



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN DEL
VIRUS DEL MOSAICO DEL TOMATE (ToMV) MEDIANTE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-PCR)

AUTORAS

Dayanna Sofía Ortiz Delgado

Ahyme María Ramírez Suárez

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO DE DETECCIÓN DEL VIRUS
DEL MOSAICO DEL TOMATE (ToMV) MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE
LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-PCR)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autoras

Dayanna Sofía Ortiz Delgado

Ahyme María Ramírez Suárez

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Estandarización de un método rápido de detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR), a través de reuniones periódicas con las estudiantes Dayanna Sofía Ortiz Delgado y Ahyme María Ramírez Suárez, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

C.C: 1718092701

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Estandarización de un método rápido de detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR), de las estudiantes Dayanna Sofía Ortiz Delgado y Ahyme María Ramírez Suárez, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Isabel Ballesteros Redondo

Doctora en Biología

C.C: 1757168610

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido este trabajo, Estandarización de un método rápido de detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR), a través de reuniones periódicas con las estudiantes Dayanna Sofía Ortiz Delgado y Ahyme María Ramírez Suárez, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

David Alejandro Jarrín Escudero

Ingeniero en Biotecnología

C.C: 1719601310

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes “.

Dayanna Sofía Ortiz Delgado

CC: 1716075732

Ahyme María Ramírez Suárez

CC: 1717484925

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primero a Dios, por bendecirnos siempre con todo lo que tenemos y permitirnos culminar con éxito esta etapa tan importante de nuestras vidas.

A nuestros padres, por permitirnos estudiar en esta institución y por ser nuestro apoyo incondicional.

A nuestro docente guía Fernando Rivas y a nuestro director científico David Jarrín, por transmitir sus conocimientos, por su valioso apoyo y motivación y por haber colaborado en la realización de nuestra tesis.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi familia, ya que a lo largo no sólo de mi carrera universitaria, sino de mi vida he podido contar siempre con ellos. Tengo el amor de una maravillosa madre; cariño, enseñanzas y disciplina de un gran padre; fortaleza, guía y compañía de mi querida hermana y mi querido hermano. Esto no hubiera sido posible sin ustedes, su apoyo incondicional me alienta a seguir adelante a pesar de cualquier adversidad.

Dayanna Sofía Ortiz Delgado

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi madre Alkinza, gracias a tu esfuerzo logré culminar mis estudios y a pesar de las circunstancias siempre me brindaste tu apoyo incondicional. A mi padre Luis , a pesar de que ya no estés a mi lado, tu espíritu siempre me acompañó durante mi vida universitaria y sé que te sientes orgulloso de mí.

A mi hermana Jessie , gracias por tu apoyo .A mi tía Alexandra y mis primos Christian y María Paula, los considero mis hermanitos, gracias por su apoyo, espero ser un ejemplo para ustedes.

Ahyme María Ramírez Suárez

RESUMEN

El virus del mosaico del tomate (ToMV), tiene un alto impacto en la agricultura, afectando principalmente a cultivos de la familia Solanaceae. La sintomatología característica de este virus es la presencia de forma rizada y manchas amarillentas en forma de anillo en hojas, folíolos deformados y crecimiento reducido de la planta.

Hasta el momento no existe un método de detección en el país para esta virosis, por lo cual es importante el desarrollo y la implementación de este método para poder detectar el virus del mosaico del tomate y que permita a su vez un mejor control. El método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) permite una detección de forma preliminar y temprana mediante la amplificación del material genético del patógeno. Es por esta razón que el principal objetivo del proyecto fue desarrollar un método rápido de detección del virus del mosaico del tomate mediante RT-PCR. Para ello, se estandarizaron las condiciones de PCR como la concentración de $MgCl_2$, temperatura de hibridación y concentración de cebadores. De este modo, se utilizó un control positivo comercial, al cual se ajustaron las condiciones de PCR y los amplicones fueron validados mediante secuenciación. Como resultados, se obtuvo una concentración de $MgCl_2$ de 2 mM, temperatura de hibridación de 59 ° C y la concentración de cebadores de 0,1 μM como las óptimas para la reacción de RT-PCR. Se determinó, mediante el análisis de especificidad "*in silico*" que los cebadores empleados en el estudio presentaban un alto grado de especificidad, ya que fueron específicos para el virus del mosaico del tomate. Las condiciones estandarizadas de RT-PCR descritas en el presente estudio, proporcionan una metodología rentable, útil, precisa y conveniente para su aplicación en laboratorios de investigación para la detección rápida del virus del mosaico del tomate, permitiendo de esta manera un análisis de este virus en varios cultivos.

