



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TEMA

“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, PROVINCIA DE IMBABURA”

Trabajo de grado previo a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario

AUTORA:

Verónica Viviana Pérez Hernández

DIRECTORA:

Dra. Silvia Montes PhD.

Ibarra – Ecuador

2017

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**“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, PROVINCIA DE IMBABURA”**

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como
requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

APROBADO

Dra. Silvia Montes PhD.

DIRECTORA

Ing. Fernando Basantes MSc.

MIEMBRO TRIBUNAL

Ing. Juan Pablo Aragón MSc.

MIEMBRO TRIBUNAL

Ing. Iván Vaca MSc.

MIEMBRO TRIBUNAL



Ibarra – Ecuador
2017



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
Cédula de identidad:	040170744-3		
Apellidos y nombres:	Pérez Hernández Verónica Viviana		
Dirección:	San Pedro de Huaca		
Email:	vv_vero22viviph@hotmail.es		
Teléfono fijo:		Teléfono móvil:	0994164128

DATOS DE LA OBRA	
Título:	“IDENTIFICACIÓN DE MALEZAS HOSPEDERAS DE LOS VIRUS PVX, PVY, AMV Y TiCV, EN LAS ZONAS PRODUCTORAS DE TOMATE DE ÁRBOL (<i>Solanum betaceum</i> Cav) DEL CANTÓN ANTONIO ANTE, PROVINCIA DE IMBABURA”
Autora:	Pérez Hernández Verónica Viviana
Fecha:	22 de febrero del 2017
Solo para trabajos de grado	
Programa:	Pregrado
Título por el que opta:	Ingeniero Agropecuario
Directora:	Dra. Silvia Montes PhD.

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Pérez Hernández Verónica Viviana, con cédula de ciudadanía Nro. **040170744-3**; en calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 22 días del mes de febrero del 2017

AUTORA:

Pérez Hernández Verónica Viviana

C.I.: 040170744-3

ACEPTACIÓN:

Ing. Betty Chávez

JEFE DE BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, **Verónica Viviana Pérez Hernández**, con cédula de identidad Nro. 040170744-3; manifiesto la voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de propiedad intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor de la obra o trabajo de grado denominado **“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, PROVINCIA DE IMBABURA”**, que ha sido desarrollado para optar por el título de **INGENIERO AGROPECUARIO** en la Universidad Técnica del Norte, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los 22 días del mes de febrero del 2017

.....
Pérez Hernández Verónica Viviana

C.I.: 040170744-3

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Certifico que el trabajo titulado **“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, PROVINCIA DE IMBABURA”**, realizado en su totalidad por la Srta. Verónica Viviana Pérez Hernández ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas establecidas en el reglamento de estudiantes de la Universidad Técnica del Norte, como requerimiento parcial a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario.

Ibarra, a los 22 días del mes de febrero del 2017



.....
Dra. Silvia Montes PhD.

Directora de Trabajo de Grado

C.I.: 175205207-4

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Güía: FICAYA-UTN

Fecha: 22 de febrero del 2017

Pérez Hernández Verónica Viviana “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, provincia de Imbabura” / TRABAJO DE GRADO. Ingeniero Agropecuario.

Universidad Técnica del Norte. Ibarra, 22 de febrero del 2017. 77 páginas.

DIRECTORA: Dra. Silvia Montes PhD.

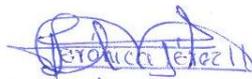
La presente investigación se orientó en generar información técnica científica sobre la presencia de los virus PVX, PVY, AMV y TiCV en malezas asociadas al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) en el cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura, con la finalidad de determinar puntualmente las malezas hospederas de mencionados patógenos y su incidencia en las distintas poblaciones mediante la técnica de Hibridación Molecular no Radioactiva tipo *dot- blot* utilizando sondas individuales de los virus en estudio, y de esta manera contribuir a la producción de tomate de árbol del sector.

Fecha: 22 de febrero del 2017



.....
Dra. Silvia Montes PhD.

Directora de Trabajo de Grado



.....
Pérez Hernández Verónica Viviana

Autora

PRESENTACIÓN

La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, corresponde exclusivamente al autor; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica del Norte, exclusivamente a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria.

El presente trabajo se lo realizó con la finalidad de determinar puntualmente las 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, provincia de Imbabura y además como material de apoyo para futuras investigaciones.

VERÓNICA PÉREZ HERNÁNDEZ.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación lo dedico a Dios, por darme la oportunidad de vivir y por ser mi guía en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo académico.

A mi hijo Darickson por quien cada día tiene sentido, el testigo silencioso de mis luchas cotidianas en busca de un mejor futuro, a él mi esperanza, mi alegría, mi vida y la culminación de este trabajo y lo que representa.

Con todo amor y cariño a mis padres y hermanas el pilar fundamental que me sostiene, por su apoyo incondicional, por el consejo sabio y oportuno. A ellos dedico cada día de esfuerzo para culminar con éxito esta hermosa etapa de mi vida.

VERÓNICA PÉREZ.

AGRADECIMIENTO

*A Dios por darme el preciado don de la vida, por su infinito amor y bondad, por guiar y bendecir mi camino.
A mi familia en especial a mis padres por su apoyo incondicional, por sus valores inculcados en mi persona,
por ayudarme a vencer todo obstáculo, por todos sus sacrificios y esfuerzos que hicieron posible que
concluya con éxito esta etapa de mi vida.*

*A la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte,
a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, por darme la oportunidad de estudiar y lograr el sueño anhelado de
ser una profesional.*

*De manera muy especial quiero agradecer a la Dra. Silvia Montes PhD, directora, MSc. Fernando
Basantes, MSc. Juan Pablo Aragón, MSc. Iván Vaca, asesores, por su apoyo, consejos y conocimientos
brindados para la culminación de este trabajo de grado.*

*De todo corazón agradezco al MSc. Javier Colimba, MSc. Raúl Castro, Ing. Eddy Falcón, Sr. Daniel
Rivera y al Dr. Gustavo Gómez PhD ya que sin su apoyo, colaboración y enseñanzas no hubiese sido
posible realizar este trabajo de investigación. Ya todos los docentes y amigos, que aportaron con un granito
de arena en mi formación como profesional en todo el transcurso universitario.*

VERÓNICA PÉREZ.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	XI
SIGLAS.....	XVII
RESUMEN	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. ANTECEDENTES	4
2.2. TOMATE DE ÁRBOL	7
2.2.1. Origen.	7
2.2.2. Producción a nivel mundial.	8
1.1.1. Situación de la producción de tomate de árbol en el país.	8
2.2.3. Plagas.	9
2.2.4. Enfermedades.....	10
2.3. MALEZAS	12
2.3.1. Definición de maleza.	12
2.3.2. Daños ocasionados por malezas.....	12
2.3.3. Clasificación de las malezas.	13
2.4. VIRUS	13
2.4.1. Características generales.....	13
2.4.2. Composición y estructura.	14
2.4.3. Infección y síntesis virales.	15
2.4.4. Translocación y distribución de los virus en las plantas.....	16
2.4.5. Transmisión de los virus.	17
2.4.5.1. Tipos de transmisión de virus.	17
2.4.6. Clasificación de los virus.	19
2.5. VIRUS X DE LA PAPA (PVX)	20
2.5.1. Descripción.	20
2.5.2. Sintomatología.	20

2.5.3.	Variabilidad intraespecífica.	21
2.5.4.	Transmisión.....	21
2.6.	VIRUS Y DE LA PAPA (PVY)	21
2.6.1.	Descripción.	21
2.6.2.	Sintomatología.	21
2.6.3.	Variabilidad intraespecífica.	23
2.6.4.	Transmisión.....	23
2.7.	VIRUS DEL MOSAICO DE LA ALFALFA (AMV)	23
2.7.1.	Descripción.	23
2.7.2.	Sintomatología.	24
2.7.3.	Transmisión.....	24
2.8.	VIRUS DE LA CLOROSIS INFECCIOSA DEL TOMATE (TICV)	25
2.8.1.	Descripción.	25
2.8.2.	Sintomatología.	25
2.8.3.	Transmisión.....	26
2.9.	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE VIRUS	26
2.9.1.	Ensayos biológicos.....	26
2.9.2.	Técnicas serológicas o inmunoquímicas.....	26
2.9.2.1.	Técnica inmunoenzimática ELISA.	27
2.9.2.2.	Inmunoimpresión-ELISA.	27
2.9.3.	Microscopía óptica y electrónica.	27
2.9.4.	Técnicas moleculares.	28
2.9.4.1.	Hibridación de ácidos nucleicos.	29
2.9.4.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	30
CAPÍTULO III.....		32
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1.	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	32
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS	32
3.2.1.	Materiales de campo.	32
3.2.2.	Equipos de laboratorio.	32
3.2.3.	Equipos de oficina.....	33
3.2.4.	Materiales de laboratorio.	33
3.2.5.	Insumos de laboratorio.....	33
3.3.	MÉTODOS	34

3.3.1. Tipo de investigación.....	34
3.3.2. Diseño de investigación.	34
3.4. VARIABLES EVALUADAS	34
3.4.1. Tipos de malezas más frecuentes.....	34
3.4.2. Presencia de virus en malezas.....	35
3.4.3. Nivel de incidencia de cada uno de los virus encontrados, según el tipo de malezas y localidad.....	35
3.5. MANEJO ESPECÍFICO DEL ESTUDIO	35
3.5.1. Delimitación del área de muestreo.....	35
3.5.2. Registro de malezas.	35
3.5.3. Recolección de muestras en el campo.	36
3.5.4. Protocolo de procesamiento de muestras.....	37
3.5.4.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	37
3.5.4.2. Inmovilización de los ácidos nucleicos en la Membrana de Nylon.....	37
3.5.4.3. Proceso de hibridación.....	37
CAPÍTULO IV.....	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. TIPOS DE MALEZAS ENCONTRADAS	39
4.2. PRESENCIA DE VIRUS EN MALEZAS.....	43
4.2.1. Detección del virus X de la papa (PVX).....	43
4.2.2. Detección del virus Y de la papa (PVY).....	45
4.2.3. Detección del virus del mosaico de la alfalfa (AMV).	48
4.2.4. Detección del virus de la clorosis infecciosa del tomate (TiCV).....	49
4.3. NIVEL DE INCIDENCIA DE CADA UNO DE LOS VIRUS ENCONTRADOS, SEGÚN EL TIPO DE MALEZA Y LOCALIDAD	51
CAPÍTULO V.....	53
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55
ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de un virus	15
Figura 2. Inoculación mecánica y primeras etapas de la distribución sistémica de los virus en las plantas.....	16
Figura 3. Dirección y velocidad de translocación de un virus en una planta.....	17
Figura 4. Malezas con mayor porcentaje de frecuencia identificadas en el área de estudio. A) <i>Chenopodium album</i> , B) <i>Malva parviflora</i> y C) <i>Galinsoga quadriradiata</i>	41
Figura 5. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota, donde se puede observar que ninguna de las muestras se coloreó. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior derecha de la membrana resultó positiva	43
Figura 6. Muestras con presuntos síntomas de PVX. A) Ortejuela (no identificada) recolectada en Natabuela, B) <i>Malva parviflora</i> recolectada en Chaltura, C) <i>Malva parviflora</i> recolectada en Natabuela, D) <i>Ipomoea purpurea</i> recolectada Chaltura, E) <i>Ipomoea purpurea</i> recolectada en Natabuela, F) <i>Bidens pilosa</i> recolectada en San Roque G) <i>Digitaria sanguinalis</i> recolectada en Natabuela.....	44
Figura 7. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota. Las muestras de <i>Solanum nigrum</i> recolectadas en las tres parroquias resultaron positivas. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior izquierda y derecha de la membrana.....	46
Figura 8. Muestras con síntomas y resultados positivos al virus PVY. A) <i>Solanum nigrum</i> recolectada en Natabuela, B) <i>Solanum nigrum</i> recolectada en Chaltura, C) <i>Solanum nigrum</i> recolectada en San Roque, D) <i>Solanum nigrum</i> recolectada en San Roque, E) <i>Solanum betaceum</i> recolectada en cultivo de San Roque	47
Figura 9. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota. Las muestras de <i>Solanum betaceum</i> y <i>Medicago sativa</i> resultaron positivas. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior derecha de la membrana.....	48
Figura 10. Muestras sintomáticas con resultados positivos al virus AMV recolectadas en Natabuela. A) <i>Solanum betaceum</i> , B) <i>Medicago sativa</i> como planta voluntaria	48
Figura 11. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota, no hay reacción positiva. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior derecha de la membrana.....	49
Figura 12. Muestra de <i>Chenopodium album</i> recolectada en el área de estudio con síntomas similares a los ocasionados por TiCV.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características del genoma y morfología de la partícula de los virus en estudio.....	20
Tabla 2. Clasificación por familia y formas de crecimiento de malezas más predominantes en las zonas productoras de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav) en el área de estudio	39
Tabla 3. Frecuencia de malezas en las zonas productoras de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav) en el área de estudio.....	40
Tabla 4. Resumen de presencia de virus en malezas	50
Tabla 5. Resumen de presencia de virus en alfalfa como planta voluntaria y cultivo de tomate de árbol.....	50
Tabla 6. Incidencia del PVY según el tipo de maleza y localidad.....	51
Tabla 7. Incidencia del PVY en el cultivo y localidad	51
Tabla 8. Incidencia del AMV según el tipo de maleza y localidad	51
Tabla 9. Incidencia del AMV en el cultivo y localidad	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ubicación del área de estudio.....	68
Anexo 2. Ubicación de los puntos de muestreo	69
Anexo 3. Proceso de hibridación molecular con sondas de RNA	70
Anexo 4. Croquis de muestras impregnadas en membrana de nylon	71
Anexo 5. Certificado de análisis de muestras	72
Anexo 6. FOTOGRAFÍAS	73

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Recorridos de campo	73
Foto 2. Toma de datos.....	73
Foto 3. Distribución de malezas en parches	73
Foto 4. Recorrido del lote de producción.....	73
Foto 5. Reconocimiento de malezas	73
Foto 6. Maleza identificada	73
Foto 7. Registro de malezas	74
Foto 8. Inventario de malezas.....	74
Foto 9. Identificación de síntomas de virus	74

Foto 10. Recolección de muestra de follaje	74
Foto 11. Empaque del tejido vegetal	74
Foto 12. Identificación de la muestra	74
Foto 13. Maleza con posibles síntomas de virus.....	75
Foto 14. Planta de tomate de árbol con posibles síntomas de virus.....	75
Foto 15. Insectos vectores de virus presentes en malezas.....	75
Foto 16. Insectos vectores de virus presentes en planta de tomate de árbol	75
Foto 17. Preparación de tampón de extracción	75
Foto 18. Tampón de extracción	75
Foto 19. Muestras congeladas	76
Foto 20. Descongelación de muestras.....	76
Foto 21. Trituración de muestras	76
Foto 22. Tejido triturado.....	76
Foto 23. Ácidos nucleicos	76
Foto 24. Centrifugación de ácidos nucleicos.....	76
Foto 25. Inmovilización de ácidos nucleicos.....	77
Foto 26. Membrana de nylon impregnada.....	77
Foto 27. Tampón de pre hibridación	77
Foto 28. Tubo de hibridación	77
Foto 29. Tambor de hibridación	77
Foto 30. Horno de hibridación	77

SIGLAS

- **AMV**: virus del mosaico de la alfalfa
- **ADN**: ácido desoxirribonucleico
- **cDNA**: ADN complementario
- **cRNA**: RNA complementario
- **EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético
- **Kb**: kilobase
- **M**: concentración molar
- **NaCl**: cloruro de sodio
- **Nm**: nanómetro
- **Nt**: nucleótido
- **PVX**: virus X de la papa
- **PVY**: virus Y de la papa
- **RNA**: ácido ribonucleico
- **SDS**: dodecil sulfato sódico
- **Tris-HCL**: Tris-Hydrochloride
- **TiCV**: virus de la clorosis infecciosa del tomate
- **µg**: microgramo
- **µl**: microlitro

“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, PROVINCIA DE IMBABURA”

Autora: Verónica Viviana Pérez Hernández

Directora de tesis: Dra. Silvia Montes PhD.

Año: 2017

RESUMEN

La presente investigación se realizó en las zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) del cantón Antonio Ante (2200 msnm), provincia de Imbabura, con la finalidad de identificar las malezas hospederas del virus PVX, PVY, AMV y TiCV. Los objetivos específicos fueron; registrar las malezas más frecuentes, establecer la presencia de los virus en las malezas y determinar el nivel de incidencia de cada uno de los virus, según el tipo de malezas y localidad; para lo cual se llevó a cabo un muestreo dirigido a plantas sintomáticas y asintomáticas. Se recolectaron 117 muestras de malezas, adicionalmente se tomaron siete muestras de tomate de árbol y una de planta voluntaria. Las muestras se analizaron por el método de hibridación molecular no radioactivo tipo *dot-blot* (2 µl de ácidos nucleicos en membranas de nylon) utilizando sondas individuales de los virus en estudio. Los resultados indicaron que las malezas más frecuentes fueron *Chenopodium álbum*, *Malva parviflora* y *Galinsoga quadriradiata*. Se estableció la presencia del virus Y de la papa (PVY) en *Solanum nigrum* con una incidencia del 33% en Natabuela y Chaltura y un 66,7% en San Roque; además existe presencia de PVY en *Solanum betaceum* con una incidencia del 100% en San Roque. El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) fue identificado en *Medicago sativa* como planta voluntaria con una incidencia del 100% y en *Solanum betaceum* con una incidencia del 33,3% en Natabuela.

Palabras clave: PVX, PVY, AMV, TiCV, *Solanum betaceum*, maleza, virus, Hibridación molecular no radioactiva, sondas individuales.

**“IDENTIFICATION OF THE VIRUS HOST WEEDS PVX, PVY, AMV AND TiCV,
IN AREAS PRODUCING OF TREE TOMATO (*Solanum betaceum* Cav) ANTONIO
ANTE CANTON, PROVINCE OF IMBABURA”**

Author: Verónica Viviana Pérez Hernández

Thesis Director: Dra. Silvia Montes PhD.

Year: 2017

ABSTRACT

This research was conducted in the producing areas of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav) of the canton Antonio Ante (2200 MASL), province of Imbabura, in order to identify the hosting weeds for the viruses PVX, PVY, AMV and TiCV. The specific objectives were: record the most frequent weeds, establish the presence of the viruses in the weeds and determine the level of incidence in each of the viruses, depending on the type of weeds and location; for which a sampling was carried out directed to symptomatic plants and asymptomatic plants. We collected 117 weed samples; in addition, seven samples were taken from tree tomato and one of the voluntary plant. The samples were analyzed by the molecular hybridization method non-radioactive type dot-blot (2 µl of nucleic acids in nylon membranes) using individual probes of the viruses in the study. The results indicated that the most frequent weeds were; *Chenopodium album*, *Malva parviflora* and *Galinsoga quadriradiata*. The presence of potato virus Y was established (PVY) in *Solanum nigrum* with an incidence of 33% in Natabuela and Chaltura and a 66,7% in San Roque; in addition, there was found the presence of PVY in *Solanum betaceum* with an incidence of 100% in San Roque. The alfalfa mosaic virus (AMV) was identified in *Medicago sativa* as a volunteer plant with an incidence of 100% and in *Solanum betaceum* with an incidence of 33,3% in Natabuela.

Keywords: PVX, PVY, AMV, TiCV, *Solanum betaceum*, weeds, viruses, Non-radioactive molecular hybridization, individual probes.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el tomate de árbol es un frutal de notable rentabilidad, con rendimientos que oscilan entre 60 y 80 toneladas por hectárea/año en condiciones óptimas, constituyendo actualmente un cultivo de gran importancia económica, debido a la creciente demanda para consumo en fresco y uso agroindustrial, gracias a sus características físicas, nutritivas y organolépticas (Barriga, 2012; Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2010). El consumo per cápita para el año 2009 se extendió a 1,98 kg/persona/año, en comparación con el año 2007 en el cual el consumo fue de 0,90 kg/persona/año (Lucas, Maggi y Yagual, 2011).

El libre comercio en el Pacto Andino y en general a nivel mundial, así como la expectativa en mercados de Europa han abierto algunas perspectivas de crecimiento, desarrollo y exportación de frutos andinos, principalmente de tomate de árbol, mismo que por su rentabilidad en pequeñas áreas, ha dado oportunidad de sustento a muchas familias ecuatorianas (Pilco, 2009; Cabrera y Wilson, 2012). Paredes (2007) indicó que, la producción de tomate de árbol es una actividad importante para los productores del Cantón Antonio Ante, con opciones serias en el mercado local y nacional.

La producción de tomate de árbol está confinada a pequeños y medianos productores de la zona Sierra del Ecuador, mismos que han presentado grandes limitantes fitopatológicas para expansión del cultivo como para la exportación de fruta (Viera et al., 2015), entre las que se destacan los virus. La virosis es una de las causas que limitan la producción, ya que reduce la cantidad, calidad de fruta producida y el período productivo de los árboles (Álvarez, Cotes y Marín, 2011). Los virus son los responsables de importantes pérdidas económicas en plantaciones de tomate de árbol. En Ecuador se han presentado epidemias virales que han causado pérdidas hasta del 50% en algunos cultivos (Jaramillo, Álvarez y Montoya, 2012).

Las plantaciones de tomate de árbol de la provincia de Imbabura, están siendo afectadas por enfermedades de tipo viral con una incidencia del 69%. En las localidades de San José de Chaltura, San Francisco de Natabuela y San Roque, la incidencia promedio de virus asciende al 80%, lo que se considera como un serio problema. Los virus que están afectando a este cultivo son; el virus X de la papa (PVX), el virus Y de la papa (PVY), el virus del mosaico de

la alfalfa (AMV), y el virus de la clorosis infecciosa del tomate (TiCV) (J. E. Colimba, comunicación personal, 18 de mayo, 2015).

