de especies se esta sección del género de las solanáceas nacionales de interés comercial y de investigación
- Caracterizar la sintomatología de cada agente viral y clasificar para obtener un criterio puntual previo a un reconocimiento en campo.

Referencias

- Acosta, O., Pérez, A., & y Vaillant, F. (2009). *Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (Solanum quitoense Lam.) cultivated in Costa Rica*. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 88-94.
- Álvarez, Daniela y Gutiérrez-Sánchez, Pablo y Marin, Mauricio. (2017). *Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PYVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección*. *Bioagro*. 29
- Andrade, J., Moreno, C., Bravo, J., Guijarro, M., Monar, V., Cevallos, C., & Concellón, a. (2016). *Efecto del estado de madurez sobre la calidad de tres variedades de naranjilla (Solanum quitoense Lam)*. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 2217-230.
- APS, S. A. (2014). *Recursos introductorios de patología vegetal*. APSnet. Introducción a los principales grupos de patógenos. <https://virtual.uptc.edu.co/>, 467.
- ASTA(2018) *Bettersedd.com*, recuperado de: <https://www.betterseed.org/wp-content/uploads/US6709-ASTA-CGMMV-Brochure-Addendum-SP-January-2018.pdf>
- Ayala, M., Gonzáles, P., Gutiérrez, P., Cotes, J., & Marín, M. (2010). *Caracterización serológica Y molecular de potyvirus asociados a la virosis del tomate de árbol en Antioquia*. Antioquia, *Acta Biológica Colombiana*
- Barzuna, L. (2000). *Identificación y subgrupos del virus del mosaico del pepino con anticuerpos monoclonales de ratón*. *Fitopatología*, 616-620.
- Bermeo, N. (2015). *EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A Fusarium oxysporum y Meloidogyne*. Quito: Universidad central del Ecuador.
- Bernal, J. (2004). *Cultivo de Lulo*. *Agrosavia.co*, 50-62.
- Betancouth C, G. R. (2003). *Caracterización biológica de un virus del tomate de árbol(Solanum betaceum)*. *Fitopatología*, 7-10.
- 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
- Blas, D., Borja, M., Saiz, M., & Romero, J. (1994). *Detección de amplio espectro del mosaico del pepino (CMV) mediante la reacción en cadena de la polimerasa*. *Phytopathol*, 323-329.

- Bohs, L. (2004). *A chloroplast DNA phylogenie of Solanum section Lasiocarpa. Sistematic both*, 177-187.
- Bonilla, L. (2016). *Descripción de la sintomatología de virosis en cucurbitáceas, solanáceas y arvenses*.
- Chen, B., & Francki, R. (1990). *La transmisión del cucumovirus por el pulgón Myzus persicae está determinada únicamente por la proteína de la cubierta viral. Gen. Virolog*, 939-94
- 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
- Eagles, Gardner, & Forster. (1994). *Incidence and distribution of six viruses infecting tamarillo (Cyphomandra betacea) in New Zealand. Crop Hortic* , 453-548.
- Espinoza, L. (2007). *Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecología molecular*, 517-526.
- Espinoza, D., Viera, W., Debut, A., Vásquez, W., & Ayala, L. (2017). *Virus diagnosis in tree tomato (Solanum betaceum Cav.) by RT-PCR and transmission electron microscopy in Pichincha and Tungurahua Provinces of Ecuador. Agronomía Colombiana*, 35-43.
- Esteva, J., & Nuez, F. (1991). *Enfermedades causadas por virus en el cultivo de melón*. ITEA, 111-125.
- Fletcher, J. (1987). . *New plant diseases records in New Zealand: Additional hosts of alfalfa mosaic virus and cucumber mosaic virus. New Zeal*, 505-506.
- Forster. (1786). *Florulae insularum australium prodromus*. Goettingenn, --
- Gallardo, A. (2005). *MÉTODOS DE MANEJO DEL CULTIVO DE NARANJILLA (Solanum quitoense Lam.) PARA EL CONTROL DE Fusarium oxysporum EN ECUADOR*. Quito: Estación experimental "Santa Catalina"-INIAP.
- 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
- García, D., Olarte, M., Gutiérrez, P., y Marín, M. (2016). *Detección serológica y molecular del Potato virus X (PVX) en tubérculos-semilla de papa (Solanum tuberosum L. y Solanum phureja Juz. Bukasov) en Antioquia, Colombia*. Revista Colombiana de Biotecnología, 18(1), 1-8. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.51389
- Gil; Ayala; Marín; González. (2009). *Identificación de potivirus en cultivos de tomate de árbol (Solanum betaceum) en Antioquia mediante detección serológica*. Rev Politécnica, 112-120.