Palabras clave: virus del mosaico del tomate, control positivo, RT- PCR, detección, especificidad.

ABSTRACT

The *tomato mosaic virus* (ToMV) has a high impact on agriculture, mainly affecting crops of Solanaceae family. The characteristic symptomatology of this virus is the presence of curly shape and yellowish spots in the form of ring in leaves, deformed leaflets and reduced growth of the plant. Until now there is no detection method in the country for this virus, so it is important to develop and implement this method to detect *tomato mosaic virus* and that can be better controlled. The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method is a molecular tool that allows in a preliminary way and at an early stage the detection of the virus by amplifying the genetic material of the pathogen. The main objective of the project was to develop a rapid method of detection for *tomato mosaic virus* by RT-PCR. To carry out the objectives of this study, PCR conditions were standardized, such as MgCl₂ concentration, hybridization temperature and primer concentration. In this way, a commercial positive control was used, to which the PCR conditions were adjusted and the amplicons were validated by sequencing. As results, MgCl₂ concentration of 2 mM, hybridization temperature of 59 ° C and primer concentration of 0.1 μM were obtained as the most suitable for the RT-PCR reaction. It was determined, by “*in silico*” specificity analysis, that the primers used in the study had a high degree of specificity, since they were specific for *tomato mosaic virus*. The standardized RT-PCR conditions described in the present study, provide a cost-effective, useful, accurate and convenient methodology for its application in research laboratories for the rapid detection of *tomato mosaic virus*, thus allowing an analysis of this virus in several crops.

Key words: *tomato mosaic virus*, positive control, RT-PCR, detection, specificity.

INDICE

1	CAPITULO I. INTRODUCCION.....	1
1.1	Antecedentes.....	1
1.2	Planteamiento del problema.....	3
1.3	Objetivo General.....	4
1.4	Objetivos específicos.....	4
1.5	Justificación del trabajo.....	4
2	CAPITULO II. MARCO TEORICO.....	6
2.1	Virus.....	6
2.2	Virus del mosaico del tomate (<i>Tomato mosaic virus</i> , ToMV).....	7
2.2.1	Clasificación.....	8
2.2.2	Distribución.....	8
2.2.3	Epidemiología.....	10
2.2.4	Características moleculares del virus del mosaico del tomate (ToMV).....	12
2.2.5	Cepas del virus del mosaico del tomate (ToMV).....	12
2.3	Antecedentes sobre diagnóstico molecular.....	13
2.4	Técnicas para el diagnóstico molecular.....	14
2.4.1	Métodos basados en la amplificación de segmentos específicos del genoma del patógeno mediante PCR.....	15
2.4.1.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR).....	16
2.4.2	Diagnóstico por secuenciación.....	17
2.4.2.1	Secuenciación de primera generación.....	18
2.5	Detección y diagnóstico molecular en plantas.....	18
2.5.1	Enfermedades causadas por virus.....	19
3	CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS.....	24
3.1	Obtención del material de partida.....	24
3.1.1	Control Positivo.....	24
3.1.2	Muestras de campo.....	24