Las malezas actúan como hospederos alternativos de virus, por lo que son un factor clave en la epidemiología al servir de fuente de inóculo primario para su transmisión vía vector biológico a las plantas cultivadas (Fiscal y Vaca, 2012). Sin embargo no existen estudios documentados que reporten puntualmente cuales son las especies hospederas de dichos virus, ni su incidencia en las distintas poblaciones de malezas, razón por la cual no se ha podido hacer un control en la diseminación de estas enfermedades.

Por tales razones se plantea la presente investigación que logrará generar información para establecer la epidemiología de estos patógenos y poder diseñar futuras estrategias de control fitosanitario. Los principales beneficiarios de esta investigación serán los productores de tomate de árbol del cantón Antonio Ante e Imbabura, ya que contarán con información generada en base a resultados científicos de avance que permitan reducir al máximo las afectaciones producidas por los virus y así, poder obtener frutos cada vez más sanos y de mejor calidad que tengan un alto valor comercial; con el fin de que en un futuro se logre abrir las puertas a nuevas oportunidades de comercialización y se pueda llegar a exportar el producto. De este modo se contribuirá a la transformación de la matriz productiva; impulsando la producción y la productividad de forma sustentable.

El objetivo general de este estudio fue: identificar las 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, provincia de Imbabura.

Además, se plantearon tres objetivos específicos:

- Registrar las malezas más frecuentes en las zonas productoras de tomate de árbol.
- Establecer la presencia de los virus PVX, PVY, AMV y TiCV en las malezas encontradas en las plantaciones de tomate de árbol del área de estudio.
- Determinar el nivel de incidencia de cada uno de los virus encontrados, según el tipo de maleza y localidad.

Por consiguiente se establecieron las siguientes preguntas directrices:

- ¿Cuáles son las malezas más frecuentes en las zonas productoras de tomate de árbol?
- ¿Cuáles de los virus en estudio están presentes en las malezas encontradas en las plantaciones de tomate de árbol?
- ¿Cuál es el nivel de incidencia de cada uno de los virus encontrados, según el tipo de maleza y localidad?

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

En el mundo solo existen reportes de virus en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) en Nueva Zelanda, Colombia y Ecuador. En el primer país, en un estudio sobre la incidencia y la distribución de los seis virus que infectan tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), se ha identificado el virus TaMV (*Potyvirus*), CMV (*Cucumovirus*), PAMV (*Potexvirus*), AMV (*Alfamovirus*) y TSWV (*Tospovirus*) (Eagles, Gardner & Forster, 1994).

En Colombia se han reportado necrosis anular en el departamento de Boyacá, síntomas virales en el Valle de Sibundoy (1989), plantas con mosaicos en Rionegro y Marinilla (1990), “virosis” del tomate de árbol caracterizada por presencia de mosaicos, engrosamiento de nervaduras, ampollas y formación de rosetas en Santa Rosa de Osos (1991) y Oriente Antioqueño (1992), en el Valle del Cauca se ha reportado una posible especie del género *Potyvirus*. Posteriormente por medio de las pruebas ELISA, RT-PCR y secuenciación de la cápside viral, se ha reportado en el municipio de Córdoba, un complejo viral constituido por PVY (*Potyvirus*), CMV (*Cucumovirus*), ToMV (*Tobamovirus*) y PLRV (*Polerovirus*) que generan diversidad de sintomatologías en este cultivo (Rodríguez, Jaramillo, Lagos, Gutiérrez y Montoya, 2011).

Por último en siete regiones productoras de tomate de árbol de Antioquia han detectado la presencia de un complejo viral, al identificar la presencia de los virus AMV, CMV, PLRV, ToRSV y de los *Potyvirus* PVY y TaMLV en diferentes cultivos de este departamento con síntomas de "Virosis", siendo los *Potyvirus* (detectados con anticuerpos universales para este grupo), el CMV y el PLRV los de mayor incidencia con niveles promedio de 76%, 57 y 41%, respectivamente (Cuspoca y Jaramillo citados por Jaramillo et al., 2012).

En Ecuador, el principal virus identificado es el virus del amarillamiento del tamarillo (TaMV), el cual por su forma, tamaño y transmisión no persistente por el áfido *Myzus persicae*, pertenece al grupo de los *Potyvirus*. Serológicamente es cercano al virus PVY (Mora, Gallegos, Revelo y Garcés, 2008).

Además se han presentado epidemias virales que han ocasionado pérdidas de hasta el 50% de la producción, detectándose los virus: Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus del Mosaico de las Cucurbitáceas (CMV), Virus del Mosaico del Tomate de Árbol (TaMV), Virus del Mosaico del Tomate (TMV), Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (TSWV) y Tomato ringspot virus (ToRSV, *Nepovirus*). También se han encontrado AMV, PLRV (*Polerovirus*), ToRSV, PVY (*Potyvirus*) y TMV (Vizueté, Insuasti, Ochoa & Ellis, 1990).

Por otro lado, se ha reportado la presencia de un posible nuevo virus del género *Potyvirus* con una sintomatología de ampollamientos, mosaicos, deformación de hojas, aclaramiento de venas, ondulamiento de hojas (Insuasti y Ochoa, 2005).

Espinoza (2014), identificó el complejo que está presente actualmente en tomate de árbol, utilizando la técnica RT-PCR y adicionalmente el análisis de los virus mediante microscopía electrónica. Los resultados indicaron la presencia de tres virus en el valle de Tumbaco (PLVR, PVY y ToMV) y dos virus en el cantón Pelileo (PLVR y PVY).

En estudios recientes realizados en cultivos comerciales de tomate de árbol en la provincia de Tungurahua, mediante la técnica TAS-ELISA y a continuación, mediante RT-PCR, reportan por primera vez el virus PVY (*Virus Y de la papa*) con una sintomatología de mosaico de color amarillo, manchas necróticas en las hojas, retraso en el crecimiento y manchas marrones en las frutas (Sivaprasad, Viera, Patricia & Orbe, 2016).

Finalmente en un estudio realizado en plantaciones de tomate de árbol ubicadas en Natabuela y Chaltura, se determinó que los virus que están afectando al cultivo son el virus Y de la papa (PVY), el Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), el virus X de la papa (PVX) y el Virus de la Clorosis Infecciosa del Tomate (TiCV) (J. E. Colimba, comunicación personal, 18 de mayo de 2015).

En cuanto a malezas hospederas de virus existen reportes en Costa Rica, Chile y Jordania. En Costa Rica, se realizó un estudio sobre la detección de virus en plantas silvestres asociadas con el tomate y chile dulce, y por medio de la técnica DAS-ELISA se identificó a *Bidens pilosa*, *Browallia americana*, *Conyza sp.*, *Galinsoga sp.*, *Ipomea sp.*, *Melampodium sp.*, *Richardia scabra* y *Spermacoce laevis* como hospederas del virus moteado leve del chile (PMMV); *Ipomea sp.* resultó hospedera del virus X de la papa (PVX); *Melampodium sp.* es hospedera del virus Y de la papa (PVY); *Bidens pilosa*, *Browallia americana*, *Desmodium sp.*,

Lantana sp., *Richardia scabra*, *Sida rhombifolia* y *Spermacoce latifolia* fueron hospederas de *Geminivirus* (GV) (Rivas, Ramírez, Hilje y Cubillo, 1995).

En Chile en una investigación realizada sobre la presencia de diferentes virus del pimiento (*Capsium annuum* L.) en especies de malezas asociadas al cultivo, en la Región de Coquimbo, utilizando la prueba DAS-ELISA; se reportó que un 17% (64) de las muestras fueron positivas al menos a un virus, de las cuales 7,4% (28) provinieron de plantas con síntomas y 9,4% (36) fueron hospederos asintomáticos. Chamico (*Datura spp.*) hospedó a CMV y PVY; nicandra (*Nicandra physalodes*) a AMV, CMV y PVY; tomatillo (*Solanum nigrum*) a CMV y PVY; ñilhue (*Sonchus spp.*) a AMV y TSWV; pacoyuyo (*Galinsoga parviflora*) a AMV, CMV, TSWV y INSV; quingüilla (*Chenopodium spp.*) a AMV, CMV, TSWV, PVY e INSV, entre las principales. Nicandra y pacoyuyo portaron más de un virus y estas infecciones múltiples prevalecieron sobre las simples (Ormeño y Sepúlveda, 2005).

En otra investigación realizada sobre malezas del género *Datura* como factor epidemiológico del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), virus del mosaico del pepino (CMV) y virus Y de la papa (PVY) en Solanáceas cultivadas mencionan que, en Santiago, Chile a una altitud de 625 msnm se colectaron plantas de chamico (*Datura stramonium* y *D. ferox*) para establecer la presencia del virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus mosaico del pepino (CMV) y virus Y de la papa (PVY) mediante análisis de RNA de doble cadena (dsRNA) y ELISA. Ambas malezas fueron positivas a los tres tipos de virus y los porcentajes de infección estuvieron entre 20-30%, excepto para PVY en *D. stramonium* que fue de 5% (Ormeño, Sepúlveda, Rojas, & Araya, 2006).

Bajo condiciones controladas, el áfido vector *Myzus persicae* Sulzer transmitió CMV desde *D. ferox* a tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y pimientos (*Capsicum annuum* L.), sin embargo no lo transfirió a papas (*Solanum tuberosum* L.). Semillas de plantas positivas de *D. stramonium* y *D. ferox* no transmitieron CMV, AMV ni PVY.

La capacidad de infección de estos insectos pudo afectarse por la dirección de los vientos y su relación con la ubicación de las plantas cultivadas. Las plantas de chamico, especialmente *D. ferox*, deben ser controladas no sólo por las pérdidas económicas producidas por la competencia maleza-cultivo, sino que además por ser hospederos alternativos de CMV, AMV y PVY. Desde un punto de vista epidemiológico, el control no sólo debiera

circunscribirse a plantas de chamico del potrero sino que también aquellas de las inmediaciones, especialmente en la línea de dirección de los vientos.

En cuanto al virus de la clorosis infecciosa del tomate TiCV, en Jordania se reportaron *Chenopodium álbum* y *Chenopodium murale* como malezas hospederas de dicho virus, con sintomatología de zonas amarillentas intervenales en hojas más viejas seguido de amarillamiento generalizado (Anfoka & Abrary, 2007).

Los virus de plantas se componen de dos tipos de moléculas: informativas (ácidos nucleicos) y funcionales (proteínas). Hasta hace poco tiempo se utilizaban de forma rutinaria los métodos basados en el componente proteico; entre ellos, la técnica serológica tipo ELISA; sin embargo y en detrimento de su sensibilidad, este método presenta la desventaja de que sólo un 2-5% de la secuencia del virus actúa como determinante antigénico Hull (citado por Pallás, Sánchez, Aparicio y Herranz, 2010).

Durante los últimos años ha sido posible el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en el componente genómico de los virus, entre los que cabe destacar dos técnicas: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación molecular. El PCR, es un método extremadamente sensible y que por tanto permite detectar concentraciones muy bajas del patógeno. La hibridación molecular representa un método rápido, sencillo y fiable para la diagnosis de virus y viroides. La variante que más se utiliza es la de “dot-blot” en la que la solución de ácidos nucleicos es aplicada directamente sobre la membrana de nylon, y es detectada con una sonda específica marcada. (Pallás et al., 2010).

2.2. Tomate de árbol

2.2.1. Origen.

El tomate de árbol es una planta nativa de los Andes de Ecuador, Perú, Chile y Bolivia. Este cultivo ha sido establecido en: Brasil, Argentina, Colombia y Venezuela. En la actualidad ocupa grandes extensiones de terreno en Nueva Zelanda al punto de convertirse en un cultivo intensivo y de exportación (Lucas et al., 2011).

Bernal (como se citó en Lagos, 2012) menciona que esta fruta se ha establecido en los Andes Suramericanos en lugares ubicados desde los 1800 hasta los 3000 metros sobre el nivel

del mar y hoy en día se encuentra dispersa por diferentes partes del mundo. Se sabe que el tomate de árbol se cultiva desde épocas prehispánicas.

2.2.2. Producción a nivel mundial.

(Lucas et al., 2011), manifestó que a nivel mundial el tomate de árbol es conocido como tamarillo. En estado silvestre se ubica en los bosques andinos colombianos y peruanos. Actualmente los cultivos de tomate de árbol han aumentado y se extiende en países como Nueva Zelanda, Kenia mismos que ocupan los primeros lugares en el mercado europeo. A nivel de Sudamérica Colombia y Ecuador cuentan con un producto de calidad y en cantidades para la exportación, el producto colombiano lidera la producción, continuado por Ecuador que aún necesita un progreso agrícola para llevar al tomate de árbol a un nivel más competitivo dentro del comercio exterior tal como lo maneja Colombia, Nueva Zelanda y Kenia.

1.1.1. Situación de la producción de tomate de árbol en el país.

Según el Sistema de información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca [SINAGAP], 2013), el cultivo de tomate de árbol en el Ecuador se encuentra mayormente en las estribaciones de la cordillera de los Andes, con una superficie cosechada al año 2013 de 3439 ha y un rendimiento de 4,43 ton/ha, presentando una baja en su rendimiento del 37,2% en comparación al año 2012 ya que con una superficie cosechada de 2084 ha se obtuvo un rendimiento de 7,05 ton/ha.

La Sierra ecuatoriana posee diversas zonas óptimas para la producción de esta fruta; zonas caracterizadas por un clima templado y fresco, y suelos con buen contenido de materia orgánica. Las provincias más representativas en cultivos de esta fruta son Imbabura, Tungurahua y Pichincha (Viteri, Cruz, Bravo y Viteri, 2011). Según INEC (2015) entre los cultivos permanentes de mayor producción en la provincia de Imbabura se encuentra el tomate de árbol con una superficie plantada de 1262 hectáreas, una superficie cosechada de 633 hectáreas y una producción anual de 4499 Tm.

Revelo et al. (2004) indican que en el Ecuador no existe una clasificación clara de los genotipos de tomate de árbol que son cultivados, por tal motivo no existen variedades propiamente dichas, con excepción del híbrido Mora introducido desde Nueva Zelanda. Con el propósito de tener una definición comercial, dichos autores mencionan que existen variedades

de pulpa amarilla y variedades de pulpa morada o púrpura. A su vez, en estos grupos se definen a las variedades tomando en consideración el color de la cáscara, la forma del fruto y el color de la pulpa. Por las consideraciones anteriores, los genotipos de tomate de árbol que se cultivan en el país son el Amarillo, Negro, Redondo, Puntón (común), Rojo, Amarillo Gigante, Mora (Neozelandés) y Mora Ecuatoriano. De estos genotipos, los más cultivados son el Común, seguido por el Amarillo Gigante y el híbrido Mora Ecuatoriano que es apreciado en la Costa. En Imbabura el genotipo más cultivado es el Amarillo Gigante.

Reyes y Sanabria (como se citó en Meza y Méndez, 2009) señalaron que el tomate de árbol posee cualidades nutricionales, especialmente sus propiedades de reducción de colesterol, su alto contenido de fibra, β - Caroteno (pro-vitaminas A), vitamina B6, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E, hierro, potasio, magnesio, fósforo con un contenido de nitrógeno y aminoácidos libres muy alto y su bajo nivel de calorías. Fortalece el sistema inmunológico y la visión, además de funcionar como antioxidante.

2.2.3. Plagas.

- Afidos (*Myzus sp.* y *Aphis sp.*): normalmente se localizan en los brotes tiernos y chupan la savia de las hojas ocasionando una deformación y un leve enrollamiento de las mismas; esto origina problemas en el desarrollo de la planta. En campo se evidencia la formación de fumagina (Núcleo Ambiental S.A.S., 2015).
- Chinche o chinchorro (*Leptoglossus zonatus*): su daño principal lo realiza al fruto en diferentes estados de desarrollo, debido a que se alimenta del jugo de éstos, presencia de manchas oscuras, también se alimenta de flores y brotes terminales de la planta (Pilco, 2009).
- Gusanos trozadores (*Agrotis sp.*): las larvas se alimentan de la base del tallo causando el volcamiento y muerte de las plántulas (Pilco, 2009).
- Cutzo (*Phyllofaga sp.*): es una nueva plaga de incidencia esporádica que daña las raíces más pequeñas. Se encuentra en áreas donde existe un alto contenido de materia orgánica en estado de descomposición (Revelo et al., 2004).
- Mosca Blanca (*Bemisia tabaci-Trialeurodes vaporariorum*): el adulto es el que usualmente se observa en el cultivo, pero existen otros estadios que regularmente no se

monitorean como los huevos y ninfas. Los huevos son de color amarillo pálido y translucido y son colocados en las hojas más jóvenes en forma de herradura; las ninfas, que son inmóviles (sólo se mueven las más pequeñas), se alimentan del tejido de las hojas, deteniendo el crecimiento de la planta y produciendo una mielecilla (fumagina) que puede cubrir totalmente la planta. Puede ser transmisora de virus, especialmente el *Begomovirus* y el *Crinivirus* (Barreto et al., Rodríguez et al., citado por Núcleo Ambiental S.A.S., 2015).

2.2.4. Enfermedades.

- Antracnosis del fruto u ojo de pollo (*Colletotrichum gloeosporioides*): frutos con decoloración y pequeñas lesiones de apariencia aceitosa, en el centro de la lesión se forma un polvillo rosado. A nivel de hojas aparecen manchas con anillos concéntricos de color oscuro y borde definidos (Pilco, 2009).
- Lancha o tizón (*Phytophthora infestans*): produce manchas de color negro brillante, de consistencia acuosa en los tallos y manchas circulares de color café a negro en el haz y en el envés de las hojas, desde los bordes hacia adentro, con ondulaciones concéntricas a manera de oleaje formadas por un polvillo blanquecino. Las lesiones siempre están rodeadas de un halo de 4 a 5 mm de ancho, de bordes difusos y de color verde claro (Mora et al., 2008).
- La mancha negra o pata de puerco (*Fusarium solani*): en tallos aparecen manchas negras de color pardo y ramas principales con bifurcación. En las raíces provoca la descomposición del tejido que emana fuertes olores y causa el marchitamiento de la planta (Pilco, 2009).
- El Oidium o cenicilla (*Oidium sp.*): se caracteriza por afectar tanto en el haz como en el envés de las hojas inferiores viejas, mostrando lesiones de color oscuro rodeadas de una cenicilla de color blanquecino. Las manchas crecen al juntarse unas con otras, hasta cubrir una buena parte de la hoja, reduciendo significativamente el área foliar y causando su caída, que al final afecta el rendimiento de la planta. La enfermedad se disemina fácilmente por el viento desde las malezas u otros cultivos hacia la plantación (Mora et al., 2008).

- Alternariosis o tizón temprano (*Alternaria sp.*): se manifiesta principalmente en las hojas, donde aparecen manchas oscuras con anillos concéntricos. La mancha poco a poco va adquiriendo mayor tamaño, llegando en ocasiones a cubrir una superficie considerable de la hoja que presenta el tejido seco y quebradizo, la hoja finalmente se cae, afectando la capacidad fotosintética de la planta. Además puede infectar las primeras inflorescencias de la planta, repercutiendo en bajos rendimientos (León, Viteri y Cevallos, 2004).
- Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*): Afecta los tallos ocasionando manchas de color café, observándose crecimiento de estructuras algodonosas de color blanco causando pudrición. Inicialmente la planta emite mal olor y después se seca y muere (Núcleo Ambiental S.A.S., 2015).
- Muerte descendente o fusariosis (*Fusarium oxysporum*): se presenta principalmente en cultivos con problemas de pudrición de las raíces cuyos síntomas iniciales son marchitamiento o flacidez de las hojas. Posteriormente la planta muestra un amarillamiento foliar y pérdida de vigor. La enfermedad va en aumento después de realizar deshieras con azadón o en presencia de ataque de nematodos, por las heridas causadas a las raíces. Puede presentarse tanto en plantas jóvenes como en plantas adultas en producción (Mora et al., 2008).
- Nemátodos (*Meloidogyne sp.*): son animales muy pequeños en forma de gusanos microscópicos, causan heridas y daños en las raíces como nódulos (tumores), agallas pudriciones, reducción de raicillas, que son puerta de entrada a hongos e impiden la absorción de agua y nutrientes del suelo. Las plantas afectadas lucen pequeñas, amarillentas y marchitas (Mora et al., 2008; Núcleo Ambiental S.A.S., 2015).
- Virus: Los principales síntomas que presenta una planta infectada con virus son: detención del crecimiento, plantas pequeñas, hojas enrolladas con tonalidades de color rojizo, amarillento y mosaicos y brotes deformados. Los entrenudos son cortos. En la planta afectada se observan frutos pequeños salpicados con manchas rojizas que afectan la calidad de los frutos (Mora et al., 2008).

2.3. Malezas

2.3.1. Definición de maleza.

La flora arvense suele denominarse “malas hierbas” debido a las pérdidas que ocasiona en la cantidad y la calidad de las cosechas (Morales & Betancort, 2012). Las arvenses actúan como hospederos alternativos de virus, por lo que son un factor clave en la epidemiología al servir de fuente de inóculo primario para su transmisión vía vector biológico a las plantas cultivadas (Fiscal y Vaca, 2012).

Por otro lado Cerna (2013) manifestó. “Agronómicamente se considera una planta como maleza cuando es inoportuna o limita el crecimiento de las plantas deseables. También hay especies que cuando están presentes en los cultivos causan problemas, pero que en casos especiales pueden ser útiles” (p.11).

2.3.2. Daños ocasionados por malezas.

Las diversas especies de malezas que afectan a los cultivos ocasionan su efecto negativo a través de daños directos e indirectos. Directos, al competir activamente con las plantas cultivadas por factores esenciales para su desarrollo como nutrientes, agua, luz y además por espacio para el crecimiento radicular en el suelo. Indirectos, al servir de hospederos alternativos de diversas plagas y enfermedades que atacan a los cultivos, como insectos, nematodos, hongos, bacterias, y toda clase de virus, viroides o similares (Ormeño, Sepúlveda y Rebufel, 2003).