- 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, W. (1972). *La relación de la naranjilla. Biotropica*, 77-84
- Heiser. (1996). 1996. *Plants and people*, 4-5.
- Heiser, Anderson. (1999). *Perspectivas de nuevos cultivos y nuevos usos*. Virginia-USA: ASHS-PRESS.
- Heiser, C. (1993). *The naranjilla (Solanum quitoense), the cocona (Solanum sessiliflorum) and their hybrid. Plenun Press*, 29-34.
- Hierro, N., Gonzáles, B., & Guillamon, J. (2006). "Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine". *Appl Environ Microbiol*, 7148-55.
- INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, E. (2010). *Manual del cultivo ecológico de la naranjilla*. Quito: Estación Experimental Santa Catalina.
- INIAP. (2011). *Naranjilla (Solanum quitoense Lam): Tecnologías para mejorar la productividad y la calidad de la fruta*. Quito: Estación Experimental Santa Catalina.
- Jaramillo, M., Álvarez, J., & Marín, M. (2013). *Características de los virus asociados a la virosis del tomate de árbol*. Revista Lasallista de Investigación, 115-127
- Kameya-Iwaky, M., & Murakami, K. (1987). . Semipersistencia de la transmisión de cucumovirus por Myzus persicae que infectan sistémicamente leguminosas. *Journal of virology Methods*, 233-247
- Matthews. (1991). *Virología de las plantas. Academic Press*, 835
- Martelli. (1996). *Clasificación y nomenclatura de virus en plantas; Estado del arte. Planr Dsit*, 436-442.
- Martínez, (2021) "Identificación molecular y caracterización de síntomas de aislados virales de naranjilla en 3 especies de la sección Lasiocarpa (S. quitoense, S. hirtum y S. sessiliflorum). Trabajo de titulación Universidad de Cuenca, <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/36771/6/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>
- Muthamilarasan, M. and Prasad, M. (2013): *Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism*. J. Biosci. 38, 433–449
- Nault, L. (1997). Transmisión por artrópodos de virus vegetales: una nueva síntesis. *Sociedad Americana de entología*, 521-541.
- Orlando, C., Pinzani, P., & Pazzagli, M. (1998). *Developments in quantitative PCR*. Clin Chem Lab Med . *Clin CHem Lab Med*, 255-69.

- Palukaitis, p., & Garcia-Arenal, F. (2003). *Virus del mosaico del pepino. Descripción de virus vegetales*, 400.
- Palukaitis, P., & Roossinck, M. (1992). *Virus del mosaico de las cucurbitáceas*. *AdvVirus Res*, 281-348
- Pérez, M. L., Navarro, L. M. J., Ramírez, M. R., & Mendoza, C. B. (2010). *Impacto e identificación de los virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad del ajo (Allium sativum L.), en el estado de Guanajuato, México*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 97-110
- 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.
- Pérez, V., & Cruz, M. (2017). *Identificación de malezas hospederas de los virus PVX, PVY, AMV y TICv, en las zonas productoras de tomate de árbol (solanum betaceum cav) del cantón Antonio Ante*. Ibarra: Universidad Técnica del Norte
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J. and Gilbertson, R. L. 2005. *Exploiting chinks in the plants armor: Evolution and emergence of Geminivirus*. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43: 361-394.
- Roossinck. (2002). Historia evolutiva del virus del mosaico del pepino deducida mediante análisis filogenéticos. *Virology*, 3382-3387
- Schultes, R. a.-C. (1962). *Frutos comestibles de Solanum en Colombia*. Harvard University, 235-286.
- Simons. (1985). *Las Solanaceas de Nueva Guinea*. *JourAdelaine Bot.*, 1-171
- Tamayo, J. (1996). *Enfermedades virales del tomate de árbol (Cyphomandra betacea (Cav.)*. *ASCOLFI*, 26-29.
- Whalen, M. D. (1981). *Taxonomy section Lacyocarpa. Gentes harbarum*, 41-129.
- Walker, W., & Ralph, R. (2009). Biotecnología y biología molecular. *Sociedad real de química*, 271
- Zaccomer, B., Haenni, A., & Macaya, G. (1995). *La variedad notable de genoma viral de ARN en plantas*. *Gen.Viro*, 66:1201-1207.
- Zitter, T., & Murphy, J. (2009). *Mosaico de pepino. El instructor de sanidad vegetal*. . DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01 , --.
- Zuluaga, M. (1996). Plagas y enfermedades del lulo(Solanum quitoense Lam.). *Instituto colomabiano Agropecuario*, 11:37-41.
- Zapata, M. J., Sánchez, P. A. G., Torres, J. M. C., Jaimés, 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 AgronomíaMedellín*, 64(1), 5831-5844