3.2	Extracción de ARN	25
3.3	Cuantificación de ARN	25
3.4	Síntesis de ADN complementario mediante Transcripción Inversa (RT).....	26
3.5	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
3.6	Confirmación de producto de PCR mediante secuenciación	27
3.7	Estandarización de la PCR.....	28
3.8	Electroforesis de los productos de PCR.....	29
3.9	Análisis de especificidad “ <i>in silico</i> ”	29
3.10	Diagrama de flujo.....	30
4	CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION	31
4.1	RT – PCR del control positivo con parámetros iniciales.....	31
4.2	Confirmación de producto de RT-PCR mediante secuenciación	31
4.3	Estandarización de la PCR.....	32
4.3.1	Gradiente de concentración de MgCl ₂	32
4.3.2	Temperatura de alineamiento	33
4.3.3	Concentración de cebadores	35
4.4	Análisis de especificidad “ <i>in silico</i> ”	37
4.5	Análisis de muestras de campo.....	38
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
5.1	Conclusiones	40
5.2	Recomendaciones.....	40
	REFERENCIAS.....	41
	ANEXOS.....	52

1 CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

En el Ecuador, la agricultura es una de las principales actividades que permite el desarrollo de la economía dentro del país. Al ser esta un eje fundamental en el ámbito económico y para la seguridad alimentaria, es importante mencionar aspectos relacionados con la producción y sostenibilidad, que han influenciado en la situación del sector agrícola del país (INIAP, 2008). Ecuador se encuentra dentro del grupo de naciones que tienen una alta capacidad de producción de alimentos, sobre la creciente demanda que existe por parte de su población. América del Norte, América Latina y Australia tienen en común esta condición, lo cual se vuelve crucial en un mundo que cada vez tiene mayor demanda de alimentos (MAGAP, 2016). La historia económica del Ecuador describe que la agricultura ha representado la mayor cantidad de divisas, en conjunto con los ingresos petroleros de los últimos 20 años (Polémika, 2009). Esto ha permitido que la población ecuatoriana acceda a productos de primera necesidad, así como también sustentar las importaciones de materias primas y bienes de capital para sostener el desarrollo económico del país (Polémika, 2009).

Desde el punto de vista fitosanitario, diversas plagas perjudican la productividad de los cultivos en cuanto a calidad y cantidad (INIAP, 2008). La presencia de epidemias virales en el país, ha ocasionado pérdidas hasta del 50% en algunos cultivos, detectándose virus como: el del mosaico de la alfalfa (AMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus del mosaico del tamarillo (TamMV), virus del bronceado del tomate (TSWV), virus del mosaico del tomate (ToMV), virus de la mancha anular del tomate (ToRSV), virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV), virus de la papa Y (PVY, Potyvirus) y virus del mosaico del tabaco (TMV), entre otros (Revista Lasallista de Investigación, 2012).

Uno de los géneros que provoca afecciones a especies de la familia Solanaceae con mayor incidencia es el *Tobamovirus*; el cual posee la característica de transmitirse en forma mecánica, provocando una alta ocurrencia en este tipo de

cultivos (Letters in Applied Microbiology, 2011). Además, debido a esta particularidad, los invernaderos se ven gravemente afectados, porque existe una alta densidad de plantación, lo que facilita su diseminación (Journal of Phytopathology, 2010). El virus del mosaico del tomate (ToMV) pertenece a la familia Virgaviridae, y al género *Tobamovirus*. Las partículas de virus contienen una molécula de una hebra de ARN de 6.384 kb (Public Library Science, 2012). El ToMV no se transmite mediante un vector, pero sí por contacto entre hospedantes, injerto, semilla y mencionado anteriormente por inoculación mecánica. ToMV se presenta en el mucílago externo, testa y endospermo, pero no en el embrión (Public Library Science, 2012). En cuanto a la sintomatología característica de este virus, también presenta áreas cloróticas, crecimiento reducido de la planta, bajo rendimiento de frutos, folíolos deformados, presentando forma rizada y manchas amarillentas en forma de anillo, incluso alteraciones necróticas externas e internas (Agronomía Colombiana, 2017).

El virus del mosaico de tomate fue descrito por primera vez hace 90 años en Europa y Estados Unidos. Por algunos años fue considerado como una cepa del virus del mosaico de tabaco, pero debido a la diferencia de hospederos, afinidades serológicas, proteínas y secuencias de ácido nucleico fue reconocido como un virus distinto. El virus del mosaico de tomate se encuentra entre los virus más importantes a nivel mundial. Debido a su resistencia posee la capacidad de sobrevivir en células externas de la planta y en tejidos muertos (Blancard, 2012, pp. 571-576).