Las malezas, además de ser hospedantes de plagas y enfermedades, generan condiciones micro ambientales favorables para el desarrollo de las mismas. Compiten por luz y nutrientes con el cultivo de tomate de árbol, afectando su producción. Es por esto que el cultivo debe mantenerse libre de malezas. Además, ésta labor facilita las labores de mantenimiento y cosecha (Revelo et al., 2004).

Desde el punto de vista fitosanitario, las malezas de la misma familia botánica que un determinado cultivo, son las más peligrosas, ya que tienen la probabilidad más alta de mantener todas las plagas y enfermedades de dicho cultivo dentro de los campos de producción, a través del tiempo (Lastres y Soza, 2009).

2.3.3. Clasificación de las malezas.

Lastres y Soza (2009) indican que de acuerdo con su ciclo de vida las malezas pueden ser:

- Anuales: completan su ciclo de vida desde la germinación hasta la producción de semillas, en un año o menos:
- Bianuales: completan su ciclo de vida en más de un año pero menos de dos.
- Perennes: viven por más de dos años, a partir del mismo sistema radical.

Pilco (2014) afirma que por su conformación coltilledonal las malezas pueden ser:

- Monocotiledóneas: malezas de hoja angosta con semillas de un solo cotiledón, generalmente son herbáceas y raíz fibrosa.
- Dicotiledóneas: malezas de hoja ancha con semillas de dos cotiledones, desarrollan tallos leñosos/semileñosos y raíz pivotante.

2.4. Virus

2.4.1. Características generales.

Según Hull (como se citó en Guzmán, Castaño y Villegas, 2009) la palabra virus proviene del latín '*virus*', que significa veneno. Los virus son agentes infecciosos compuestos de una o varias moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN de cadena sencilla o doble) cubiertas por una o varias capas de proteína o lipoproteína capaces de replicarse en las células de un hospedante susceptible.

Adams (como se citó por Guzmán et al., 2009) menciona que su tamaño oscila entre 20 y 70 nm de diámetro para los virus isométricos y 150 a 2.200 nm de longitud para virus con forma de varilla. La traducción del genoma (para producir proteínas) o transcripción y replicación (para producir más ácido nucleico) ocurre dentro de las células del hospedante usando su "maquinaria" metabólica.

Según Rodríguez (2011) los virus son parásitos obligados, ultramicroscópicos, que no poseen metabolismo propio, incapaces de respirar, reproducirse y crecer por sí mismos ya que

necesitan de un huésped para replicarse. Existen aproximadamente 2000 especies de las cuales cerca de 500 atacan y causan enfermedades en las plantas.

Los virus de las plantas difieren ampliamente de todos los demás fitopatógenos no solo en tamaño y forma, sino también en la sencillez de su constitución química y estructura física, método de infección, propagación, translocación dentro del hospedero, diseminación y los síntomas que producen sobre el hospedero. Los virus no pueden observarse ni detectarse mediante los métodos utilizados para otros patógenos, debido a su tamaño pequeño y a la transparencia de su partícula. Los virus no son células ni constan de ellas (Agrios, 2011).

2.4.2. Composición y estructura.

Todos los virus que infectan a las plantas constan de al menos una cadena de ácido nucleico (DNA O RNA, nunca los dos juntos) y una o más proteínas codificados por el ácido nucleico, que forman una capa protectora llamada cápside o cubierta (Fig. 1). Muchos virus tienen un solo tipo de proteína que mediante subunidades repetitivas configura la cápside, pero en algunos casos ésta contiene hasta siete proteínas diferentes. Algunos virus tienen una segunda capa de proteínas, mientras que otros adquieren una membrana lipoproteica a partir de la célula huésped, formando una envoltura. De ahí que contienen compuestos adicionales como carbohidratos o lípidos en la composición viral (Moreno, Medina y Romero, 2016).

A la partícula viral completa se le denomina virión. Al conjunto de ácido nucleico más la capa protectora de proteínas de la cápside se denomina nucleocápside. Ésta puede tener dos tipos principales de simetría: isométrica, en los llamados virus esféricos, o helicoidal, en los virus alargados (Moreno et al., 2016).

El peso total de la nucleoproteína de las distintas partículas virales varía desde $4,6 \times 10^6$ de unidades de peso molecular (virus del mosaico del bromo), 39×10^6 (virus del mosaico del tabaco) hasta 73×10^6 (virus cascabel del tabaco). Sin embargo, el peso del ácido nucleico fluctúa entre 1 y 3×10^6 de unidades de peso molecular por partícula viral (en la mayoría de los virus), aunque algunos de ellos constan hasta de 6×10^6 unidades de peso molecular y el virus del tumor de las heridas de 12 componentes tiene un ácido nucleico cuyo peso aproximado es de 16×10^6 de unidades. El tamaño de los ácidos nucleicos virales es muy pequeño cuando se compara con los de $0,5 \times 10^9$ para los micoplasmas, 1×10^9 para los espiroplasmas y más de $1,5 \times 10^9$ para las bacterias (Agrios, 2011).

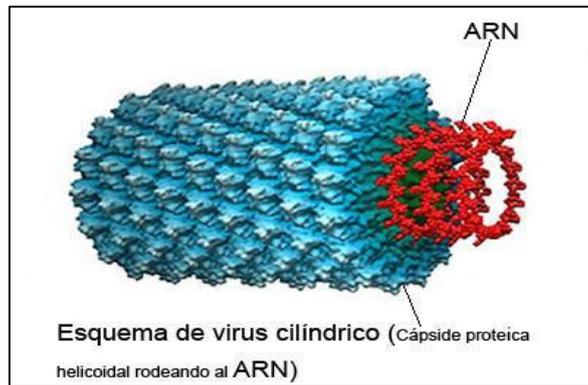


Figura 1. Componentes de un virus
Fuente: (Castro, 2015)

2.4.3. Infección y síntesis virales.

La infección de una planta por un virus está en relación directa con la síntesis del mismo, ya que la infección no ocurrirá a menos de que el virus se multiplique en el tejido del huésped susceptible. Los virus y viroides están compuestos de moléculas reguladoras: es decir, el ácido nucleico viral ordena a la planta que ejecute funciones para su beneficio, y dentro de las funciones básicas ordenadas está la patogenicidad y la replicación de éste (Mena, 2010).

El proceso de replicación solo sucede en las células del hospedante con el cual debe tener afinidad específica. La multiplicación es intracelular y vinculada a células de tejidos ricas en ácidos nucleicos (células embrionarias jóvenes con tejidos en vía de desarrollo rápido). La multiplicación del virus dentro de la célula puede ocurrir tanto en el núcleo como en el citoplasma (Soto, 2007).

El proceso de replicación de los virus es complejo pero en forma general se divide en las siguientes etapas: a) Adsorción y penetración; b) Liberación del AN; c) Replicación del AN; d) Síntesis temprana de proteína; e) Síntesis tardía de proteína y f) Ensamblaje (Mena, 2010).

El ciclo de vida de los virus comienza con la penetración del virión a la célula, pero éstos no pueden penetrar por sí solos la cutícula y la pared celular de las plantas (Gergerich & Dolja, 2008). Se cree que el virión ingresa al citoplasma de la célula en forma pasiva, a través de heridas causadas por daño mecánico en la cutícula y pared celular. El virión ingresa al citoplasma de la célula a través de heridas producidas mecánicamente o por ciertos vectores, o bien cuando un grano de polen infectado se deposita en un óvulo (Agrios, 2011).

El paso siguiente es la remoción parcial o total de la cubierta proteica del virión en el citoplasma. Luego, la célula interviene en la expresión del genoma viral proveyendo un aparato de transcripción (para los virus de ADN) y un aparato de traducción (para todos los virus). Los virus de ADN deben ser transportados al núcleo para la transcripción y de esta manera tener acceso a las proteínas celulares necesarias para la producción de ARN mensajero a partir de ADN viral. La traducción de ARN viral en el citoplasma produce proteínas virales que son necesarias para completar el ciclo de vida del virus (Gergerich & Dolja, 2008).

2.4.4. Translocación y distribución de los virus en las plantas.

Después de la introducción de un virus en la célula, el virus aparentemente se mueve, antes y después de desprenderse de su cubierta proteica, hacia los sitios de síntesis y ensamblaje de sus componentes. El movimiento probablemente es pasivo y depende de la corriente protoplasmática de la célula, pero otros mecanismos también pueden estar complicados (Mena, 2010).

Para que un virus realice la infección en una planta deberá moverse de una célula a otra y multiplicarse en la mayoría de ellas o al menos en las células en las que se mueve. Se cree que los virus en sus movimientos de célula a célula, siguen un camino a través de las uniones plasmodesmatales de las células adyacentes y se entiende también que el retículo endoplásmico puede conectar una célula a otra. Sin embargo, es posible que los virus no se muevan a través de la célula del parénquima a menos que los virus infecten las células y se multipliquen en ellas, esto ocasiona una invasión continua de célula a célula (Agrios, 2011).

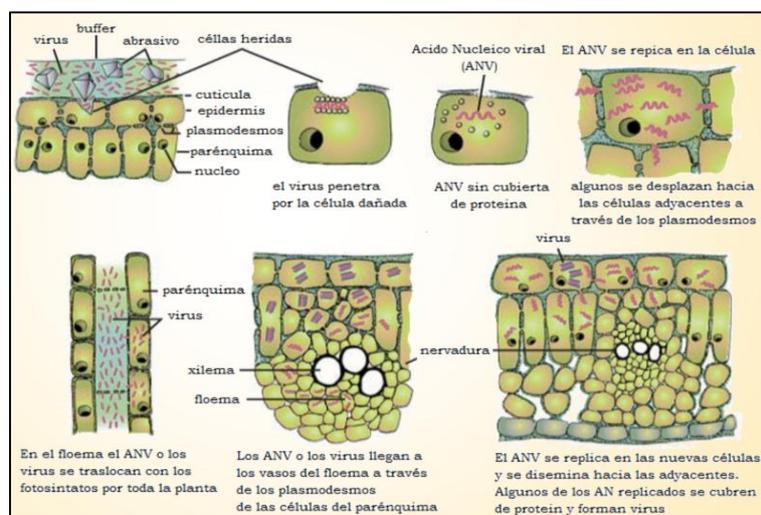


Figura 2. Inoculación mecánica y primeras etapas de la distribución sistémica de los virus en las plantas

Fuente: Urbina (2011)

El tiempo que tarda un virus en movilizarse en una planta depende de diferentes factores, así como tipo de virus, variedad de la planta, edad de la planta al momento de la inoculación, y temperatura, entre otros factores (Sepúlveda, 2011).

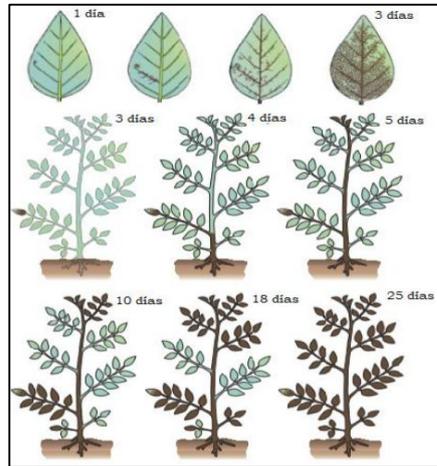


Figura 3. Dirección y velocidad de translocación de un virus en una planta
Fuente: Samuel (citado por Urbina, 2011)

2.4.5. Transmisión de los virus.

Los virus que infectan a las plantas son biotróficos es decir parásitos obligados por lo que no se pueden desarrollar en materia orgánica muerta, necesitan de tejido vivo para su multiplicación activa o simplemente para estar en reposo (Sepúlveda, 2011).

Estos parásitos nunca o casi nunca, abandonan espontáneamente a las plantas, razón por la cual los virus no son diseminados por el viento o el agua, e incluso cuando son transportados en la savia o en los restos de plantas, en general no ocasionan infecciones a menos que entren en contacto con los contenidos de una célula viva dañada. Sin embargo, son transmitidos de planta en planta mediante diversas formas como la propagación vegetativa, mecánicamente a través de la savia y por medio de semillas, polen, insectos, ácaros, nemátodos, la cúscura y los hongos (Agrios, 2011).

2.4.5.1. Tipos de transmisión de virus.

Según Mena (2010) las formas en que los virus son transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas son:

- Transmisión por propagación vegetativa: cualquier tipo de virus que se encuentre en la planta madre será transmitido a la progenie mediante injerto, esquejes, tubérculos, bulbos o rizomas.

- Transmisión mecánica: proceso por el cual las partículas de virus son manualmente introducidas a una planta por heridas mecánicas para facilitar la iniciación de la infección en células potencialmente infectables; esto puede ocurrir de manera natural (campo), o de forma artificial (laboratorio); en campo la transmisión puede efectuarse entre plantas bastante próximas al rozarse con el viento, cuando las plantas son dañadas por el hombre en las labores del cultivo. La transmisión mecánica artificial es de gran importancia a nivel experimental y se puede realizar de diferentes formas: frotis, injerto e inyecciones.
- Transmisión por semilla: alrededor del 20 % de los virus de plantas conocidos se transmiten a través de la semilla. Cuando un virus infecta a una planta, invaden todos los tejidos y llegan hasta la semilla; esto ocurre cuando el hospedante es infectado sistemáticamente en la floración, cuando el virus es capaz de invadir el polen y el óvulo, cuando es capaz de sobrevivir en la gameta, cuando sobrevive en la deshidratación de la semilla y al almacenamiento y cuando no es inactivado durante el desarrollo de la semilla.
- Transmisión por polen: cuando una planta está infectada, el virus tiene la capacidad de llegar a infectar el polen y cuando éste es acarreado por el viento o por insectos el virus se transmite de una planta enferma a una sana. La gran mayoría de los virus que se transmiten por medio de la semilla también se transmiten por el polen.
- Transmisión a través de biotransmisores: dicho término se aplica a cualquier agente vivo capaz de portar o transmitir un virus fitopatógeno de una planta enferma a una sana. Este tipo de transmisión incluye a los insectos, ácaros, nemátodos, hongos, plantas parásitas y vertebrados, y constituyen la forma más importante de diseminación de los virus en campo.

El grupo de biotransmisores más importantes de virus son los insectos. Más de 400 especies de insectos transmiten virus, y de todas estas especies *Myzus persicae* es el más importante ya que transmite alrededor de 85 virus diferentes. Las especies de insectos reportadas como transmisores de virus se encuentran principalmente en los órdenes Homóptera (pulgones, moscas blancas, chicharritas, escamas, psilidos, etc.); Thysanoptera (trips); Coleóptera (escarabajos); Orthóptera (chapulines); Dermáptera (tijeretas); Lepidóptera (palomillas y mariposas); Díptera (mosquitos) y Hemíptera

(tingidos). En general durante la transmisión por insectos se pueden distinguir tres fases: período de adquisición, período de latencia y período de inoculación.

2.4.6. Clasificación de los virus.

El nivel más alto de clasificación de los virus es según la naturaleza del genoma (Urbina, 2011). Los virus de plantas tienen un genoma muy pequeño, 2.500 – 19.000 nt, teniendo la mayoría de ellos entre 4.000 y 6.000 nt. El ácido nucleico supone entre el 5 y el 40% del peso total del virión y representa el material genético indispensable para la replicación (Moreno et al., 2016). El mismo autor menciona que, el genoma de los virus de plantas puede ser:

- RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA) que funciona como un RNA mensajero (mRNA) para la síntesis directa de las proteínas virales. Es el que tiene la mayoría de virus de plantas.
- RNA monocatenario de sentido negativo (NssRNA), que mediante una enzima codificado por el RNA complementario del genoma viral, presente en el virión transcribe el RNA genómico a mRNA. Lo comprenden los virus de plantas de las familias Rhabdoviridae y Ophioviridae.
- RNA de doble cadena (dsRNA). En este caso, la polimerasa viral sintetiza mRNA a partir de una de las dos cadenas de RNA. Se presenta en virus de plantas de las familias Reoviridae, Partiviridae, Amalgaviridae y Endornaviridae y en el único representante del género Varicosavirus.
- DNA de doble cadena (dsDNA). Presente en virus de la familia Caulimoviridae que comprenden una etapa de transcripción inversa en su ciclo de replicación (dsDNA-RT). El DNA viral es liberado en el núcleo de las células, donde es transcrito por el RNA polimerasa del huésped.
- DNA de cadena simple (ssDNA). Se hallan en miembros de las familias Germiviridae y Nanoviridae. En los momentos iniciales de la replicación requieren las enzimas del huésped para la formación de dsDNA. La transcripción del dsDNA es bidireccional en los geminivirus.

Tabla 1. Principales características del genoma y morfología de la partícula de los virus en estudio

Virus	Familia	Género	Tipo de ácido nucleico	Presencia de envoltura	Morfología de la partícula	Configuración del genoma	Tamaño del genoma Kbp o Kb
PVX	Alphaflexiviridae	Potexvirus	ssRNA	No	filamentosa	1 segmento +	6 - 9
PVY	Potyviridae	Potyvirus	ssRNA	No	filamentosa	1/2 segmentos +	8 -12
AMV	Bromoviridae	Alfamovirus	ssRNA	No	isométrica	3 segmentos +	8 -9
TiCV	Closteroviridae	Crinivirus	ssRNA	No	filamentosa	1/3 segmentos +	15 -19

Fuente: (Moreno et al., 2016)

2.5. Virus X de la papa (PVX)

2.5.1. Descripción.

El virus X de la papa pertenece a la familia *Flexiviridae* y género *Potexvirus*. También se le conoce como Potato mottle virus, Potato mild mosaic virus, Solanum virus 1 y Potato latent virus. Los huéspedes son el pimiento, tomate, papa, tabaco, berenjena y se encuentra ampliamente distribuido en las zonas de cultivo de la papa (Melgarejo et al., 2010).

El PVX es una partícula filamentosa y flexuosa de 515 nm de longitud y 13 nm de diámetro. Estructura helicoidal con una sola molécula de RNA monocatenario de sentido positivo de 6,4 kb. El ácido nucleico supone el 6% del virión. Una única especie molecular de proteína de cápsida, de peso molecular 30000 (Melgarejo et al., 2010).

2.5.2. Sintomatología.

Las plantas a menudo no muestran síntomas, pero cuando ocurren, el virus puede causar clorosis, mosaicos y reducción en el tamaño de la hoja. La fuente de este virus son los tubérculos infectados, además es transmitido mecánicamente y hasta ahora no se conocen insectos que actúen como vectores (Burrows, 2005). En general se considera un virus leve, que produce pérdidas de cosecha del orden del 5 al 10% (Melgarejo et al., 2010), pero puede llegar a ser un virus devastador si se presenta en infecciones mixtas; por ejemplo, cuando existe infección del PVX con el PVY, los síntomas se intensifican y las pérdidas pueden llegar a ser hasta 70% (Burrows, 2005; Mekuria, 2007).

2.5.3. Variabilidad intraespecífica.

Se definen cuatro cepas (PVX¹, PVX², PVX³, PVX⁴), entre los aislados de papa según su comportamiento con los genes de hipersensibilidad NB y NV, esto tiene poco efecto práctico. Existe un gen de inmunidad que protege de todos los aislados europeos (Melgarejo et al., 2010).

2.5.4. Transmisión.

Martínez (citado por León y Guillermo, 2007) menciona que el virus PVX se transmite mecánicamente, por contacto entre plantas y algunos consideran que ocurre transmisión por insectos masticadores y por zoosporas del hongo *Synchytrium endobioticum*.

2.6. Virus Y de la papa (PVY)

2.6.1. Descripción.

Arteaga y Pons (citado por Velásquez, Reveles, Chew y Mauricio, 2013) indica que el PVY pertenece a la familia *Potyviridae* y género *Potyvirus*. Melgarejo et al. (2010) indicó que al PVY también se le conoce como Tobacco vein necrosis virus (cepa PVY^N), Tobacco vein-banding virus y Solanum virus.

Este virus presenta una amplia lista de huéspedes, en su mayor parte pertenecientes a la familia de las Solanáceas, se encuentra ampliamente distribuido en las zonas de cultivo de papa, tomate, pimiento, y tabaco; constituye el principal factor limitante de la producción de papa (Melgarejo et al., 2010).

La morfología del virus radica en una cápside no envuelta, elongada con simetría helicoidal monopartita y flexuosa de 11 nm de diámetro, una longitud de 684 nm a 730 nm, y un canal axial de 2-3 nm, con una molécula de RNA de cadena sencilla y de sentido positivo de 10,4 kb y una única especie molecular de proteína de cápsida de peso molecular 34.000 (Ogawa, Tomitaka, Nakagawa & Ohshima, 2008; Melgarejo et al., 2010).

2.6.2. Sintomatología.

Según Melgarejo et al. (2010), la sintomatología depende de las diferentes cepas existentes y del tipo de huésped. En papa, los síntomas son particularmente complejos y se detallan a continuación:

Con la cepa PVY^N no se han encontrado genes de hipersensibilidad en las variedades cultivadas, la transmisión para dicha cepa por pulgón (síntoma primario) causa necrosis de las venas visibles en el envés de las hojas ya formadas, que evoluciona a un mosaico rugoso en las hojas nuevas.

La planta originaria del tubérculo infectado (síntoma secundario) causa un porte menor del normal, con mosaico rugoso y disminución del ciclo vegetativo. La gravedad del mosaico rugoso es variable, y puede presentarse solo con altas temperaturas. Puede ser prácticamente asintomático en variedades tolerantes. Se producen pérdidas de cosecha del orden del 35–50%. Estos aislados han desplazado a la cepa PVY^O en la última década del siglo XX y son ahora mayoritarias en campos de papa.