Anexos

Anexo A. 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 B. Protocolo de retro-transcripción (RT)

Concentración de los reactivos

Reactivo	Cc-inicial	Cc-final	V-final=20 μ L
ARN-Total	-	-	1
Agua DEPC	-	-	10
Primer específicos "R"	100 μ M	2 μ M	1 μ L
dNTP mix	100mM	10mM	2 μ L
Buffer SSIV	5X	1X	4 μ L
DTT	100 mM	10mM	1 μ L
Transcriptasa reversa	200U/ μ L	200 U	1 μ L

Procedimiento

1. Incorporar en un tubo Eppendorf de 200 μ L primers específicos "R", dNTP mix, ARN total hasta 5 μ g y agua hasta 13 μ L.
2. Mezclar y centrifugar brevemente.
3. Calentar la mezcla a 65°C por 5 minutos para desnaturalizar el ARN y luego incubar en hielo por 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 C. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Concentración de reactivos

Reactivo	Cc-inicial	Cc-final	V-final=25 µL
Buffer	10X	1X	2.5 µL
Mgcl2	50 mM	1.8mM	0.9 µL
Dntps	100mM	0.2 µM	8 µL
Agua DEPC	-	-	11.58 µL
Cebadores "R" y "F"	100 µM	0.2 µM	0.2 µM
ADNc	-	-	1 µL
Taq-polimerasa	200U/ µL200 u	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

- 95°C x 30''
- 40x 95°C x 30''
- 50°C x 45 ''
- 72°C x 1'
- 72°C x 5'

CMV

- 95°C x 3'
- 40x 94°C x 30''
- 52°C x 1'
- 72°C x 1'
- 72°C x 5'

ANSV

- 95°C x 3'
- 40x 94°C x 30''
- 52°C x 1'
- 72°C x 1'
- 72°C x 5'

TSWV

- 95°C x 3'
- 35x 94°C x 1'
- 55°C x 1'
- 72°C x 1,30'

PLRV

- 95°C x 5'
- 35x 94°C x 1'
- 55°C x 1'
- 72°C x 1'

AMV

- 94°C x 5'
- 35x 95°C x 30''
- 58°C x 3''
- 72°C x 30''