Fue reportado por primera vez en el Ecuador en el año 2017, afectando principalmente al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) (Agronomía Colombiana, 2017). En estas plantaciones se han observado síntomas relacionados a este virus como son: mosaico, manchas necróticas y marrones, rizado de hojas, moteado y atrofia. El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) es una fruta tropical, originaria de Bolivia; pero también se encuentra en otros países sudamericanos como Colombia y Ecuador. El tomate de árbol es un cultivo económicamente importante en Ecuador, puesto que se ha convertido en una alternativa de producción para medianos y pequeños productores. Esta fruta tiene

gran demanda en los mercados locales e internacionales. El área sembrada de este cultivo ha aumentado sustancialmente en nuestro país con alrededor de 5.000 ha, ubicadas principalmente en las tierras altas de las provincias de Tungurahua, Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha, Carchi, Azuay y Napo (Acta Agronómica, 2016).

Debido al alto impacto que tiene este virus en la agricultura, existen varios métodos de detección que han sido aplicados para el análisis relacionado a esta virosis. Dentro de la aplicación de métodos de detección, se encuentran: sintomatológicos, microscópicos, serológicos y moleculares (Agronomía Colombiana, 2017). El método sintomatológico, se basa en la observación de las características morfológicas de la enfermedad (Sastry, 2013, pp. 233-253); por otra parte, el método microscópico, consiste en la observación morfológica de los viriones. Además, está la detección serológica, que detectan proteínas específicas del virus en una reacción colorimétrica (Virus Research, 2014) Finalmente, los moleculares, cuyo principio es detectar la presencia del ácido nucleico de los patógenos (The Journal of Investigative Dermatology, 2013).

1.2 Planteamiento del problema

Debido a la globalización del comercio que facilita la transferencia de diferentes virus de un país a otro, cada vez es más importante la detección de las enfermedades virales de forma precisa y temprana. A pesar de que se disponen de métodos de diagnóstico reportados a nivel global, en algunos casos podrían resultar altamente inespecíficos, debido a la dificultad que se presenta para determinar exactamente cuál es el agente causal (Research in Plant Disease, 2014).

Los síntomas de las enfermedades virales en algunas ocasiones son similares, y en otros casos se confunden con síntomas de estrés abiótico. Por ello el diagnóstico sintomatológico no es apropiado (Sastry, 2013, pp. 233-235). Técnicas como ELISA, a menudo ofrece diagnósticos erróneos, debido a que se dan falsos positivos porque existen reacciones no específicas. Además, presentan altos costos, requeridos en tecnología o equipamiento avanzado y toman tiempos

prolongados, pues se espera que la enfermedad se manifieste de forma visible (Research in Plant Disease, 2014).

Por la falta de un método de detección eficiente, no existe un adecuado control de los patógenos, adicionalmente se produce la infección y la propagación hacia los demás cultivos, impidiendo así cumplir los requisitos necesarios establecidos en la regulación de otros países (AGROCALIDAD, 2014). Sin embargo, al no existir estos métodos de detección en Ecuador, no se cumple con la normativa establecida, provocando pérdidas adicionales a la misma infección, por la imposibilidad de diagnosticar y tener un mayor control fitosanitario (Agronomía Colombiana, 2017), razón por la cual, AGROCALIDAD como institución encargada del diagnóstico y control de la sanidad vegetal, necesita contar con un método de detección efectivo para estas infecciones.

1.3 Objetivo General

Estandarizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa para la detección del virus del mosaico del tomate (ToMV).

1.4 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección del virus del mosaico del tomate.
- Determinar el grado de especificidad de la técnica desarrollada.

1.5 Justificación del trabajo

Las enfermedades en plantas son responsables de importantes pérdidas en la industria agrícola mundial; pero la detección temprana de patógenos es esencial para reducir la propagación y facilitar un manejo efectivo de estos (Phytopathology, 2011).