Muchas variedades de cultivo poseen el gen N_{ytbr}, que confiere hipersensibilidad a la cepa PVY^O. En este caso, la necrosis de las venas en infección primaria evoluciona a un fuerte mosaico rugoso con manchas necróticas en las hojas nuevas. Aparecen estrías necróticas a lo largo del tallo y las hojas bajas y medias se marchitan y caen, quedando sólo un penacho en el ápice (“palmeado”) y la planta muere prematuramente.

En infección secundaria presenta mosaico necrótico y estriado desde la nascencia, muriendo la planta en pocas semanas. Los aislados PVY^{NTN} son los únicos que producen síntomas en tubérculo, que comienzan como áreas arqueadas centradas alrededor de los ojos, que acaban hundiéndose y acorchándose superficialmente.

La intensidad de los síntomas depende de la combinación aislado/variedad, siendo algunas variedades especialmente sensibles. Existen en papa otras cepas y recombinantes minoritarios, tal como PVY^Z, PVY^C, PVY^{NW}. Las cepas PVY^C causan, como síntomas primarios y secundarios, arrugado, moteado y bandeado necrótico de las venas. También puede presentarse necrosis en los tubérculos. En tomate, necrosis de nervios y necrosis internerviales, más evidentes por el envés, con la cepa PVY^O, sin síntomas en fruto.

Con la cepa PVY^N, se observa la presencia de manchas blanquecinas en frutos, siendo más evidentes en los frutos verdes que en los maduros. En tabaco el virus reacciona de manera opuesta a la papa, las cepas PVY^N causan aclarado de venas y que evoluciona a necrosis de las mismas, mientras que las cepas PVY^O evolucionan a un moteado clorótico. En pimiento causa

bandeado de nervios, mosaico con moteado y arrugado de las hojas apicales, detención del crecimiento de la planta, necrosis de los nervios, caída de hojas y deformaciones en los frutos.

2.6.3. Variabilidad intraespecífica.

Existen dos patotipos de PVY definidos sobre la base de los síntomas inducidos en la planta de tabaco, el grupo necrótico, representado por la cepa parental PVY^N y el no necrótico, cuya cepa parental es PVY^O (Blanchard, Rolland, Delaunay & Jacqout, 2008).

2.6.4. Transmisión.

Pérez (citado por Velásquez et al., 2013) señaló que la única manera por la cual se disemina el PVY en el campo es por medio de áfidos, de manera no persistente; no se ha reportado transmisión por semilla, polen o contacto por lo que dos factores principales afectan la epidemiología y el ciclo de la enfermedad: la presencia de áfidos y de un reservorio del virus. Más de 25 especies de áfidos pueden transmitir este virus pero se ha reconocido que *M. persicae* es el vector más eficaz, aún bajo condiciones de invernadero, aunque es posible que juegue un papel importante en la dispersión secundaria del virus, especialmente cuando llega tarde en el ciclo de cultivo. Los áfidos que llegan al cultivo inmediatamente después del trasplante, como los del género *Aphis* parecen tener mayor importancia en la dispersión primaria del virus.

Desde otro punto de vista y contrario a lo dicho anteriormente Álvarez et al. (2011) mencionan que la propagación del tomate de árbol se realiza por semilla sexual, por lo cual es fundamental garantizar su sanidad, especialmente de virus como PVY y PLRV, que pueden ser transmitidos por esta vía. Debido a la contradicción que hay entre los dos autores es necesario realizar otros estudios sobre las formas de transmisión del virus PVY.

2.7. Virus del mosaico de la alfalfa (AMV)

2.7.1. Descripción.

Creamer (citado por Velásquez et al., 2013) indica que el virus del Mosaico de la alfalfa AMV es un miembro del género *Alfavirus* en la familia *Bromoviridae*. Según Melgarejo et al. (2010) también se le conoce como Alfalfa virus 1 y 2, Medicago virus 2, Marmor medicaginis y Lucerne mosaic virus.

Tiene un amplio rango de hospederos que incluye 305 especies en 47 familias como por ejemplo se ha determinado en leguminosas, cucurbitáceas y solanáceas, entre otros. La sobrevivencia del virus es en plantas hospederas, principalmente malezas solanáceas, además de otras 800 especies entre ornamentales y perennes (Sepúlveda, 2005). Por otro lado Creamer (como se citó en Morales, 2013) afirma que el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) afecta a una amplia gama de cultivos y malezas, una vez adquirido causa grandes pérdidas en los cultivos.

El virus AMV se encuentra distribuido a nivel mundial en España (Melgarejo et al. (2010). A nivel nacional reportan por primera vez el AMV en plantas sintomáticas de un campo comercial de pimiento rojo ubicado en el cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura (Colimba et al., 2016).

Creamer (citado por Velásquez et al., 2013) mencionó que el AMV contiene tres componentes de ARN de cordón sencillo junto con un cuarto componente de ARN, que es mensajero subgenómico, que codifica para la proteína de la cubierta viral. El virión completo consiste entonces, de cuatro componentes baciliformes de 18 nm de ancho y de 30 a 56 nm de longitud.

2.7.2. Sintomatología.

El virus AMV, causa enanismo y malformaciones con moteado, mosaico en alfalfa y necrosis del tubérculo de papa. En tomate, amarilleo inicial o bronceado de las yemas terminales, foliolos curvados hacia abajo, necrosis de los nervios de los foliolos, manchas necróticas en hojas confluyendo hasta formar placas. Los botones apicales y las hojas más jóvenes pueden llegar a una necrosis que puede extenderse a ramas y tallo principal. Ralentización del crecimiento, decoloración marrón-rojiza del floema cerca del cuello y frutos cuajados con manchas necróticas. En especies hortícolas causa mosaico y necrosis foliares. (Melgarejo et al., 2010).

2.7.3. Transmisión.

El virus AMV se transmite por inoculación mecánica, por polen, por semilla y de manera no persistente por pulgones entre los que se citan *Acyrtosiphon pisum* (Harris), *A. kondei* (Shinji) y *Myzus persicae* (Sulz.). (Melgarejo et al., 2010). El AMV puede diseminarse por más de quince especies de áfidos entre los que se encuentran *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis*

craccivora, *A. medicaginis*, *A. solani*, *A. fabae*, *A. medicaginis*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus ligustri*, *M. persicae* y *Phorodon cannabis*. Este virus también se transmite a través de las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y algunas malezas como *Solanum nigrum* L., *Datura stramonium* L., *Chenopodium quinoa* Wild. y posiblemente *Melilotus* spp. (Tun et al., 2012).

2.8. Virus de la clorosis infecciosa del tomate (TiCV)

2.8.1. Descripción.

El Virus del amarilleo infeccioso del tomate permanece a la familia Closteroviridae y género Crinivirus. El virus ha sido identificado, al menos una vez, en las siguientes provincias españolas: Alicante, Murcia, Castellón y Valencia (Melgarejo et al., 2010).

El virus TiCV se reportó por primera vez en tomate y se han encontrado infecciones naturales en cultivos, malezas y plantas ornamentales en diferentes partes del mundo, tal es el caso del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en España (Font et al., 2002), en la planta ornamental zinnia (*Zinnia elegans* Jacq.) en Taiwán (Tsai, Shih, Green, Hanson & Liu, 2004), en lechuga y la planta herbácea de la familia de las asteráceas, escarola o endivia (*Cichorium endivia*) en el sureste de Italia (Parella, 2008).

La partícula viral de TiCV es flexible y filamentosa de 850–900 nm de longitud. Genoma bipartito compuesto por ARN (ss). Además este virus induce inclusiones citoplasmáticas en las células del hospedante (Magallanes, 2009; Melgarejo et al., 2010).

2.8.2. Sintomatología.

La sintomatología del TiCV es similar a la presentada por el Tomato chlorosis virus (ToCV), pero en este caso más severa. Clorosis intervenal en hojas que, a menudo desarrollan manchas rojizas, necróticas o bronceadas, fragilidad de las hojas y pérdidas severas en campo. Los síntomas tempranos de TiCV se asemejan a problemas nutricionales y son evidentes en hojas más viejas. En flores o frutos no son demasiado aparentes, aunque éstos disminuyen en tamaño y número, produce reducción del tamaño de la planta debido a la disminución del área fotosintética. A pesar de su sintomatología similar al ToCV, no presenta relación serológica con éste (Melgarejo et al., 2010).

2.8.3. Transmisión.

De acuerdo a Melgarejo et al. (2010) el TiCV se transmite por medio de mosca blanca, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), de forma semipersistente. Periodo mínimo de adquisición del virus por la mosca: 1 hora; periodo mínimo de inoculación: 1 hora; periodo mínimo de retención: 4 días.

2.9. Técnicas de diagnóstico de virus

La problemática del diagnóstico de dichas entidades virales se ha abordado con diferentes enfoques; los cuales han transitado desde el análisis de síntomas en plantas indicadoras, la microscopía electrónica, el empleo de métodos serológicos e inmunoenzimáticos, hasta las técnicas moleculares de nueva generación.

Durante los últimos años ha sido posible el adelanto de métodos de diagnóstico basados en el componente genómico de los virus, entre los que cabe destacar dos técnicas: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación molecular (Pallás, et al., 2010).

2.9.1. Ensayos biológicos.

Hull (citado por Álvarez, 2010), expresó que, este tipo de técnicas donde se involucran las actividades biológicas de los virus se caracterizan por ser ensayos que requieren períodos de tiempo extensos (usualmente varias semanas), en los cuales una especie hospedera apropiada es inoculada con un aislamiento de cierto virus y se evalúa la reacción en la planta que puede conducir a sintomatologías locales y/o sistémicas. Hoy en día esta metodología continúa usándose con frecuencia, constituyéndose en el fundamento para diversas investigaciones en virología vegetal.

2.9.2. Técnicas serológicas o inmunoquímicas.

La reacción antígeno-anticuerpo es la base del inmunodiagnóstico. Estas técnicas ofrecen considerables posibilidades y ventajas para determinar la causa de una enfermedad, así como identificar y caracterizar los fitopatógenos. Para ello se realiza la detección de antígenos, estructurales o no, presentes en estos patógenos (Batista, Peña, López, Pérez y Llauger, 2008).

Sobre la base de las características de la reacción inmune y las propiedades físico-químicas de los antígenos y anticuerpos se han desarrollado diversos métodos, con el propósito

de detectar la presencia de los patógenos. Actualmente, muchas de las técnicas más específicas, sensibles, sencillas y económicas para analizar un gran número de muestras de forma rápida y rutinaria, se basan en el uso de técnicas serológicas con anticuerpos específicos (Batista et al., 2008).

2.9.2.1. Técnica inmunoenzimática ELISA.

Esta técnica forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo y consiste en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la fosfatasa o la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrá fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color notorio a simple vista o cuantificable mediante un equipo especializado. Es una técnica permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica (Díaz, Quiñones, Arana, Soto y Hernández, 2010).

2.9.2.2. Inmunoimpresión-ELISA.

La Inmunoimpresión ELISA (IIP-ELISA) es una versión simplificada de la técnica ELISA que evita el paso de preparación de extractos vegetales, lo que permite aumentar el número de muestras a procesar, así como descartar la contaminación entre muestras y la posibilidad de liberar inhibidores vegetales. En esta técnica el antígeno se une a una membrana de nitrocelulosa con afinidad por las proteínas y se realiza la detección de forma directa o indirectamente utilizando anticuerpos específicos.

La IIP-ELISA permite la separación temporal de los procesos de toma y análisis de muestras debido a que se pueden conservar las membranas impresas por largos períodos, con resultados de alta confiabilidad, eficiencia y correlación con el ELISA. Estas ventajas han estimulado su utilización como sistema de diagnóstico en varios países (Ruiz et al., 2009).

2.9.3. Microscopía óptica y electrónica.

La microscopía óptica permite determinar la presencia de agentes virales mediante la observación de cuerpos de inclusión que están confinados principalmente al floema, así como

de alteraciones citopáticas específicas. Las inclusiones pueden detectarse, igualmente, empleando inmunofluorescencia (Batista et al., 2008).

Morales (citado por Guzmán et al., 2009) mencionan que la microscopía electrónica permite la observación del macerado de tejidos de plantas infectadas con virus, con el fin de detectar y medir el tamaño de partículas virales a través del Microscopio Electrónico de Transmisión, usando la técnica de tinción negativa con acetato de uranilo. También con la ayuda de antisueros específicos se aplica la técnica de inmuno-microscopía electrónica (ISEM, por sus siglas en inglés) para atraer partículas virales a las rejillas de observación en caso de existir relación antigénica. El microscopio electrónico permite magnificar entre 200.000 y 600.000 veces el tamaño de las partículas.

La microscopía electrónica se emplea para la detección de fitopatógenos con resultados satisfactorios. Sin embargo, esta técnica tiene la desventaja de que es costosa, por lo que su uso en programas de diagnóstico masivo ha sido muy restringido (Batista et al., 2008).

2.9.4. Técnicas moleculares.

En la actualidad las técnicas moleculares desempeñan el papel protagónico en el diagnóstico de los *potyvirus*. Estas técnicas son superiores a las inmunoquímicas en especificidad y sensibilidad, además de ofrecer mayores posibilidades de detección y brindar una información más completa sobre los patógenos en cuestión (Louro, Accotto & Vaira, 2000).

Los principios fundamentales que sustentan las técnicas moleculares son: el carácter específico de la complementariedad entre bases de los ácidos nucleicos, la capacidad de dos cadenas complementarias de formar moléculas bicatenarias estables (híbridos o “dúplex”) bajo ciertas condiciones y la reversibilidad de esta reacción. Para el análisis se dispone de técnicas moleculares basadas en este principio, que se emplean en la actualidad: las de hibridación y las de amplificación enzimática in vitro de ácidos nucleicos, conocidas comúnmente como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En ambos grupos existen algunas variantes que se emplean para la detección de fitopatógenos (Batista et al., 2008).

2.9.4.1. Hibridación de ácidos nucleicos.

Astier, Abouy, Maury, Robaglia y Lecoq (citado por Álvarez, 2010) indicaron que, el principio de estas técnicas consiste en la fijación de pequeñas cantidades de extractos de plantas (tissue-printing) ó de ácidos nucleicos totales (dot-blot) (2 a 5 µl) en membranas de nylon o nitrocelulosa, que son reconocidos por sondas marcadas con isótopos radioactivos o por fluorocromos. El resultado se monitorea por el cambio de coloración que se observa en la membrana (detección colorimétrica), o sobre una película de detección (métodos radioactivos o quimioluminiscentes).

La técnica consiste en la clonación en tándem de varios fragmentos genómicos distintos en un mismo vector plasmídico lo cual permite la síntesis en la misma reacción de transcripción, de una única sonda de RNA o DNA a la que se ha denominado “polisonda” que reconoce a todas las secuencias clonadas; es una habilidad dot-blot. (Martínez, Donaire, Llave, Pallas & Gómez, 2010).

La obtención de la polisonda se realiza amplificando por PCR fragmentos genómicos representativos de la secuencia que se desee detectar. El tamaño mínimo de los mismos puede ser de 50 pares de bases pero lo recomendable es utilizar alrededor de 200 pares de bases para una mayor sensibilidad. Para la elaboración de cada PCR se construyen cebadores específicos de las secuencias a detectar, con los lugares de restricción correspondientes compatibles con el vector que se va a utilizar para la realización de la clonación. Después de realizar las sub-clonaciones necesarias se obtiene en un clon los fragmentos genómicos en tándem o a su vez con secuencias específicas de separación para facilitar que no existan impedimentos estéricos que impidan la hibridación con fragmentos adyacentes (Martínez et al., 2010).

El número de sondas individuales que se pueden incluir en la polisonda depende por un lado del tamaño de las sondas individuales y del tamaño del inserto máximo que permita el vector escogido. En trabajos anteriores se han utilizado sin dificultad 1200 bases. Después de haber obtenido el clon se genera la polisonda. “Dependiendo de si se trata de polisondas de RNA o de DNA se utilizará una enzima u otro y un sistema de detección basado en marcaje con oligonucleótidos radiactivos, digoxigenina, biotina o cualquier otro método de marcaje estándar que se escoja” (Martínez et al., 2010).

Desde otro punto de vista Batista et al. (2008) informa que la hibridación de ácidos nucleicos (NASH) se encuentra entre las técnicas más empleadas en los últimos años para la

detección de patógenos, principalmente cuando se procesa un gran número de muestras. La NASH se basa en el principio de la complementariedad de las bases, que permite la unión del ácido nucleico genómico del patógeno, previamente fijado a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa o nylon), con ácidos nucleicos complementarios que reciben el nombre de sondas. Las sondas, que pueden ser ARN complementario (ARNc) o ADN complementario (ADNc) clonado, oligonucleótidos sintéticos, obtenido por transcripción *in vitro*, son marcadas radioactivamente con P, o no radioactivamente con biotina o digoxigenina.

La detección de los híbridos formados se podrá realizar mediante autorradiografía, colorimetría o quimioluminiscencia, en dependencia del marcaje empleado. De éstas, las sondas ADNc marcadas con digoxigenina son las más empleadas en el diagnóstico de fitopatógenos. Los procedimientos de NASH que más se emplean en la actualidad constituyen ensayos heterogéneos que se realizan sobre membranas de nitrocelulosa o nylon.

Se distinguen por su utilización los siguientes métodos: Southern-blot (para ADN), Northern-blot (para ARN) y Dot-Blot o Slot-Blot (para ADN y ARN).

2.9.4.2. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

Esta técnica está basada en la forma de replicación de los ácidos nucleicos *in vivo*. Ha sido fácilmente implementada en el diagnóstico virológico ya que todos los virus tienen secuencias únicas y la mayoría de ellas han sido previamente reportadas.

Esta técnica se basa en la repetición de tres reacciones sucesivas: desnaturalización de DNA, que se logra con temperaturas de 94 °C a 96 °C por un período variable dependiendo de la complejidad del ácido nucleico a probar; la hibridación de dos oligonucleótidos específicos, llamados “primers” o indicadores, a cada una de las cadenas molde previamente desnaturalizadas, la cual se hace a una temperatura y tiempo determinados dependiendo, entre otras cosas, de la secuencia del oligonucleótido; el último paso consiste en la extensión o síntesis de la cadena complementaria la cual se lleva a cabo a 72 °C (temperatura ideal de actividad de la DNA polimerasa) y el tiempo de extensión depende primordialmente del tamaño del fragmento que se va amplificar. Estos tres pasos representan un ciclo, y en cada ciclo el número de moléculas blanco se duplica, lo que resulta en una amplificación exponencial de los fragmentos de DNA específicos. El tamaño del producto será igual a la suma de la longitud de los primers más la distancia que separa los dos oligonucleótidos en el DNA molde (Rugeles, 2012).

Según Batista et al. (2008) existen diferentes variantes de la técnica PCR, tales como:

- PCR con transcripción inversa (RT-PCR): es una técnica más laboriosa y tiene un costo más elevado que otras técnicas de diagnóstico, por lo que su uso para los análisis de rutina se ha visto limitado.
- PCR con inmunocaptura: es una variante atractiva que combina la PCR y la RT-PCR mediante el uso de la captura como en la técnica ELISA, lo que facilita la utilización de extractos crudos y de cierta forma logra la “purificación” parcial del patógeno en cuestión.
- PCR anidada o nested-PCR: consiste en someter la misma muestra de ADN a dos reacciones consecutivas de PCR.
- PCR múltiple: fue originalmente usada para co-amplificar productos génicos en una única PCR. La técnica se ha empleado con frecuencia para la amplificación simultánea de más de una secuencia diana en una sola reacción, utilizando más de una pareja de iniciadores.
- PCR en tiempo real: es una variante muy novedosa que permite de manera automatizada no solo la detección sino la cuantificación exitosa de los fitopatógenos, eliminando las posibilidades de contaminación y aumentando ostensiblemente la sensibilidad y eficiencia de estos métodos.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica

La investigación se realizó en las zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) de las parroquias de San José de Chaltura, San Francisco de Natabuela y San Roque pertenecientes al cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura, a una altitud media de 2200 msnm, 0° 21' 13'' de latitud N y 78° 13' 39'' de longitud O. Una temperatura media anual de 15,5 °C, precipitación media anual de 714,4 mm, y humedad relativa de 75% (Plan de Desarrollo de Ordenamiento Territorial [PDOT], 2011; Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología [INAMHI], 2012).

Mapa de ubicación del área de estudio (Anexo 1).

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Materiales de campo.

- Cooler
- Gel pack
- Tijeras de podar
- GPS (Global Positioning System)
- Fundas herméticas plásticas
- Etiquetas de identificación
- Esferográfico indeleble
- Papel bond (Formato A4)
- Libro de campo

3.2.2. Equipos de laboratorio.

- Balanza electrónica
- Agitador magnético
- Minicentrífuga marca AOSHENG
- Congelador marca SIEMENS de – 25 °C
- Medidor de pH

- Horno de hibridación, horno de luz ultravioleta
- Sistema de captación de imágenes

3.2.3. Equipos de oficina.

- Computadora
- Impresora
- Cámara fotográfica

3.2.4. Materiales de laboratorio.

- Bisturí
- Guantes
- Papel aluminio
- Micro pipetas de 0,5 - 10 μ l
- Puntas de micro pipetas
- Vasos de precipitación de 500 ml
- Tubos eppendorf de 2 ml
- Gradillas para tubos eppendorf
- Membrana de nylon con carga positiva

3.2.5. Insumos de laboratorio.

- Agua destilada
- Jabón líquido
- Alcohol 98,5 %
- Tween 20
- EDTA
- SDS (laurilsulfato sódico)
- 2- mercaptoetanol
- Citrato de sodio
- Formamida
- N-Lauroylsarcosine
- Blocking Reagent Solution
- Ácido maleico

- Anti-digoxigenin-AP Fab fragments
- Sondas individuales de RNA con marcado no radioactivo para diagnóstico de los virus PVX, PVY, AMV y TiCV

3.3. Métodos

3.3.1. Tipo de investigación.

La presente investigación es de tipo básica y aplicada. Es de tipo básica debido a que no existe un interés directo de buscar sus aplicaciones prácticas o consecuencias que pudiera generar la investigación y solo se limita a generar nuevos conocimientos; y de tipo aplicada porque se están aplicando conocimientos de tipo básico (Llanos, 2011) como el protocolo de la técnica de Hibridación Molecular. Tiene un enfoque cuantitativo ya que representa un conjunto de procesos donde se utiliza la recolección de datos con base en la medición numérica. Tuvo un alcance exploratorio - descriptivo, debido a que se trata de un estudio poco conocido y se fundamenta en medir variables para obtener datos y describir el fenómeno de interés (Hernández, Fernández y Baptista, 2014).