- 72°C x 10´

- 72°C x 10´

- 72°C x 7´

PVY

NarCMV

- 95°C x 5´

- 94°C x 4´

- 30x 92°C x 1´

- 40x 94°C x 45´´

- 57°C x 1´

- 55°C x 30´´

- 72°C x 1´

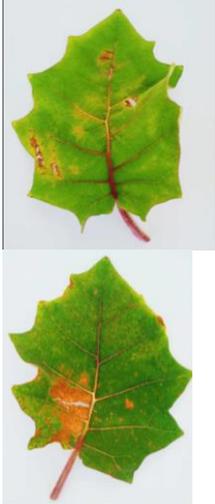
- 72°C x 45´´

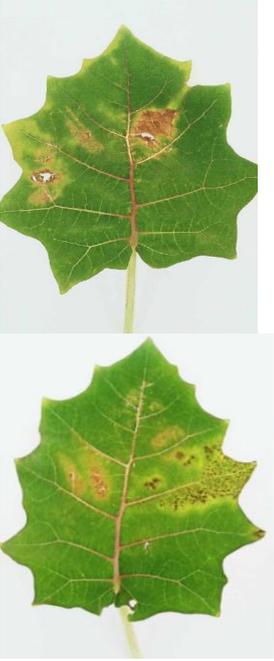
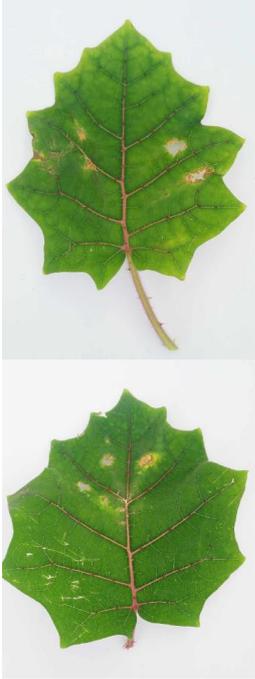
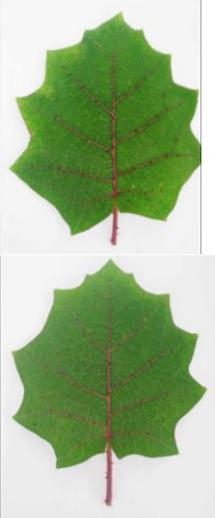
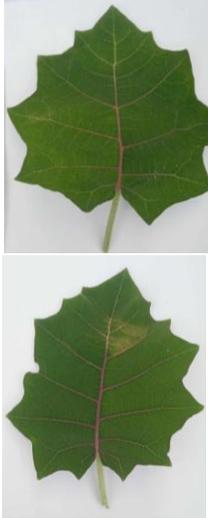
- 72°C x 10´

- 72°C x 10´

Anexo D. Resumen de síntomas obtenidos de los aislados virales en las dos especies

Aislado viral	<i>Solanum quitoense</i> (S.Q)	<i>Solanum lasiocarpum</i> (S.L.)	Sintomatología observada
Aislado viral1_Chiviaza			<p>SQ: Encrespamiento de la hoja infectada, necrosamiento y anillo clorótico alrededor del área inoculada, coloración bronceada, no presenta clorosis general ni internerval. Presenta necrosamiento en los ápices de la planta.</p> <p>SL: Encrespamiento moderado, anillo clorótico alrededor del área inoculada, clorosis y senescencia foliar A la semana 8 no hubo mayor daño a nivel de toda la planta.</p>

<p>Aislado viral2_Zarambintza</p>			<p>SQ: Clorosis internerval, Encrespamiento Anillos bronceados alrededor del área inoculada acompañada de un halo clorótico Presento necrosamiento en el ápice foliar SL: encrespamiento suave en las hojas inoculadas, anillos cloróticos alrededor del área inoculada, necrosamiento en el margen de las hojas, a la última semana no presente mayor daño progresivo</p>
<p>Aislado viral 3_San Jorge</p>			<p>SQ: Deformación foliar suave, encrespamiento medio clorosis general leve, necrosamiento en el área inoculada, coloración bronceada. SL: Encrespamiento suave, clorosis suave alrededor del área inoculada, encrespamiento leve. Presenta senescencia general hasta la semana 8 sin mayor daño progresivo a nivel de toda la planta.</p>

<p>Aislado viral4_La Victoria</p>			<p>SQ: Encrespamiento suave en toda la hoja, halo clorótico alrededor del área inoculada, moteados en las hojas inoculadas, clorosis y senescencia en las hojas inoculadas, sin mayor daño hasta la semana 8. Las UE, Presentaron una daño genera leve</p> <p>SL: Clorosis general suave, anillos cloróticos suaves alrededor del área inoculada, sin mayor daño hasta la semana 8, las UE no presentaron mayor daño</p>
<p>5_Testigo</p>			<p>Asintomaticos.</p>

Anexo E. Síntomas observados en las unidades experimentales en *S. quitoense*

Aislado viral	Síntomas generales observados	Síntomas observados en las unidades experimentales
Aislado viral La Victoria		
Aislado viral San Jorge		
Aislado viral Zarambintza		

<p>Aislado viral Chiviaza</p>		
-----------------------------------	---	--

Anexo F. Síntomas observados en *Solanum lasiocarpum*

<p>Aislado viral</p>	<p>Síntomas generales observados</p>	<p>Síntomas observados en las unidades experimentales</p>
<p>Aislado viral La Victoria</p>		
<p>Aislado viral San Jorge</p>		

Aislado viral Zarambintza		
Aislado viral Chiviaza		

Anexo G. Especies a evaluar en el presente trabajo.



Anexo H. Recorrido y reconocimiento de síntomas asociados a virosis.



Anexo I. Extracción de ARN



Anexo J. Prueba RT-PCR



Anexo K. Preparación de las unidades experimentales e inoculación en campo.