En la actualidad, los métodos basados en la serología proporcionan herramientas para el diagnóstico en plantas, sin embargo; a pesar de que han evolucionado, no

son herramientas confiables en etapas asintomáticas, en el caso de patógenos con difusión sistémica (Agronomy for Sustainable Development, 2015).

La sintomatología que presenta un cultivo es el mayor criterio para la identificación de patógenos, si se realiza por el método de detección sintomatológico, pero esto no debe ser basado únicamente en la observación, puesto que estos métodos son demasiado subjetivos, es decir que pueden existir errores por parte del operador; puede causar diferentes síntomas en diferentes hospederos, entre otras afecciones (Sastry, 2013, pp. 233-253).

Otro de los métodos, como la microscopía electrónica, provee información acerca de la morfología de las partículas virales, pero el problema que presenta esta técnica es que, si existen bajas concentraciones de virus en la planta, estas no se ven fácilmente. Además, no se puede realizar el procesamiento rápido de múltiples muestras por su costo y complejidad (Virology Journal, 2013).

Finalmente, las técnicas inmunológicas como ELISA, presenta varios problemas, limitando su uso como una prueba de aplicación universal para el diagnóstico de fitopatógenos, puesto que se necesitan antisuero de alta calidad que permitan la unión específica y sensible a los agentes virales. Estos antisueros requieren de alta calidad y experiencia en virología por parte del operador, para realizar purificación de viriones, siendo costoso e impredecible. Adicionalmente, demanda grandes cantidades de carga viral en la muestra para que se obtenga la captura del antígeno de interés (Virus Research, 2014).

Por todas estas razones, es indispensable el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten evaluar la enfermedad con mayor fiabilidad, precisión y calidad (Sastry, 2013, pp.233-253). En la actualidad, las herramientas moleculares basadas en la detección y amplificación del material genético del patógeno son los más efectivos y de mayor distribución hoy en día.

El desarrollo de métodos de detección se ha centrado en la obtención de ADN y ARN viral. Los métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la

Polimerasa (PCR) para la detección de virus, como en el caso de la detección del virus del dengue, fue publicado por primera vez en los años 90 (Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982), y actualmente es la técnica más importante, ofreciendo altos niveles de sensibilidad y especificidad. Esta, ofrece varias ventajas sobre los inmunoensayos, ya que posee la capacidad de detectar un solo objetivo o múltiples objetivos en mezclas complejas y permite revelar patógenos no cultivables como virus y algunas bacterias, además de que los costos son inferiores (The Journal of Investigative Dermatology, 2013).

Adicional a ello, con su alta sensibilidad permite detectar el agente infeccioso en estadios más tempranos, debido a la capacidad de detección de números mínimos de partículas virales, lo que no se puede conseguir con un diagnóstico sintomatológico, ya que éste se realiza cuando la enfermedad ya está avanzada; o a través de los métodos serológicos, que detectan la enfermedad cuando hay altas cantidades de proteína viral (Virus Research, 2014).

Aunque esta metodología ha sido ampliamente reportada a nivel mundial, no ha sido totalmente validada para la detección de este virus en nuestro país (AGROCALIDAD, 2015). El objetivo, al aplicar esta técnica molecular, es garantizar especificidad durante el diagnóstico, es decir el diagnóstico diferencial con baja probabilidad de resultados falsos. Así, el presente trabajo de investigación contribuye como herramienta en cuanto a la detección del virus ToMV, con el propósito de que AGROCALIDAD certifique los diferentes cultivos de plantas de exportación que se ven afectados por este virus, cumpliendo con las normativas fitosanitarias nacionales e internacionales (AGROCALIDAD, 2015).

2 CAPITULO II. MARCO TEORICO

2.1 Virus

Los virus son patógenos infecciosos de tamaño microscópico y no son activos fuera de sus hospederos. Las partículas virales están compuestas de dos partes principales: el genoma compuesto de ácido nucleico y una cubierta proteica. El material genético de la mayoría de los organismos consiste en ADN de doble cadena y solo una minoría de virus vegetales posee genomas de ADN de doble cadena y ADN de cadena simple; pero la mayoría de los virus vegetales están

constituidos de ARN de cadena simple (Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010).