3.3.2. Diseño de investigación.

La presente investigación tiene un diseño no experimental de tipo transversal ya que se recolectan datos en un solo momento sin la manipulación de variables y solo se limita a observar el fenómeno en su ambiente natural para posteriormente ser analizado. (Hernández et al., 2014).

3.4. Variables evaluadas

3.4.1. Tipos de malezas más frecuentes.

La frecuencia para una especie se evalúa como el número de veces que la especie está presente en los lotes sobre el total de lotes evaluados y se expresa en porcentaje. Las mismas se clasifican en alta (superior al 80%), media (40 al 80%) y baja (menor al 40%) (Druetta, Luna y Ledda, 2015).

$$\text{Frecuencia (\%)} = \frac{\text{Número de veces que la especie está presente en los lotes}}{\text{Número total de lotes evaluados}} \times 100$$

3.4.2. Presencia de virus en malezas.

Se colectaron muestras de tejido vegetal proveniente de plantas que presenten síntomas y ataque de insectos vectores asociados a los virus en estudio, se procesaron y se sometieron al análisis de hibridación molecular no radioactiva tipo *dot- blot*, utilizando sondas individuales de los siguientes virus: virus X de la papa (PVX), virus Y de la papa (PVY), virus del mosaico de la alfalfa (AMV) y el virus de la clorosis infecciosa del tomate (TiCV), con la finalidad de detectar la presencia de los cuatro virus antes mencionados.

3.4.3. Nivel de incidencia de cada uno de los virus encontrados, según el tipo de malezas y localidad.

Según (Moreno et al., 2016) para determinar la incidencia de virosis se divide el número de muestras con presencia de virus entre el número total de unidades muestreadas, y se multiplica por 100.

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de unidades enfermas}}{\text{Número total de unidades muestreadas}} \times 100$$

3.5. Manejo específico del estudio

En el presente trabajo de investigación se realizó las siguientes labores:

3.5.1. Delimitación del área de muestreo.

Se ejecutaron recorridos de campo en un área de 719,847 hectáreas, con la finalidad de identificar lotes de producción con presencia de malezas. Se seleccionaron 41 lotes de cultivo de tomate de árbol, genotipo Amarillo Gigante en diferente estado de desarrollo (1 – 2 años) en las parroquias de San José de Chaltura, San Francisco de Natabuela y San Roque; considerando que son las parroquias con mayor área de siembra de esta fruta del cantón Antonio Ante. En el Anexo 2 se puede observar el mapa de ubicación de los puntos de muestreo.

3.5.2. Registro de malezas.

Tomando en cuenta que la distribución de las poblaciones de malezas no era homogénea sino en parches (Heijting, Van Der Werf, Stein & Kropff, 2007), no se tomó en cuenta un

número de puntos de evaluación (Jamaica, 2013) y fue conveniente realizar un recorrido en cada uno de los lotes, dirigiéndose a los sitios donde había presencia de malezas. Luego se apreciaron de forma visual, las malezas más predominantes y se registraron en un inventario para el cálculo de porcentaje de frecuencia. Para la identificación de cada una de las especies se utilizó el manual de malezas de Cerna (2013).

3.5.3. Recolección de muestras en el campo.

Las malezas muestreadas fueron seleccionadas de acuerdo al mayor porcentaje de frecuencia que se encontraron en el área de estudio y aquellas que en estudios realizados anteriormente han sido reportadas como hospederas de los virus en estudio.

Se realizó un solo muestreo en período húmedo seco y el área muestreada fue de aproximadamente 50 Ha de cultivo que correspondía a los 41 lotes seleccionados. El muestreo fue dirigido (Hernández et al., 2014) a plantas con y sin presuntos síntomas, debido a que pueden existir hospederas sintomáticas y asintomáticas (Ormeño et al., 2003), prefiriendo aquellas que presentaban síntomas y presencia de insectos vectores asociados a los virus en estudio; ya que los síntomas son útiles para el diagnóstico preliminar (Mena, 2010) y son el criterio básico para nominar al agente causal de las enfermedades producidas por virus (Sepúlveda, 2011), lo que constituyen una ayuda en el diagnóstico de la enfermedad. En cuanto a costos resulta oportuno mencionar que al tomar muestras sintomáticas y asintomáticas los costos de análisis son elevados.

Se recolectaron un total de 125 muestras (Anexo 4), de las cuales 117 eran de malezas, siete fueron de tomate de árbol y una correspondía a planta cultivada (alfalfa) que crecía como planta voluntaria en los lotes de cultivo de tomate de árbol muestreados y que se encuentra dentro del grupo de las malezas (Ormeño et al., 2003). Las muestras de tomate de árbol fueron tomadas para corroborar la presencia de virus en la plantación, de la misma forma se tomó la muestra de alfalfa, porque presentaban síntomas característicos del virus AMV y debido a que en estudios realizados anteriormente en el cantón Antonio Ante en cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav), hubo resultados positivos de dicho virus.

Las muestras fueron depositadas en bolsas plásticas, bien identificadas y se colocaron en un cooler refrigerado con el fin de evitar su deshidratación, luego fueron trasladadas al Laboratorio de Fitodiagnóstico Molecular de la FICAYA de la Universidad Técnica del Norte,

y se almacenaron en un congelador a -20 °C, hasta su procesamiento. Posteriormente las muestras se procesaron y se analizaron en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, España mediante la técnica de Hibridación Molecular no Radioactiva utilizando sondas individuales de los virus en estudio.

3.5.4. Protocolo de procesamiento de muestras.

3.5.4.1. Extracción de ácidos nucleicos.

Para la preparación de los extractos a analizar (extracción de ácidos nucleicos) se utilizó el método descrito por Martínez (2011) con algunas modificaciones como a continuación se describe:

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con agua destilada estéril adicionando jabón líquido con una dosis de 1ml/l. Se pesó 1 g de tejido vegetal (hojas), se trituró en 3 ml de tampón de extracción (5 mM EDTA pH 8,5; 50 mM SSC, 2 µl de 2-mercaptoetanol por cada ml de tampón) en una bolsa sellada. Se cortó la bolsa con el tejido triturado y se transfirió 1,5 ml del homogenizado a un tubo eppendorf de 2ml. Seguidamente se centrifugó por 3 minutos a 10000 rpm.

3.5.4.2. Inmovilización de los ácidos nucleicos en la Membrana de Nylon.

Para colocar los ácidos nucleicos en la membrana se marcaron cuadros de 0,25 cm² y en el centro se depositaron 1,5 µl de sobrenadante. Cada muestra se aplicó sobre la membrana de nylon (por triplicado) y seguidamente la membrana se dejó secar a temperatura ambiente por el lapso de una hora.

3.5.4.3. Proceso de hibridación.

Se empleó el protocolo de detección de virus y viroides en plantas mediante el uso de sondas de ARN de hibridación no radiactivas (Pallás et al., 2010), desarrollado en el laboratorio de virología molecular del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) en Valencia, España.

Las membranas se incubaron con un tampón de hibridación (50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS, Blocking Reagent Solution) a 68°C durante 1 hora. Luego se incubó toda la noche con la sonda diluida en dicho tampón a 68°C. Transcurrido este

tiempo la membrana se volvió a lavar dos veces durante 5 minutos en SSC 2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente seguido de dos lavados de 15 minutos a 68°C en SSC 0,1X/SDS 0,1%.

Seguidamente la membrana se incubó 5 minutos en tampón de lavado (TL: 0.1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico; 0,3% Tween 20), a continuación se bloqueó durante 30 minutos con 0,1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico + Blocking 1X. Finalmente la membrana se incubó con el anticuerpo durante 30 minutos (Anti digoxigenin-AP Fabfragments (1:10000)).

Por último, la membrana se lavó con el TL dos veces durante 15 minutos, y 5 minutos con un tampón que estaba compuesto por 0,1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl y se incubó con el sustrato disuelto, en este mismo tampón 5 minutos. Al final, la membrana se expuso a una película autorradiográfica durante 25 minutos.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente no existen estudios sobre malezas hospederas de virus, en las zonas productoras de tomate de árbol del cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura; es por eso que los siguientes resultados son los primeros datos reportados. A continuación se detallan los resultados obtenidos en el presente estudio.

4.1. Tipos de malezas encontradas

En la Tabla 2 se muestran las malezas más predominantes identificadas en los lotes de cultivo de tomate de árbol seleccionados.

Tabla 2. Clasificación por familia y formas de crecimiento de malezas más predominantes en las zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) en el área de estudio

Familia	Nombre científico	Nombre común	Formas de crecimiento	
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Bledo	A	D
Asteraceae	<i>Galinsoga quadriradiata</i> Ruiz & Pavón	Botonsillo	A	D
	(no identificada)	(no identificada)	D
	<i>Bidens pilosa</i> L.	Pacunga	A	D
	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Cerraja	A - B	D
	<i>Taraxacum officinale</i> Weber	Diente de león	B - P	D
	<i>Senecio vulgaris</i> L.	Senecio común	A - B	D
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Rabano silvestre	A	D
	<i>Coronopus didymus</i> L.	Mastuerzo	A - B	D
	<i>Rapistrum rugosum</i> L.	Mostacilla	A	D
	<i>Brassica rapa</i> L.	Nabo de campo	A	D
Caryophyllaceae	<i>Stellaria media</i> L.	Capiquí	A	D
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium album</i> L.	Alpaquinua	A	D
Convolvulaceae	<i>Ipomoea purpurea</i> L.	Neguilla	A	D
Fabaceae	<i>Melilotus indicus</i> L.	Alfalfilla	A	D
	<i>Trifolium repens</i> L.	Trébol blanco	P	D
Lamiaceae	<i>Salvia tiliifolia</i> Vahl	Chilchico	A	D
Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	Malva	A	D
Poaceae	<i>Digitaria sanguinalis</i> L.	Sarakiwa	A	M
	<i>Aira caryophyllea</i> L.	Heno de castilla	A	M
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Llanten menor	P	D
Polygonaceae	<i>Rumex crispus</i> L.	Lengua de vaca	P	D
	<i>Polygonum nepalense</i> Meisn	Corazón herido	A	D
	<i>Polygonum aviculare</i> L.	Lengua de cuy	A	D

Scrophullariaceae	<i>Veronica p�rsica</i> Poir	Ortiguilla	A	D
Solanaceae	<i>Nicandra physaloides</i> L.	Ambo	A	D
	<i>Solanum nigrum</i> L.	Hierva mora	A	D
Urticaceae	<i>Urtica urens</i> L.	Ortiga	A o P	D
....	(no identificada)	Orejuela	D

A = anual; B = bianual; D = dicotiledónea; M = monocotiledónea; P = perenne

Una vez identificadas las malezas más predominantes en los cultivos de tomate de árbol, se realizó un inventario en donde se registró el porcentaje de frecuencia y su clasificación.

Tabla 3. Frecuencia de malezas en las zonas productoras de tomate de  rbol (*Solanum betaceum* Cav) en el área de estudio

Especies	N� total de lotes registrados	N� de lotes donde se registró la maleza	Frecuencia %	Clasificación de frecuencia
Alpaquinua (<i>Chenopodium album</i>)	41	26	63,4	media
Malva (<i>Malva parviflora</i>)	41	22	53,7	media
Botonsillo (<i>Galinsoga quadriradiata</i>)	41	17	41,5	media
Bledo (<i>Amaranthus hybridus</i>)	41	13	31,7	baja
Rab�no silvestre (<i>Raphanus raphanistrum</i>)	41	13	31,7	baja
Sarakiwa (<i>Digitaria sanguinalis</i>)	41	11	26,8	baja
Ambo (<i>Nicandra physaloides</i>)	41	10	24,4	baja
Ortiguilla (<i>Veronica persica</i>)	41	9	22,0	baja
Chilchico <i>Salvia tiliifolia</i>	41	6	14,6	baja
Lengua de vaca (<i>Rumex crispus</i>)	41	6	14,6	baja
Capiquí (<i>Stellaria media</i>)	41	4	9,8	baja
Corazón herido (<i>Polygonum nepalense</i>)	41	3	7,3	baja
Hierva mora (<i>Solanum nigrum</i>)	41	3	7,3	baja
Llanten menor, siete venas (<i>Plantago lanceolata</i>)	41	3	7,3	baja
Lengua de cuy (<i>Polygonum aviculare</i>)	41	3	7,3	baja
Pacunga				

(<i>Bidens pilosa</i>) Cerraja	41	3	7,3	baja
(<i>Sonchus oleraceus</i>) Neguilla	41	2	4,9	baja
(<i>Ipomoea purpurea</i>) Orejuela	41	2	4,9	baja
(no identificada) Alfalfilla	41	2	4,9	baja
(<i>Melilotus indicus</i>) Diente de león	41	1	2,4	baja
(<i>Taraxacum officinale</i>) Heno de castilla	41	1	2,4	baja
(<i>Aira caryophylla</i>) Mastuerzo	41	1	2,4	baja
(<i>Coronopus didymus</i>) Mostacilla	41	1	2,4	baja
(<i>Rapistrum rugosum</i>) Nabo de campo	41	1	2,4	baja
(<i>Brassica rapa</i>) Ortiga	41	1	2,4	baja
(<i>Urtica urens</i>) Senecio común	41	1	2,4	baja
(<i>Senecio vulgaris</i>) Trébol blanco	41	1	2,4	baja
(<i>Trifolium repens</i>) Familia Asteraceae (no identificada)	41	1	2,4	baja

Tal como se puede observar en la Tabla 3, de las 29 malezas registradas; no existen especies con frecuencia alta, 3 presentan frecuencia media y 26 frecuencia baja.



Figura 4. Malezas con mayor porcentaje de frecuencia identificadas en el área de estudio. A) *Chenopodium album*, B) *Malva parviflora* y C) *Galinsoga quadriradiata*

En cuanto a los resultados de especies con frecuencia media, ninguno de los estudios realizados anteriormente coincide con los encontrados en el presente estudio, sin embargo

algunas de las malezas identificadas con baja frecuencia coinciden con algunos estudios como se describen a continuación:

Albuja (2008) concluye que en la unidad productiva de duraznero en la granja “La Pradera” de la parroquia Chaltura, existe una predominancia de malezas como: pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), garranchuela (*Digitaria sanguinalis*) de la familia de las Poaceae, y también malezas anuales como: bledo (*Amaranthus hybridus* L.), rábano silvestre (*Brassica rapa* L), entre otras, de las cuales tres de ellas coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación. Por otra parte Gil, Ayala, Marín y Gonzáles (2009), reportaron solo tres especies de arvenses comunes *Polygonum nepalense*, *Sonchus oleraceus* y *Sonchus asper* encontradas en los diferentes cultivos de tomate de árbol muestreados de las cuales dos de ellas son similares a las encontradas en el presente estudio.

En otro estudio realizado por Sierra, Gil, Patiño & Gonzales (2012) en el departamento de Antioquia (Colombia) para determinar las posibles arvenses hospedantes de *potyvirus* asociados a la enfermedad conocida como “virosis del tomate de árbol”, se seleccionaron las diez especies de malezas más comunes en el cultivo de tomate de árbol, que eran las siguiente: *Amaranthus dubius*, *Sonchus oleraceus*, *Brassica campestris*, *Tinantia erecta*, *Cyperus odoratus*, *Fuertesimalva peruviana*, *Polygonum nepalense*, *Hypochaeris radicata*, *Senecio vulgaris* y *Rumex crispus*, de las cuales cinco de estas malezas coinciden con las identificadas en el presente estudio.

Por otra parte Viera et al. (2015), en un estudio sobre arvenses asociadas a los cultivos de naranjilla y tomate de árbol, en las localidades de El Chaco, provincia de Napo y Río Negro, provincia de Tungurahua, concluyeron que; las especies *Eragrostis sp.*, *Stellaria ovata*, *Calamagrostis macrophylla*, *Asteraceae 2*, *Festuca sp.* y *Acmella alba* se encontraron en mayor proporción en el cultivo de tomate de árbol en El Chaco, mientras que las especies *Stellaria sp.*, *Dioscorea sp.*, *Calceolaria chelidonioides*, *Borreria latifolia* y *Paspalum coryphaeum* se encontraron mayoritariamente en la localidad de Río Negro. De estas especies solo una coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Después de lo anterior expuesto y en comparación con los resultados obtenidos se deduce que las malezas como parte de una vegetación silvestre o cultivada no dependen del tipo de cultivo al cual están asociadas sino que están sujetas a cambios en sentido horizontal de una superficie a otra o en forma vertical por variaciones altitudinales. Los cambios en

espacios pueden efectuarse también en formas abruptas o discontinuas y en forma progresiva. Así mismo las alteraciones en el tiempo pueden ser periódicas, anuales o sucesionales (Cerna, 2013).

4.2. Presencia de virus en malezas

4.2.1. Detección del virus X de la papa (PVX).

Una vez extraídos los ácidos nucleicos del material vegetal de las malezas con posibles síntomas de virus, se sometió al análisis de hibridación molecular utilizando una sonda específica para el virus PVX, con la finalidad de determinar la presencia o ausencia del patógeno en estudio. Una vez realizado el respectivo análisis y tal como se puede observar en la Fig. 5, todas las muestras resultaron negativas a la hibridación molecular puesto que todos los puntos son incoloros notándose claramente la marca de control positivo (esquina inferior derecha de la membrana Fig. 5).

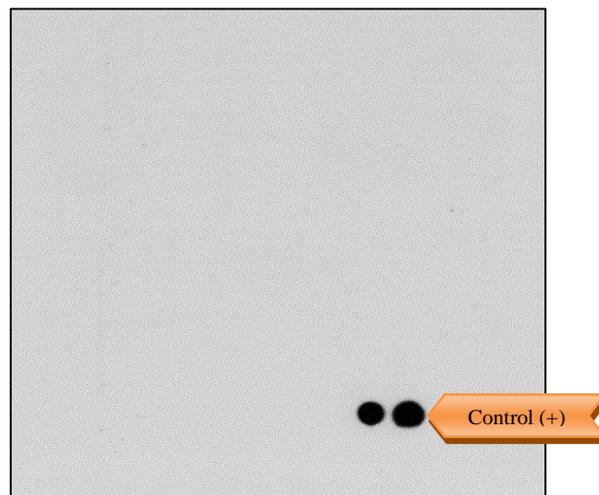


Figura 5. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota, donde se puede observar que ninguna de las muestras se coloreó. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior derecha de la membrana resultó positiva



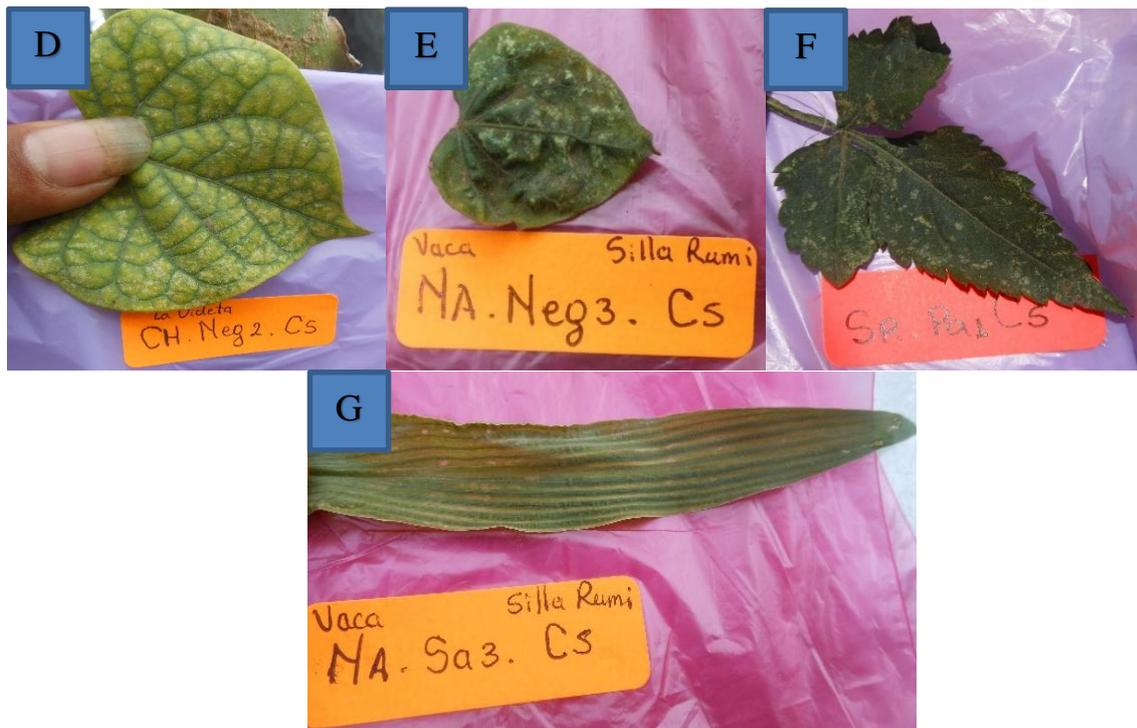


Figura 6. Muestras con presuntos síntomas de PVX. A) Ortejuela (no identificada) recolectada en Natabuela, B) *Malva parviflora* recolectada en Chaltura, C) *Malva parviflora* recolectada en Natabuela, D) *Ipomoea purpurea* recolectada Chaltura, E) *Ipomoea purpurea* recolectada en Natabuela, F) *Bidens pilosa* recolectada en San Roque G) *Digitaria sanguinalis* recolectada en Natabuela

A pesar de que las muestras mostraron síntomas similares (clorosis y mosaicos) a los ocasionados por PVX (Fig. 6), los resultados obtenidos en esta investigación no coinciden con los encontrados por Rivas et al. (1995), quienes por medio de la prueba DAS-ELISA identificaron la presencia de PVX en *Ipomoea sp.*, planta silvestre asociada al cultivo de tomate y chile dulce en Costa Rica.