Debido a que los virus vegetales son parásitos biotróficos obligados, su ciclo de vida comienza con la penetración del virión a la célula. Por si solos no pueden penetrar la cutícula y la pared celular de las plantas, se cree que el virión ingresa a través de heridas causadas por daño mecánico. Una vez en el citoplasma, la cubierta proteica del virión es removida en forma parcial o completa. La célula provee el aparato de transcripción para los virus de ADN y el aparato de traducción para los virus de ARN (Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010).

Los virus deben formar proteínas de replicación esenciales para la producción de ácidos nucleicos, proteínas estructurales que conforman la cubierta proteica, proteínas de movimiento que sirven de intermediarias en el transporte de los virus entre las células vegetales y otros componentes de los viriones. Las proteínas de replicación viral se combinan con las proteínas celulares para producir un complejo de proteínas que fabrican múltiples copias del genoma viral. El transporte de los genomas virales a las demás células se produce a través de pequeños canales llamados plasmodesmos. Para que toda la planta sea infectada, el virus debe ingresar al sistema vascular (Revista Lasallista de Investigación, 2012).

2.2 Virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV)

El virus del mosaico del tomate (ToMV), perteneciente a la familia Virgaviridae del género *Tobamovirus* fue reportado por primera vez en los años 90 en Estados Unidos y Europa (Blancard, 2012, pp. 571-576). Pertenece al grupo IV, cuyo material genético es ARN monocatenario positivo. ToMV posee partículas estables en forma de bastón que miden 18 x 300 nm (Figura 1), punto de precipitación isoeléctrico aproximado de pH 4.5, coeficiente de sedimentación de 195 S, densidad flotante de 1.325 g/cm³. Cada molécula de las partículas de virus contiene una sola molécula de ARN monocatenario de sentido positivo dentro de las subunidades de proteínas de la cubierta dispuestas helicoidalmente, cada una

de 17.5 kDa. El ARN en su extremo 5' tiene una secuencia no traducida de 70 nucleótidos (Hull, 2014, pp. 755-808).

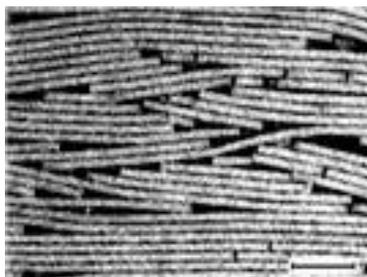


Figura 1. Partículas del virus del mosaico del tomate (ToMV)
Tomado de (CABI, 2018)

2.2.1 Clasificación

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del virus del mosaico del tomate (ToMV)

Dominio	Virus
Phylum	<i>Negarnaviricota</i>
Orden	<i>Tymovirales</i>
Familia	<i>Virgaviridae</i>
Género	<i>Tobamovirus</i>
Especie	<i>Tomato mosaic virus</i>

Tomado de (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2017)

2.2.2 Distribución

El virus tiene una distribución geográfica amplia, debido a su diseminación inadvertida del virus de las semillas contaminadas. Ha sido reportado en algunos países de América del Sur como Brasil, Chile, Ecuador y Perú (CABI, 2018).



Figura 2. Distribución geográfica del *virus del mosaico del tomate* (ToMV)
Tomado de (CABI, 2018)

El tomate es el huésped más importante de ToMV, aunque ocurre también en pimiento (*Capsicum annuum*) y pimiento tabasco (*Capsicum frutescens*) en Estados Unidos, Italia, Francia y España. También se ha reportado en papa (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Solanum viarum* (Blancard, 2012, pp. 571-576).