Al no existir reacción positiva al PVX en ninguna de las muestras recolectadas, se asume que, síntomas similares pueden ser producidos por diferentes virus; el mismo virus puede producir un amplio rango de síntomas dependiendo de la variante del propio virus, del ambiente y genotipo del hospedante; otros factores bióticos también producen síntomas similares (Mena, 2010)

Según Riley, Williamson y Maloy (2002), las variaciones sintomatológicas mostradas por las plantas enfermas pueden resultar en un diagnóstico incorrecto. Estas variaciones pueden resultar a causa de varios factores. Puede ser que esté presente más de un problema y en algunos casos, que estén involucrados más de un patógeno en la infección de la planta. Los síntomas asociados en estos casos pueden ser significativamente distintos de los síntomas expresados en

respuesta a cada uno de los diferentes patógenos actuando de manera individual. Los síntomas de la enfermedad manifestados por múltiples patógenos infectando a una planta pueden ser tanto más o menos severos que si la planta fuese infectada solamente por uno de estos patógenos.

En cuanto a la técnica de diagnóstico utilizada en esta investigación tiene importantes ventajas en comparación a las técnicas Elisa y PCR que se utilizan en Ecuador. La técnica Elisa tiene la desventaja de que al existir gran cantidad de aminoácidos comunes que comparten las proteínas de las cápsidas de los virus conduce en muchas ocasiones a reacciones cruzadas que impide al investigador determinar con certeza el agente causal de una patología vegetal particular; asimismo, se dan casos en que, dada la baja concentración del virus en un tejido vegetal particular, es imposible detectarlo con este tipo de estrategia (Harrisson, Swanson & Forguette, 2002).

Vaca, Betancurt y López (2011) aseguran que la sensibilidad de la hibridación molecular tipo *dot blot* es mayor que la PCR, independientemente del estado del ciclo infeccioso del patógeno ya que detecta al agente infeccioso sin necesidad de replicarse; en cambio la PCR requiere que haya abundantes copias del genoma viral que permita amplificar un fragmento de RNA de un tamaño esperado. Vale la pena destacar que la técnica *dot blot* se rige por el principio del todo o nada, es decir, hay o no hay presencia de una entidad viral particular, dada la alta sensibilidad de esta prueba.

Con referencia a lo anterior Iglesia, Arocha, Peralta y Álvarez (2005) manifiestan que, la hibridación de ácidos nucleicos no radioactiva HAN-NR tipo *dot blot* posee ventajas tecnológicas y económicas sobre los ensayos de PCR refiriéndose principalmente, a la factibilidad de manipulación, la minimización de los riesgos de contaminación y el costo inferior de infraestructura. Batista et al. (2008); Hernández, Pérez, Luis y Peña (2014) mencionan que para investigaciones que requieran el procesamiento de un número alto de muestras se recomienda el uso de la técnica de hibridación molecular tipo *dot blot* debido a su alta especificidad de diagnóstico y su capacidad para el procesamiento de muchas muestras en un mismo estudio.

4.2.2. Detección del virus Y de la papa (PVY).

Una vez que las muestras fueron sometidas a Hibridación Molecular no Radioactiva utilizando una sonda específica para el virus PVY y tal como se puede observar en la Fig. 7,

algunas muestras de hierba mora (*Solanum nigrum*) con presuntos síntomas de virus recolectadas en las parroquias de Natabuela, Chaltura y San Roque; y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) recolectada en cultivo de San Roque, resultaron positivas ya que se colorearon al igual que los puntos de control positivo (marca de control positivo esquina inferior derecha de la membrana Fig. 7).

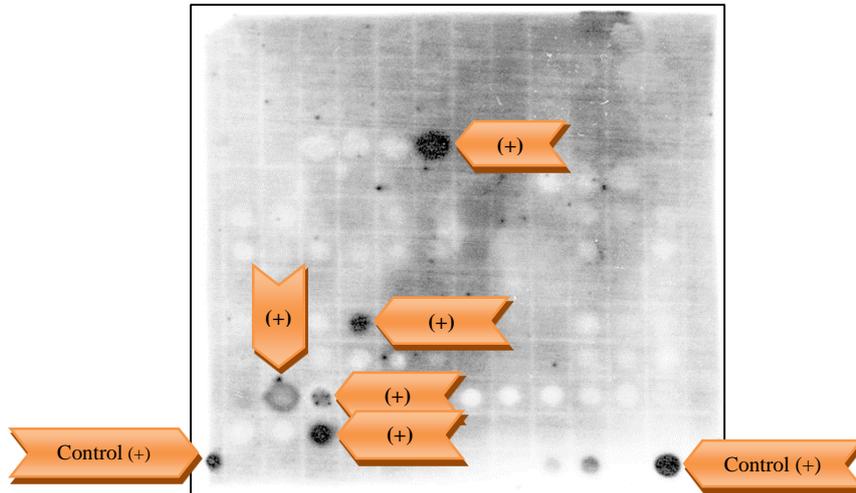


Figura 7. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota. Las muestras de *Solanum nigrum* recolectadas en las tres parroquias resultaron positivas. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior izquierda y derecha de la membrana

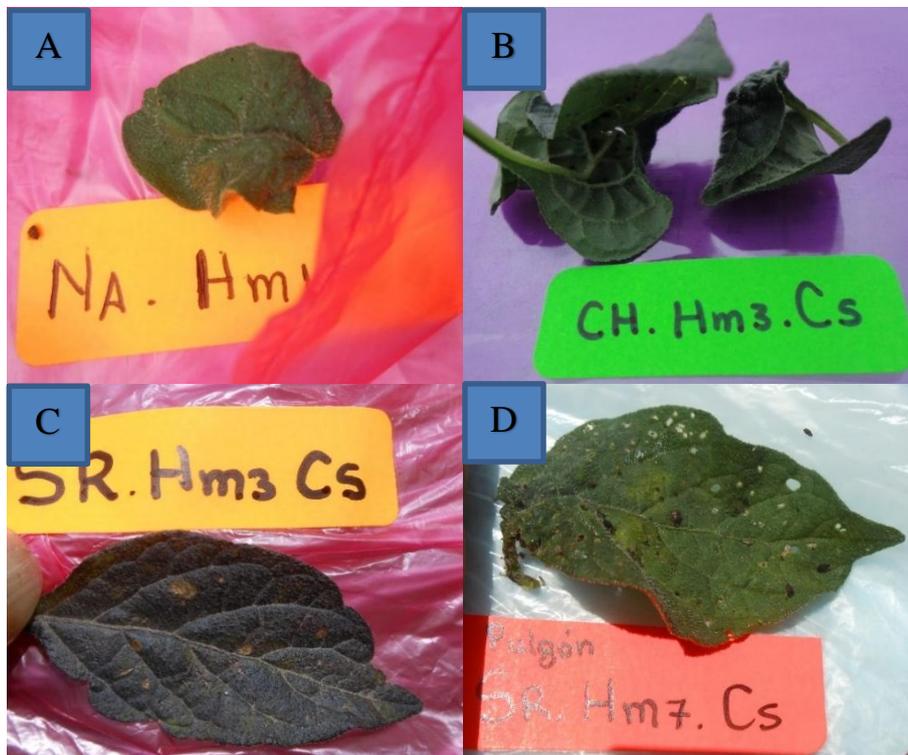




Figura 8. Muestras con síntomas y resultados positivos al virus PVY. A) *Solanum nigrum* recolectada en Natabuela, B) *Solanum nigrum* recolectada en Chaltura, C) *Solanum nigrum* recolectada en San Roque, D) *Solanum nigrum* recolectada en San Roque, E) *Solanum betaceum* recolectada en cultivo de San Roque

Es importante destacar la relación de los resultados, debido a que las muestras analizadas resultaron positivas para PVY, en muestras sintomáticas (arrugado de hojas, necrosis e insectos vectores) de malezas como de cultivo (Fig. 8). Por lo anterior expuesto se puede indicar con seguridad que la maleza conocida como hierba mora (*Solanum nigrum*) al hospedar el mismo virus que afecta al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), lo mantiene activo en el campo y, por medio de insectos vectores, luego los traspasan a las plantas cultivadas.

Los resultados alcanzados en la presente investigación, no coinciden con los encontrados por Rivas et al. (1995), quienes por medio de la prueba DAS-ELISA identificaron la presencia de PVY en *Melampodium sp.*, planta silvestre asociada al cultivo de tomate y chile dulce en Costa Rica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, coinciden con los encontrados por Ormeño et al. (2005) quienes en un estudio similar realizado en Chile sobre la presencia de diferentes virus de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en especies de malezas asociadas al cultivo determinan presencia de PVY en tomatillo o hierba mora (*Solanum nigrum* L.). Además se reportó en ambo (*Nicandra physaloides* L.), cerraña o ñilue (*Sonchus oleraceus* L.) y chamico (*Datura stramonium* L.).

Por otro lado Ormeño et al. (2006) en un estudio de malezas del género *Datura* como factor epidemiológico del AMV, CMV) y PVY en Solanáceas; establecieron la presencia de PVY en plantas de chamico (*Datura stramonium*) en Chile y el porcentajes de infección fue de 5%, estos resultados no coinciden con los obtenidos en el presente estudio.

4.2.3. Detección del virus del mosaico de la alfalfa (AMV).

Las muestras fueron sometidas a Hibridación Molecular no Radioactiva utilizando una sonda específica para el virus AMV. Una vez realizado el respectivo análisis y tal como se observa en la Fig. 9, la muestra de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y alfalfa (*Medicago sativa*) como planta voluntaria recolectadas en las parroquia de Natabuela resultaron positivas a la hibridación molecular ya que se colorearon al igual que los puntos de control positivo y la mayoría de los puntos son incoloros apreciándose claramente una notada diferencia con la marca de control positivo (esquina inferior derecha de la membrana Fig. 9).

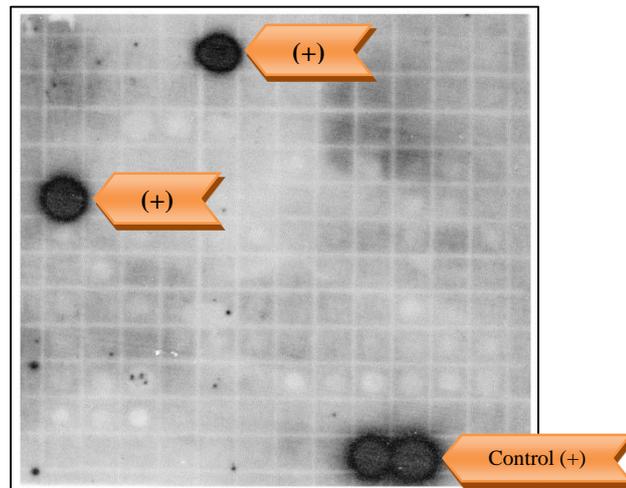


Figura 9. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota. Las muestras de *Solanum betaceum* y *Medicago sativa* resultaron positivas. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior derecha de la membrana



Figura 10. Muestras sintomáticas con resultados positivos al virus AMV recolectadas en Natabuela. A) *Solanum betaceum*, B) *Medicago sativa* como planta voluntaria

En este punto es importante recalcar la coherencia de los resultados ya que las muestras analizadas resultaron positivas para AMV, en muestras sintomáticas (mosaico en alfalfa, folíolos curvados hacia abajo) de maleza (planta voluntaria) como de cultivo (Fig. 10), lo que otorga un mayor grado de confianza al análisis. Además se deduce que la alfalfa (*Medicago*

sativa) al hospedar el mismo virus lo mantiene activo en el campo y, por medio de insectos vectores, luego los traspasan a las plantas cultivadas.

Los resultados obtenidos en esta investigación difieren con los encontrados por Ormeño et al. (2005) quienes en un estudio realizado en Chile sobre la presencia de diferentes virus de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en especies de malezas asociadas al cultivo; informaron la presencia de AMV en bledo (*Amaranthus hybridus* L.), nicandra (*Nicandra physaloides* L.), quinguilla, cerraja o ñilue (*Sonchus oleraceus* L.) y pocoyuyo (*Galinsoga quadriradiata* Ruiz & Pavón).

Desde otro punto de vista Tun et al., (2012) en un estudio realizado sobre la incidencia del virus mosaico de la alfalfa en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán, México menciona que el virus AMV, también se transmite a través de las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), pero no se encontró en malezas como *Datura stramonium* L., *Solanum nigrum* L., *Chenopodium quinoa* Wild. y posiblemente *Melilotus* spp. que según el mismo autor son hospederas de virus, dichos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio.

4.2.4. Detección del virus de la clorosis infecciosa del tomate (TiCV).

Una vez realizado el respectivo análisis y tal como se puede observar en la Fig 12, todas las muestras resultaron negativas a la Hibridación Molecular no Radioactiva puesto que todos los puntos fueron incoloros a diferencia de la marca de control positivo (esquina inferior derecha de la membrana Fig. 11).

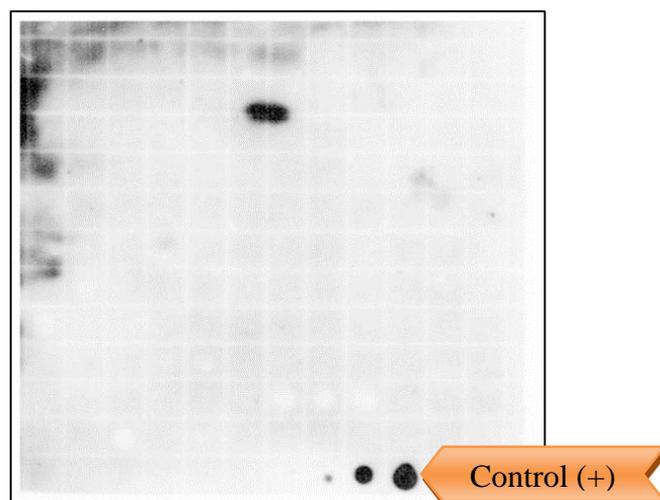


Figura 11. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de gota, no hay reacción positiva. (+) Control positivo colocado en la esquina inferior derecha de la membrana



Figura 12. Muestra de *Chenopodium album* recolectada en el área de estudio con síntomas similares a los ocasionados por TiCV

Pese a que las muestras de alpaquinua (*Chenopodium album* L.) presentaron síntomas similares (clorosis intervenal en hojas con manchas rojizas) a los ocasionados por TiCV (Fig. 12), no hubo reacción positiva a dicho virus. Los resultados obtenidos en esta investigación no coinciden con los encontrados por Anfoka & Abrary (2007), quienes realizaron un estudio sobre la aparición de virus de la clorosis infecciosa del tomate (TiCV) en Jordania y reportaron *Chenopodium álbum* y *Chenopodium murale* como malezas hospederas de dicho virus, con sintomatología de zonas amarillentas intervenales en hojas más viejas seguido de amarillamiento generalizado.

Al no existir reacción positiva al TiCV en ninguna de las muestras recolectadas, se asume que esto se debe a los mismos factores descritos en los resultados del virus PVX.

Tabla 4. Resumen de presencia de virus en malezas

Localidad	Muestra	Virus			
		PVX	PVY	AMV	TiCV
Natabuela	Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)		+		
Chaltura	Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)		+		
San Roque	Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)		+		
San Roque	Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)		+		

Tabla 5. Resumen de presencia de virus en alfalfa como planta voluntaria y cultivo de tomate de árbol

Localidad	Muestra	Virus			
		PVX	PVY	AMV	TiCV
Natabuela	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)			+	
San Roque	Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)		+		
Natabuela	Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)			+	

4.3. Nivel de incidencia de cada uno de los virus encontrados, según el tipo de maleza y localidad

En la Tabla 6, se indican las especies de malezas que dieron reacción positiva, comparando la incidencia que tuvo el virus Y de la papa en relación con el número total de muestras según la especie y localidad.

Tabla 6. Incidencia del PVY según el tipo de maleza y localidad

Localidad	Maleza	Nº total de muestras	Positivos	Incidencia %
San Roque	Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)	3	2	66,7
Natabuela	Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)	3	1	33,3
Chaltura	Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)	3	1	33,3

En la Tabla 7, se muestra la incidencia que tuvo el virus Y de la papa en relación con el número total de muestras de cultivo de tomate de árbol y la localidad en donde fue recolectada dicha muestra.

Tabla 7. Incidencia del PVY en el cultivo y localidad

Localidad	Cultivo	Nº total de muestras	Positivos	Incidencia %
San Roque	Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	1	1	100

En la Tabla 8, se indican la especie de maleza que dio reacción positiva, comparando la incidencia que tuvo el virus del mosaico de la alfalfa en relación con el número total de muestras según la especie y localidad.

Tabla 8. Incidencia del AMV según el tipo de maleza y localidad

Localidad	Maleza	Nº total de muestras	Positivos	Incidencia %
Natabuela	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), planta voluntaria	1	1	100

En la Tabla 9, se indica la incidencia que tuvo el virus del mosaico de la alfalfa en relación con el número total de muestras de cultivo de tomate de árbol y la localidad en donde fueron recolectadas dichas muestras.

Tabla 9. Incidencia del AMV en el cultivo y localidad

Localidad	Cultivo	Nº total de muestras	Positivos	Incidencia %
Natabuela	Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	3	1	33,3

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- De acuerdo al inventario de malezas más frecuentes se concluye que de las 29 malezas más predominantes identificadas en las zonas productoras de tomate de árbol del cantón Antonio Ante, ninguna se presenta con alta frecuencia; tres de las malezas se registran con frecuencia media como; alpaquinua (*Chenopodium album*), identificada en el 63,4% del total de lotes muestreados, malva (*Malva parviflora*) con 53,7 %, botonsillo (*Galinsoga quadriradiata*) con 41,5% y 26 de las malezas tienen baja frecuencia.
- En el Cantón Antonio Ante se ha identificado por primera vez malezas hospederas de virus. Se estableció la presencia del virus Y de la papa (PVY) en *Solanum nigrum* con una incidencia del 33% en Natabuela y Chaltura y un 66,7% en San Roque; además existe presencia de PVY en *Solanum betaceum* con una incidencia del 100% en San Roque. El virus del mosaico de la alfalfa (AMV) fue identificado en *Medicago sativa* como planta voluntaria con una incidencia del 100% y en *Solanum betaceum* con una incidencia del 33,3% en Natabuela.
- Las especies de malezas registradas con mayor frecuencia no son hospederas de los virus en estudio, sin embargo la hierba mora que se encontró con baja frecuencia resulta demasiado peligrosa ya que bastará la presencia de insectos vectores tan frecuentes como los pulgones para iniciar una epidemia en las plantas cultivadas.
- La técnica empleada en esta investigación denominada hibridación molecular no radioactiva utilizando sondas individuales ha sido empleada por primera vez en el país en la investigación de malezas hospederas de virus en las zonas productoras de tomate de árbol del cantón Antonio Ante, permitiendo identificar los virus en estudio de una forma más sensible, económica y rápida.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio más profundo de malezas hospederas de los virus PVY y AMV que dieron positivos, con ácidos nucleicos más purificados y con una técnica más sensible como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); la cual permite detectar concentraciones muy bajas del patógeno e identificarlo con mayor precisión, de tal manera que se pueda llegar a caracterizar y luego mediante secuenciación determinar si dichos virus son variantes.
- Una vez establecido la presencia de al menos uno de los cuatro virus en estudio se recomienda efectuar estudios de insectos vectores de transmisión de estos virus con la finalidad de generar información a los productores de tomate de árbol del cantón Antonio Ante y de esta forma mantener una baja incidencia de los virus.
- Realizar talleres de socialización de los resultados obtenidos en la presente investigación con el fin de que los productores de tomate de árbol tengan conocimiento de las enfermedades que está afectando al cultivo y tomen medidas preventivas, realizando un manejo adecuado de las malezas y plantas de crecimiento voluntario como la alfalfa, no solo dentro de los lotes sino que además en los alrededores y en los sectores cercanos a los cultivos, también deben eliminarse las especies de malezas que sobrevivan en los rastrojos, de lo contrario la producción se verá afectada tanto en cantidad como en calidad de la fruta.

REFERENCIAS

- Agrios, G. N. (2011). *Fitopatología*. México: Limusa.
- Albuja, L. M. (2008). *Evaluación de cinco herbicidas de acción sistémica en el control de malezas de la unidad productiva de duraznero en la granja "La Pradera" Chaltura-Imbabura* (tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Imbabura, Ecuador.
- Álvarez, J., Cotes, J., y Marín, M. (2011). Detección molecular de virus en material de siembra de tomate de árbol en Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 26(2), 80-91. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v26n2/rpv03211.pdf>
- Anfoka, G., & Abhary, M. (2007). Occurrence of Tomato infectious chlorosis virus (TICV) in Jordan. *EPPO bulletin*, 37(1), 186-190. doi: 10.1111/j.1365-2338.2007.01101.x
- Ávila, M. (2015). *Determinación de cipermetrina mediante cromatografía de gases en cultivos de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav) en la comunidad de Tababela-Pichincha-Ecuador* (tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6431/1/T-UCE-0008-088.pdf>
- Barriga, L. (2012). *Evaluación de la resistencia a Colletotrichum acutatum de poblaciones de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav) en estado de plántula. Cutuglahua – Pichincha 2011* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Ecuador.
- Batista, L., Peña, I., López, D., Pérez, J., y Llauger, R. (2008). Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos. *Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. La Habana, Cuba*. Recuperado de <http://www.concitver.com/manualdesaneamientoydiagnostico/T%C3%89CNICAS%20DE%20DIAGN%C3%93STICO%20DE%20ENFERMEDADES%20QUE%20AFECTAN%20A%20LOS.pdf>
- Blanchard, A., Rolland, M., Delaunay, A., & Jacqout, E. (2008). An international organization to improve knowledge on Potato virus Y. *Potato II Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 3, 6-9. Recuperado de

[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/FVCSB_3\(SI1\)/FVCSB_3\(SI1\)6-9o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0906/FVCSB_3(SI1)/FVCSB_3(SI1)6-9o.pdf)

- Burrows, M. E., & Zitter, T. A. (2005). Virus problems of potatoes. *Department of Plant Pathology, USDA-ARS, Cornell University, NY, 14853*. Recuperado de http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Potato_Virus.htm
- Cabrera, Z., y Wilson, R. (2012). *Estudio de factibilidad para la producción y exportación del tomate de árbol del cantón el chaco hacia España* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Castro, R. (2015, 9 de abril). Virus: Entre lo vivo y lo inanimado. *Gori-Gori*. Recuperado de http://gori-gori.blogspot.com/2015_04_01_archive.html
- Cerna, L. A. (2013). Ciencia y Tecnología de malezas. Trujillo, Perú. Recuperado de: http://www.upao.edu.pe/fondoeditorial/pdf/Ciencia_tecnologiamalezas.pdf
- Colimba, J., Falcón, E., Castro, E., Davila, D., Pallás, V., Sánchez, J., & Gómez, G., (2016). First report of Alfalfa mosaic virus in red pepper plants in Ecuador. Published por la Sociedad Americana de Fitopatología. doi: 10.1094/PDIS-07-15-0820-PDN
- Díaz, A., Quiñones, M., Arana, F., Soto, M., y Hernández, A. (2010). Potyvirus: Características generales, situación de su diagnóstico y determinación de su presencia en el cultivo del pimiento en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 25(2), 69-79. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n2/rpv01210.pdf>
- Druetta, M. A., Luna, I. M., y Ledda, A. R. (2015). Riqueza florística, frecuencia y abundancia de especies malezas en lotes agrícolas de la región este de Santiago del Estero. Recuperado de http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-riqueza_floristica_en_lotes_agricolas_del_este_de_sgo._del_estero_2015_0.pdf
- Eagles, R. M., Gardner, R. C., & Forster, R. L. (1994). Incidence and distribution of six viruses infecting tamarillo (*Cyphomandra betacea*) in New Zealand. doi: 10.1080/01140671.1994.9513857

- Espinoza, D. E. (2014). *Identificación de virus de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) por RT-PCR Y microscopía electrónica* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Fiscal, D. O., y Vaca, J. C. (2012). Búsqueda de hospederos alternativos del virus del mosaico amarillo de la papa, un begomovirus que afecta cultivos de tomate en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 61(5), 24. Recuperado de:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/38541/1/41442-187312-2-PB.pdf>
- Font, M. I., Martínez, P., Jorda, M. C., Louro, D., Vaira, A. M., & Accotto, G. P. (2002). First report of Tomato infectious chlorosis virus in Spain. *Plant Disease*, 86(6), 696-696. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.6.696A
- Gergerich, R. C., & Dolja, V. V. (2006). Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
- Gil, J., Ayala, M., Marín, M., y Gonzáles, E. (2009). Identificación de Potyvirus en cultivos de tomate de árbol (Polanum Betaceum Cav.) en Antioquia mediante detección serológica. *Revista Politécnica*, 5(8), 112-120. Recuperado de
<http://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/131/107>
- Guzmán, O., Castaño, J., y Villegas, B. (2009). Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico. *Agronomía*, 17(2), 7-24. Recuperado de
file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/ART_2009_Diagnostico_enfermedades_origen_biotico.pdf
- Harrison, B. D., Swanson, M. M., & Fargette, D. (2002). Begomovirus coat protein: serology, variation and functions. *Physiological and molecular plant pathology*, 60(5), 257-271. Recuperado de <https://eurekama.com/research/003/657/003657881.php>
- Heijting, S., Van Der Werf, W., Stein, A., & Kropff, M. J. (2007). Are weed patches stable in location? Application of an explicitly two-dimensional methodology. *Weed Research*, 47(5), 381-395. Recuperado de <http://edepot.wur.nl/121916#page=37>
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista P. (2014). *Metodología de la Investigación*. Colombia : McGraw-Hill.

Hernández, L., Pérez, E., Luis, M., y Peña, I. (2014). Evaluación de dos técnicas para la detección molecular de rickettsia asociada a la enfermedad del cogollo arrellado del papayo en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 29(2), 82-93. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n2/rpv02214.pdf>

Iglesia, A., Arocha, Y., Peralta, E. L., y Alvarez, E. (2005). *Detección de Leifsonia xyli subsp. xyli mediante hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva*. *Revista de Protección Vegetal*, 20(3), 156-160. Recuperado de <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=5&sid=0a94c4be-6a22-4bd7-b5a2-7e0725b03c05%40sessionmgr106&hid=123>

Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2012). Anuario meteorológico N° 52 – 2012. Recuperado de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/wp-content/uploads/anuarios/meteorologicos/Am%202012.pdf>

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2010), Quito, Ecuador. Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura. Granja Experimental Tumbaco. *Solanaceas silvestres utilizadas como portainjertos de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) con alto rendimiento, resistencia a enfermedades y mayor longevidad*.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2015). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC)*. Recuperado de: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014-2015/2015/Presentacion%20de%20resultados%20ESPAC_2015.pdf

Insuasti, A. y Ochoa, L., (2005). Etiología de las enfermedades virales del tomate de árbol en Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito (Ecuador). *Informe Técnico Anual-INIAP (Ecuador). Est. Exp. Santa Catalina. Departamento Nacional de Protección Vegetal estudios agronómicos, fitopatológicos y entomológicos de frutales nativos andinos*, 1-4. Recuperado de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=PADIPR.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=006418>

- Jamaica, D. (2013). *Dinámica espacial y temporal de poblaciones de malezas en cultivos de papa, espinaca y caña de azúcar y su relación con propiedades del suelo en dos localidades de Colombia* (tesis de maestría), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Jaramillo, M. M., Álvarez, J. A., y Montoya, M. M. (2012). Características de los virus asociados a la virosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. *Revista Lasallista De Investigación*, 9(1), 115-127. Recuperado de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/924/1/115-127.pdf>
- Lagos, L. K. (2012). *Evaluación del potencial genético de algunos parentales de tomate de árbol Cyphomandra betacea Cav. Sendt. A partir de un dialélico parcial circulante* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Lastres, L., y Soza, F. 2009. Manual de Sanidad Vegetal. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 75 p. Recuperado de http://www.se.gob.hn/media/files/media/Modulo_7_Manual_Sanidad_Vegetal..pdf
- Leon, J., Viteri, P., y Cevallos, G. (2004). Manual del cultivo de tomate de árbol. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=TXozAQAAMAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- León, M., y Guillermo, A. (2007). Control de plagas y enfermedades en los cultivos. Bogotá, Colombia: Grupo Latino Editores.
- Llanos, N. (2011). Clases y tipos de investigación y sus características. Universidad América, Bogotá Colombia. Recuperado de https://www.academia.edu/5075869/CLASES_Y_TIPOS_DE_INVESTIGACION_Y_SUS_CARACTERISTICAS
- Louro, D., Accotto, G. P., & Vaira, A. M. (2000). Occurrence and diagnosis of Tomato chlorosis virus in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 589-592. doi: 10.1023/A:1008738130592

- Lucas, K., Magui, J., y Yagual M. (2011). *Creación de una empresa de producción, comercialización y exportación de tomate de árbol en el área de Sangolquí, provincia de Pichincha* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Magallanes, M. A. (2009). *Distribucion del virus de la clorosis del tomate (ToCV) y el Virus de la clorosis infecciosa del tomate (TICV) infectando tomate (Lycopersicon esculentum Mill) en Sinaloa y su presencia en el noroeste de México* (tesis de maestría). Recuperado de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/3869/DISTRIBVIRUS.pdf?sequence=1>
- Martínez, G., Donaire, L., Llave, C., Pallas, V., & Gómez, G. (2010). High-throughput sequencing of Hop stunt viroid-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Molecular plant pathology*, 11(3), 347-359. doi: 10.1111/J.1364-3703.2009.00608.X
- Martínez, G. E. (2011). *Relación entre el silenciamiento de RNA y la patogénesis inducida por un viroide con replicación nuclear* (tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Mekuria, T. A. (2007). *A Study of Vascular Movement of Potato Virus X (PVX) TGBp1, TGBp2 and CP Using the Commelina Yellow Mottle Virus Promoter and GFP*. ProQuest. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=0549470212>
- Melgarejo, P., García-Jiménez, J., Jordá, M. C., López, M. M., Andrés, M. F., y Duran-Vila, N. (2010). *Patógenos de plantas descritos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2*. Recuperado de http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos_final_tcm7-1286.pdf
- Mena, J. D. (Agosto de 2010). *Virus (Virus Fitopatógenos)*. Departamento de protección vegetal rama de fitopatología, Sinaloa. Recuperado de <http://es.slideshare.net/themena1/manual-de-virus-virus-fitopatgenos-5039306>

- Meza, N., y Méndez, J. M. (2009). Características del fruto de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* [Cav.] Sendtn) basadas en la coloración del arilo, en la Zona Andina Venezolana. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(2), 289-294. Recuperado de <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-CaracteristicasDelFrutoDeTomateDeArbolCyphomandraB-3308209.pdf>
- Monteros Guerrero, A., Sumba Lusero, E., Salvador Sarauz, S., (s.f.). Productividad Agrícola en el Ecuador. Quito, Ecuador. Recuperado de http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/indice_productividad.pdf
- Mora, C., Gallegos, P., Revelo, J., y Garcés, S. (2008). *Enfermedades, nematodos e insectos plaga del tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.): Una guía para su identificación en el campo*. Quito, Ecuador Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/513/1/iniapsci280.pdf>
- Morales, D. A., y Betancort, J. A. (2012). *Identificación de la flora arvense en cereales de invierno en tenerife y medidas de control*. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Recuperado de http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/cere_442_CERALES.pdf
- Morales, C. (2013). *Virus Fitopatógenos del Chile en México*. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/16307814.pdf>
- Moreno, P., Medina, V., y Romero, J. (2016). Virus: Aspectos generales. En M. Ayllón, M. Cambra, C. Llave y E. Moriones (Ed.), *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides* (pp. 25-51). Palencia, España: SEFLIBRROS. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=QGkeDQAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Moreno, L. P., Mendoza, G. H. N., Celedón, B. M., Galván, M. F. L., Hernández, L. R., y Franco, A. C. G. (2016). Incidencia, severidad y detección de virus fitopatógenos en lechuga, en el estado de Querétaro, México. *Acta Universitaria*, 26(2), 3-11. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/416/41645659001.pdf>

- Núcleo Ambiental S.A.S. (2015). *Manual Tomate de árbol. Bogotá, Colombia*. Recuperado de file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Tomate%20(2).pdf
- Ogawa, T., Tomitaka, Y., Nakagawa, A., & Ohshima, K. (2008). Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research*, 131(2), 199-212. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.010>
- Ormeño, J., Sepúlveda, P., y Rebufel, P. (2003). *Malezas: Hospederos alternativos de virus en pimiento*. Tierra Adentro, 52. Recuperado de: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR30114.pdf>
- Ormeño, J., y Sepúlveda, P. (2005). Presencia de diferentes virus de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en especies de malezas asociadas al cultivo. *Agricultura Técnica*, 65(4), 343-355. Recuperado de: <http://www.bioline.org.br/pdf?at05038>
- Ormeño, J., Sepúlveda, P., Rojas, R., & Araya, J. E. (2006). Datura Genus Weeds as an Epidemiological Factor of Alfalfa mosaic virus (AMV), Cucumber mosaic virus (CMV), and Potato virus Y (PVY) on Solanaceus Crops. *Agricultura Técnica*, 66(4), 333-341. Recuperado de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072006000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Pallás V., Sánchez J., Aparicio, F., y Herranz, M. (2010). Procedimiento para la detección simultánea de secuencias de virus mediante el uso de polisondas. Recuperado de <http://patentados.com/patente/procedimiento-deteccion-simultanea-viroides-mediante-uso-polisondas/>
- Paredes Vega, F. J. (2007). Proyecto de factibilidad para la producción y comercialización nacional del tomate de árbol en la parroquia Natabuela cantón Antonio Ante provincia de Imbabura. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Parrella, G. (2008). Interveinal yellowing caused by Tomato infectious chlorosis virus in lettuce and escarole in southern Italy. *Journal of phytopathology*, 156(3), 190-192. doi: 10.1111 / j.1439-0434.2007.01356.x

- Pilco, J. 2009. *Evaluación de dos formulaciones químicas a base de N- P- K para el crecimiento y desarrollo del tomate de árbol (Solanum betaceum)* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Pilco, J. (agosto de 2014). El mundo de las arvenses y su importancia en los cultivos de Ecuador. Recuperado de http://es.slideshare.net/jesuspilco/el-mundo-de-las-malezas-y-su-efecto-en-la-produccion-ecuador?qid=ac3a7d6d-d40c-4acb-bfe8-2904bb27ccd7&v=&b=&from_search=1
- Plan de Desarrollo de Ordenamiento Territorial (PDOT, 2011). Actualización Plan de Desarrollo de Ordenamiento Territorial del cantón Antonio Ante 2012 – 2030. Recuperado de http://www.antonioante.gob.ec/AntonioAnte/images/PDF/plan_desarrollo_cantonal_2011.pdf
- Revelo, J., Pérez, E., y Maila, M. (2004). Cultivo ecológico del tomate de árbol en Ecuador. Quito, Ecuador. Recuperado de http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Texto_consulta_estudiante_ecol%C3%B3gico_tomate_arbol.pdf
- Riley, M. B., Williamson, M. R., & Maloy, O. (2002). Diagnóstico de enfermedades en plantas. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1021-01
- Rivas, G., Ramírez, P., Hilje, L., y Cubillo, D., (1995). Detección de virus en plantas silvestres asociadas con el tomate y chile dulce en Costa Rica. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11554/7239>
- Rodríguez Fuerte, V. L., Jaramillo Zapata, M. M., Lagos Mora, L. E., Gutiérrez, P. A., y 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. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/695/69522600006.pdf>
- Rodríguez, C. (septiembre de 2011). Extractos vegetales contra virus fitopatógenos. Simposio llevado a cabo en el III encuentro internacional de investigación en cítricos, México.

- Ruiz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E., Ochoa Martínez, D., y Álvarez-Ramos, R. (2009). Sensibilidad de inmunoimpresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(1), 41-47. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000100007
- Rugeles, M. T. (2016). Diagnóstico molecular de las infecciones virales. *Fondo Editorial Biogénesis*, 151-157. Recuperado de <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/biogenesis/article/viewFile/326752/20784042>
- Sepúlveda, P. (Noviembre de 2005). Enfermedades causadas por virus en hortalizas de hoja. En E. Kehr (Ed.), *Fitosanidad en Hortalizas para la Zona Sur*. Seminario llevado a cabo en el Centro Regional de Investigación INIA Carillanca, Temuco, Chile. Recuperado de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR34572.pdf>
- Sepúlveda, P. (Ed.). (2011). Virus transmitidos por insectos vectores en tomate en la Región de Arica y Parinacota: situación actual y manejo. 64 p. Boletín INIA N° 224. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Investigación Agropecuaria del Desierto y Altiplano, Ururi. Arica, Chile. Recuperado de http://www.inapiprojecta.cl/605/articles-1668_recurso_1.pdf
- Sierra, A., Gil, J, Patiño L., & González, E. (2012). Evaluation of weeds as possible hosts of the potyviruses associated with tree tomato (*Solanum betaceum Cav.*) viroses. *Agronomía Colombiana* 30(1), 78-83. Recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/15872/46986>
- Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2013). *Boletín de productividad agrícola*. Quito, Ecuador. Recuperado de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap//EdicionAnual/ProducAgricola/productividad2013.pdf>

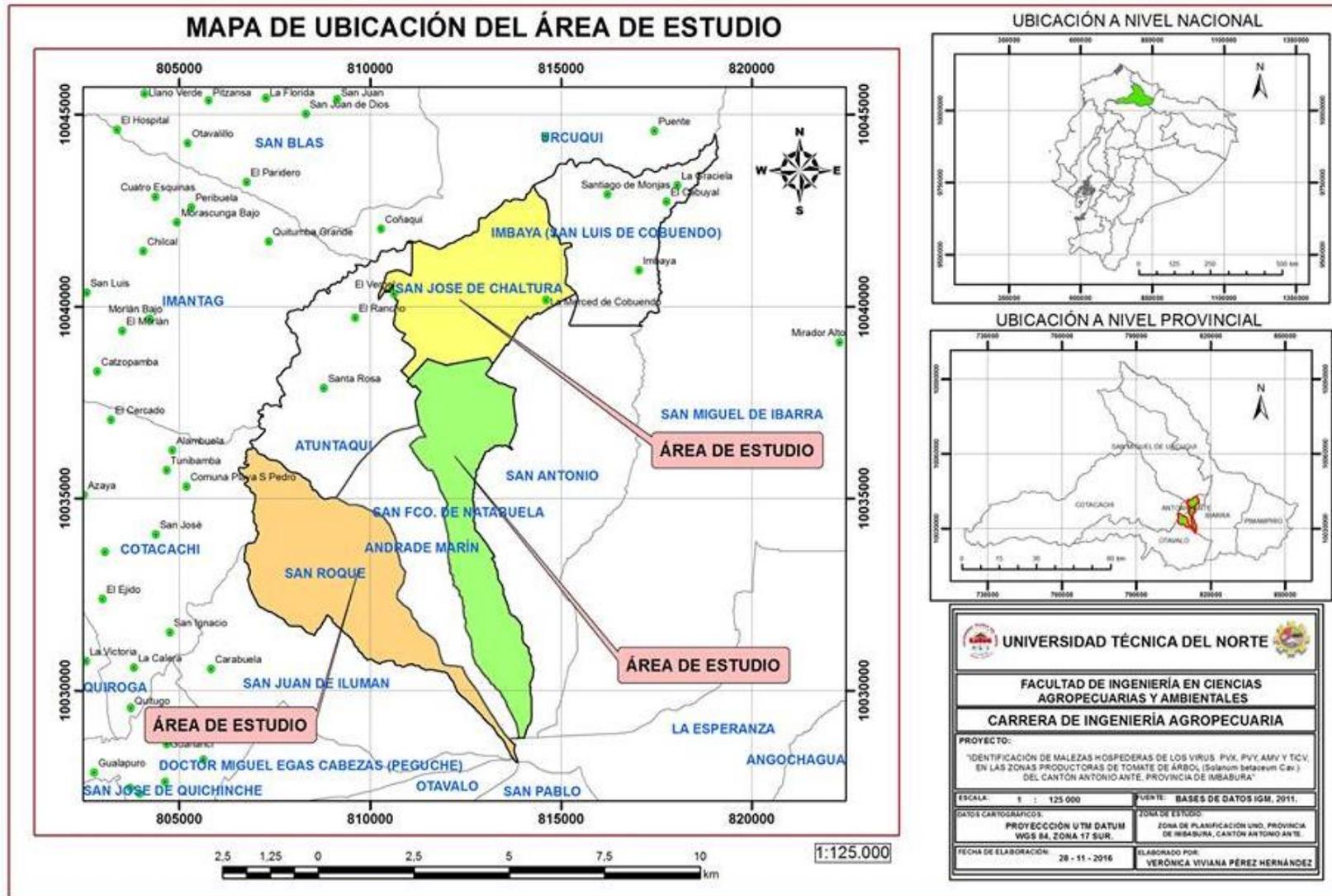
- Sivaprasad, Y., Viera, W., Patricia, G., & Orbe, K. (2016). FIRST REPORT OF POTATO VIRUS Y IN TREE TOMATO IN ECUADOR. *Journal of Plant Pathology*, 97(4sup), 73. doi: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I4SUP.019>
- Soto, A. (2007). Los virus vegetales. Universidad Nacional de Cuyo. Recuperado de http://campus.fca.uncu.edu.ar/pluginfile.php/25913/mod_resource/content/1/Los%20virus%20vegetales_2.pdf
- Tsai, W. S., Shih, S. L., Green, S. K., Hanson, P., & Liu, H. Y. (2004). First report of the occurrence of Tomato chlorosis virus and Tomato infectious chlorosis virus in Taiwan. *Plant Disease*, 88(3), 311-311. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.3.311B
- Tun, J., Zavaleta E., Ochoa D., Sánchez P., Soto M., y Cristóbal, J. (2012). Incidencia del virus mosaico de la alfalfa en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán, México. *Fitosanidad*, 11(1), 11-14. Recuperado de <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/viewFile/168/190>
- Urbina, M. (2011). Enfermedades causadas por Virus, micoplasmas y similares. Esteli. Recuperado de <https://martinurbina.files.wordpress.com/2011/08/unidad-vi-virus-final1.pdf>
- Vaca J., Betancurt J., y López K. (2011). Detección, identificación y localización geográfica de Begomovirus que afectan al tomate en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 115. Recuperado de <http://search.proquest.com/openview/b3ccbb4b714ede22f018a2eb8b0c5576/1?pq-origsite=gscholar>
- Velásquez R., Reveles L., Chew Y., y Mauricio, J. (2013). Virus y fitoplasmas asociados con el cultivo de chile para secado en el norte centro de México. *Folleto Técnico*, (49). Recuperado de <http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/VFcultivoCh.pdf>
- Viera, W., Mejía, P., Noboa, M., Obando, J., Sotomayor, A., Vásquez, C., y Viteri, D. (2015). Arvenses asociadas a los cultivos de naranjilla y tomate de árbol. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadrescoalidad/index.php/revista/article/view/6/12>

Viteri, J., Cruz, M., Bravo, J., y Viteri, F. (noviembre, 2011). Estructuración de buenas prácticas agrícolas y aplicación de la radiación UV-C en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Revista de investigación científica*. Año 2 – No. 2. Recuperado de <https://www.ute.edu.ec/pdf-itt/tsafiqui2/146700.pdf>

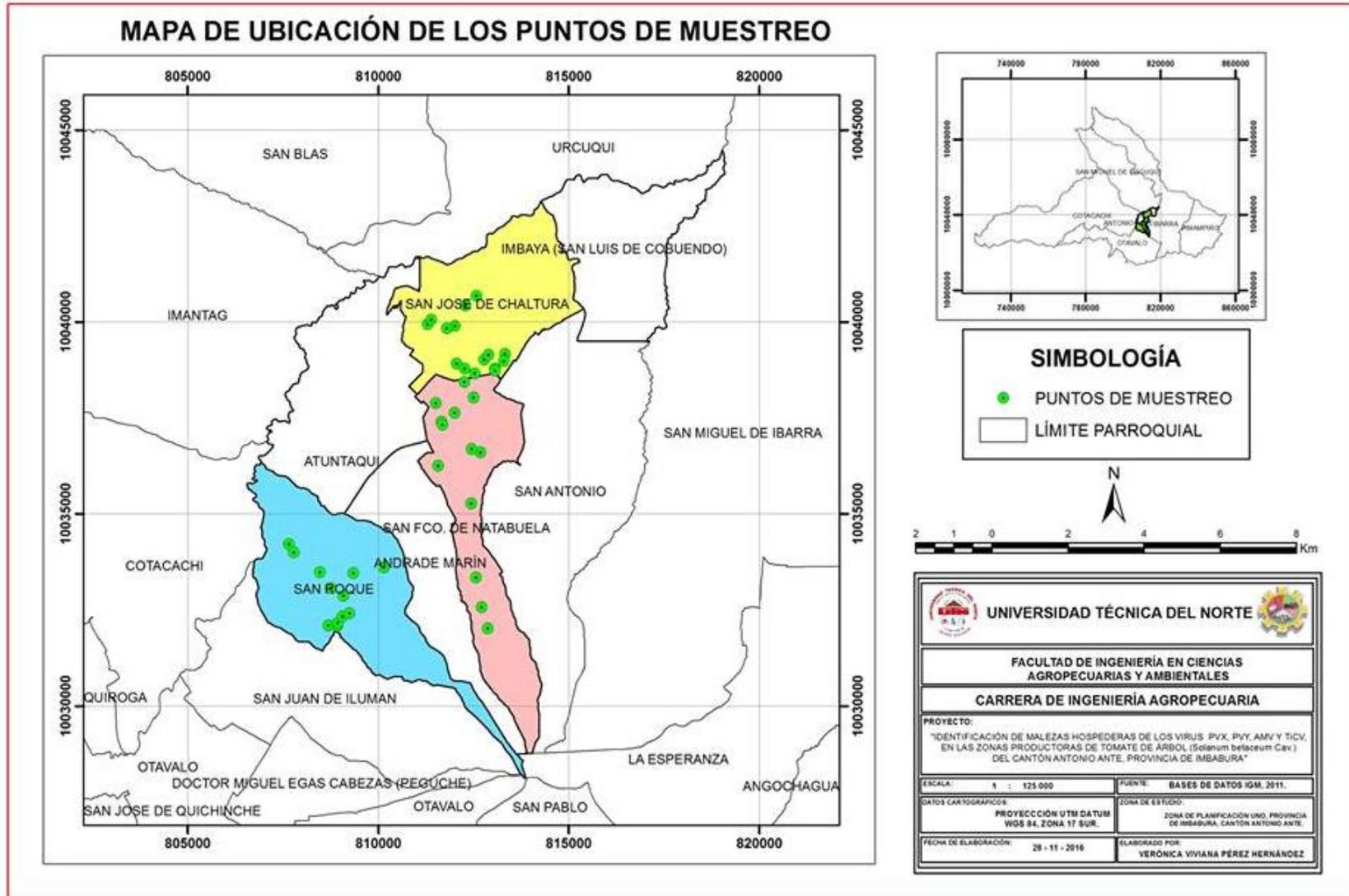
Vizuete, B., Insuasti, M. L., Ochoa, J., & Ellis, M. (1990). Biological and serological characterization of tree tomato virus diseases in Ecuador. *INIAP, Ohio State University*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/237596499_Biological_and_Serological_Characterization_of_Tree_Tomato_Virus_Diseases_in_Ecuador

ANEXOS

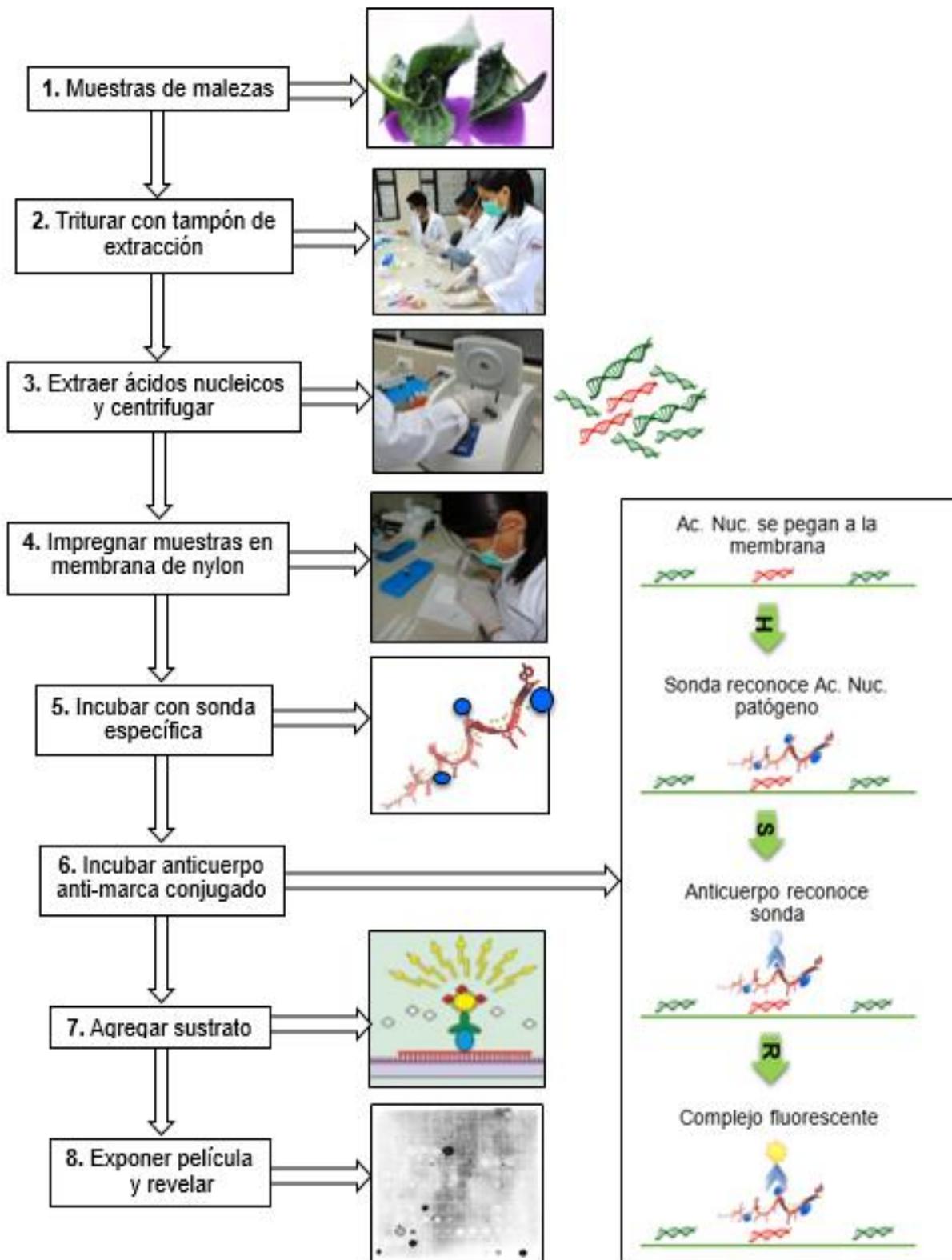
Anexo 1. Ubicación del área de estudio



Anexo 2. Ubicación de los puntos de muestreo



Anexo 3. Proceso de hibridación molecular con sondas de RNA



Anexo 4. Croquis de muestras impregnadas en membrana de nylon

NA.Coh1.Cs	NA.Coh2.Cs	NA.Coh1.Ss	NA.Tm1.Cs	NA.Tm2.Cs	NA.Tm3.Cs	NA.Neg1.Cs	NA.Neg2.Cs	NA.Neg3.Cs	NA.Ort1.Cs	NA.Ort2.Cs	NA.Ort1.Ss
NA.Ch1.Cs	NA.Ch2.Cs	NA.Ch3.Cs	NA.Am1.Cs	NA.Am3.Cs	NA.Am5.Cs	NA.Ma1.Cs	NA.Ma3.Cs	NA.Ma4.Cs	NA.Ce1.Ss	NA.Ce2.Ss	NA.Ce3.Cs
NA.Ca1.Cs	NA.Ca2.Cs	NA.Fas1.Cs	NA.Fas2.Cs	NA.Fas1.Ss	NA.Hm1.Cs	NA.Hm2.Cs	NA.Hm3.Cs	NA.Bo1.Cs	NA.Bo2.Cs	NA.Bo1.Ss	NA.Ra1.Cs
NA.Ra2.Cs	NA.Ra4.Cs	NA.Ore1.Cs	NA.Ore2.Cs	NA.Ore1.Ss	NA.AI1.Cs	NA.AI2.Cs	NA.AI3.Cs	NA.BI2.Cs	NA.BI3.Cs	NA.BI4.Cs	NA.Sa3.Cs
NA.Alf1.Cs	NA.AI4.Cs	NA.Tm4.Cs	CH.Ce2.Cs	CH.Ce5.Cs	CH.Ce6.Cs	CH.Ca1.Cs	CH.Ca2.Cs	CH.Ca3.Cs	CH.AI1.Cs	CH.AI5.Cs	CH.AI6.Cs
CH.Pa1.Cs	CH.Pa2.Cs	CH.Pa2.Ss	CH.Ra3.Cs	CH.Ra2.Cs	CH.Ra4.Cs	CH.Am1.Ss	CH.Am2.Cs	CH.Am2.Ss	CH.Bo3.Cs	CH.Bo4.Cs	CH.Bo5.Cs
CH.Tm1.Cs	CH.Tm2.Cs	CH.Ma4.Cs	CH.Ma5.Cs	CH.Ma6.Cs	CH.Neg1.Ss	CH.Neg2.Cs	CH.Ch2.Cs	CH.Ch4.Cs	CH.Ch7.Cs	CH.Ort1.Cs	CH.Ort2.Cs
CH.Ort1.Ss	CH.Hm1.Cs	CH.Hm2.Cs	CH.Hm3.Cs	CH.BI2.Cs	CH.BI3.Cs	CH.BI5.Cs	CH.Bo6.Cs	CH.Vi1.Cs	SR.AI1.Cs	SR.AI2.Cs	SR.AI1.Ss
SR.BI1.Cs	SR.BI2.Cs	SR.BI1.Ss	SR.Bo1.Cs	SR.Bo2.Cs	SR.Bo1.Ss	SR.Ca1.Cs	SR.Ca3.Cs	SR.Ca2.Cs	SR.Ce1.Cs	SR.Ce2.Cs	SR.Ce3.Cs
SR.Hm2.Cs	SR.Hm3.Cs	SR.Hm7.Cs	SR.Ma1.Cs	SR.Ma2.Cs	SR.Ma3.Cs	SR.Ort1.Cs	SR.Ort2.Cs	SR.Ort1.Ss	SR.Pa1.Cs	SR.Pa2.Cs	SR.Pa1.Ss
SR.Ra1.Ss	SR.Ra2.Ss	SR.Tm1.Cs	SR.Am1.Cs	SR.Neg1.Cs							

Plantas muestreadas	Sigla
Alpaquinua (<i>Chenopodium album</i>)	Al
Ambo (<i>Nicandra physaloides</i>)	Am
Botoncillo (<i>Galinsoga quadriradiata</i>)	Bo
Bledo (<i>Amaranthus hybridus</i>)	Bl
Capiquí (<i>Stellaria media</i>)	Ca
Cerraja (<i>Sonchus oleraceus</i>)	Ce
Corazón herido (<i>Polygonum nepalense</i>)	Coh
Chamico (<i>Datura stramonium</i>)	Ch
Familia Asteraceae (no identificada)	Fas
Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)	Hm
Malva (<i>Malva parviflora</i>)	Ma
Neguilla (<i>Ipomoea purpurea</i>)	Neg
Orejuela (no identificada)	Or
Ortiguilla (<i>Veronica persica</i>)	Ort
Pacunga (<i>Bidens pilosa</i>)	Pa
Rábano (<i>Raphanus raphanistrum</i>)	Ra
Saragigua (<i>Digitaria sanguinalis</i>)	Sa
Vinagrillo (<i>Oxalis corniculata</i>)	Vi
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Alf
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Tm

Parroquia	Sigla
San Francisco de Natabuela	NA
San José de Chaltura	CH
San Roque	SR

Sintomatología	Sigla
Con síntomas	Cs
Sin síntomas	Ss

Plantas muestreadas	Nº de muestras
Alpaquinua (<i>Chenopodium album</i>)	10
Ambo (<i>Nicandra physaloides</i>)	7
Botoncillo (<i>Galinsoga quadriradiata</i>)	10
Bledo (<i>Amaranthus hybridus</i>)	9
Capiquí (<i>Stellaria media</i>)	8
Cerraja (<i>Sonchus oleraceus</i>)	9
Corazón herido (<i>Polygonum nepalense</i>)	3
Chamico (<i>Datura stramonium</i>)	6
Familia Asteraceae (no identificada)	3
Hierba mora (<i>Solanum nigrum</i>)	9
Malva (<i>Malva parviflora</i>)	9
Neguilla (<i>Ipomoea purpurea</i>)	6
Orejuela (no identificada)	3
Ortiguilla (<i>Veronica persica</i>)	9
Pacunga (<i>Bidens pilosa</i>)	6
Rábano (<i>Raphanus raphanistrum</i>)	8
Saragigua (<i>Digitaria sanguinalis</i>)	1
Vinagrillo (<i>Oxalis corniculata</i>)	1
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), planta voluntaria	1
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>), cultivo	7
TOTAL	125

Anexo 5. Certificado de análisis de muestras



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

Yo **Gustavo Germán Gómez**, nacional de Argentina con pasaporte **20.078.353N**, Científico Titular del CSIC del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, en Valencia, España.

Dejo constancia que en el laboratorio que tengo a mi cargo, se analizaron 125 muestras de ácidos nucleicos extraídos de malezas. Cada una de estas muestras fue sometida a Hibridación Molecular no Radiactiva utilizando sondas individuales de los siguientes virus: Virus Y de la Papa (PVY), Virus X de la Papa (PVX), Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV) y el Virus de la Clorosis Infecciosa del Tomate (TiCV), con la finalidad de detectar la presencia de los cuatro virus antes mencionados.

Cabe indicar que las muestras fueron enviadas desde el Ecuador, por la señora **Verónica Viviana Pérez Hernández**, con cédula N° 040170744-3, quien está realizando su trabajo de titulación en la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, en la Universidad Técnica del Norte.

Para ser presentado a quien corresponda

Firmo en Valencia a 16 de Mayo de 2016.

Dr. Gustavo G. Gómez

ibmcp@ibmcp.upv.es

CPI- EDIF. 8E
INGENIERO FAUSTO ELÍO, 5IN
46011-VALENCIA
TEL : 96 387 78 56
FAX : 96 387 78 59

Anexo 6. FOTOGRAFÍAS

DELIMITACIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO

Foto 1. Recorridos de campo



Foto 2. Toma de datos



REGISTRO DE MALEZAS

Foto 3. Distribución de malezas en parches



Foto 4. Recorrido del lote de producción



Foto 5. Reconocimiento de malezas

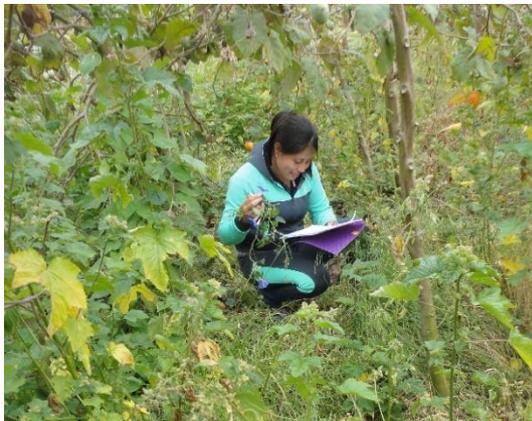


Foto 6. Maleza identificada



Foto 13. Maleza con posibles síntomas de virus



Foto 14. Planta de tomate de árbol con posibles síntomas de virus



Foto 15. Insectos vectores de virus presentes en malezas



Foto 16. Insectos vectores de virus presentes en planta de tomate de árbol



PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Foto 17. Preparación de tampón de extracción



Foto 18. Tampón de extracción



Foto 19. Muestras congeladas



Foto 20. Descongelación de muestras



Foto 21. Trituración de muestras



Foto 22. Tejido triturado

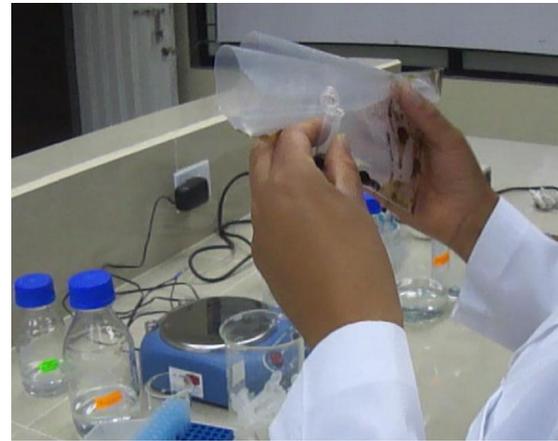


Foto 23. Ácidos nucleicos



Foto 24. Centrifugación de ácidos nucleico

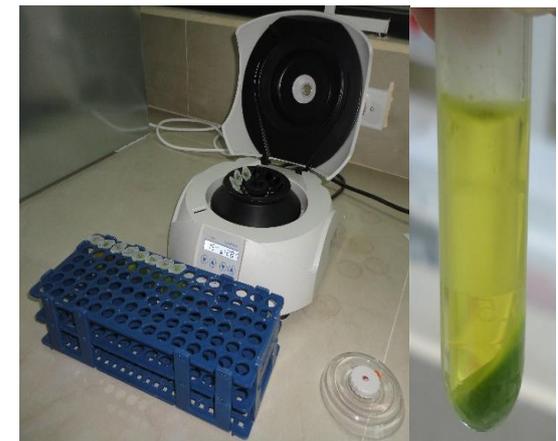
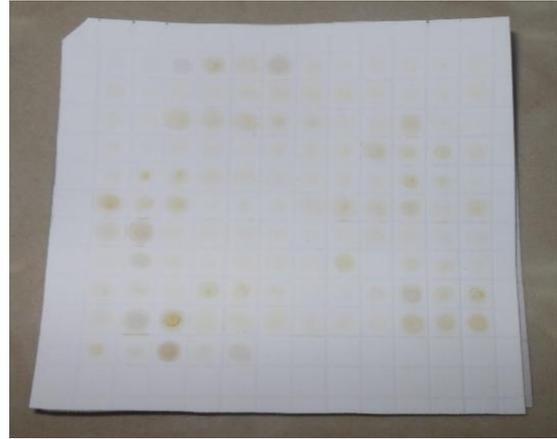


Foto 25. Inmovilización de ácidos nucleicos



Foto 26. Membrana de nylon impregnada



HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Foto 27. Tampón de pre hibridación

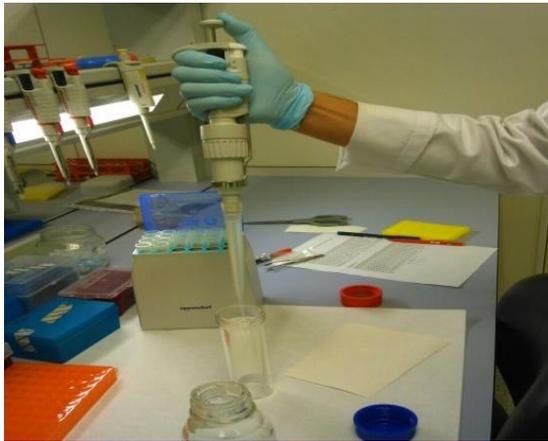


Foto 28. Tubo de hibridación

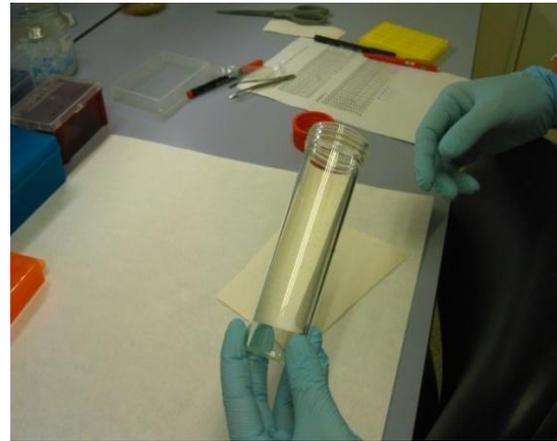


Foto 29. Tambor de hibridación



Foto 30. Horno de hibridación