En la sintomatología provocada por el virus del mosaico de tomate (ToMV) sobre los diferentes cultivos, influyen factores como: temperatura, duración del día, intensidad de la luz, edad de la planta, tipo de cultivo, estaciones del año, entre otros (Indian Journal of Virology, 2010). En verano, tomates infectados desarrollan manchas color verde claro y oscuro, a veces, distorsión de hojas jóvenes (Figura 3). En invierno, con días cortos, en donde existe poca intensidad de luz y temperaturas bajas, las plantas se ven gravemente atrofiadas (Public Library Science, 2014). Muchos cultivares de pimiento (*Capsicum annuum*) son resistentes a ToMV, sin embargo, en algunos cultivos el virus puede causar necrosis, defoliación, e incluso en los brotes axilares (Figura 4), así también, suelen desarrollar síntomas visibles. ToMV causa moteado severo y distorsión de las hojas en tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Figura 5) (Indian Journal of Virology, 2010).

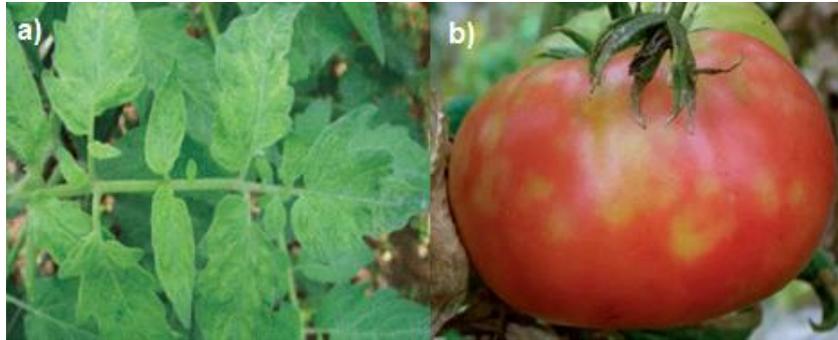


Figura 3. Síntomas de ToMV a) en hojas y b) en fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Tomado de (Indian Journal of Virology, 2010)



Figura 4. Síntomas de ToMV en hojas de pimiento (*Capsicum annuum*).

Tomado de (Journal of Molecular Evolution, 2010)



Figura 5. Síntomas de ToMV en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Tomado de (Indian Journal of Virology, 2010)

2.2.3 Epidemiología

El virus puede permanecer infectivo durante muchos meses en las muestras contaminadas de semillas recolectadas de plantas madres infectadas y transmitirse mecánicamente a las plántulas jóvenes, si se las maneja durante el

trasplante (Public Library Science, 2014). También puede ocurrir en el endospermo de semillas recolectadas de frutos que se fijaron después de que las plantas se infectaron sistémicamente; estas semillas suelen ser foco de infección y un medio por el cual el virus se disemina (Public Library Science Pathogens, 2012). Se necesitan pocas plantas infectadas para que el virus se propague rápidamente. La velocidad de la propagación dentro de los cultivos desde focos de infección primarios se puede atribuir en gran medida a la transmisión mecánica del virus por parte de insectos, mamíferos pequeños, aves, y lo más importante, por parte de trabajadores hortícolas con manos contaminadas, ropa y herramientas durante las operaciones hortícolas de rutina (Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010).

Se ha comprobado que cuando se produce una infección en un invernadero, el virus puede persistir durante muchos meses en estructuras de invernadero y en restos de plantas infectadas en el suelo, erradicándolas con gran dificultad (Molecular Plant-Microbe Interactions, 2010). Las plantas sanas que son plantadas en suelo contaminado pueden infectarse a través de heridas menores causadas por daños mecánicos a las raíces; como no existe un vector involucrado, esto ha sido designado como transmisión abiótica (Journal of Plant Physiology, 2012). El fluido de recirculación contaminado utilizado para cultivos que se desarrollan en sistemas hidropónicos, puede proporcionar un inóculo altamente infeccioso para las plantas, al infectarlas raíces dañadas mecánicamente (Journal of Plant Physiology, 2012).

Es poco probable que las malezas infectadas sean importantes como focos primarios de transmisión para los cultivos, pero ocasionalmente se han detectado virus en el agua utilizada para riego y en ríos asociados con la infección de algunas especies de plantas (European Journal of Plant Pathology, 2007).

ToMV es morfológicamente similar y tiene propiedades físico-químicas en común con otros *Tobamovirus*. Aunque el virus del mosaico del tabaco también puede ocurrir naturalmente en los cultivos de tomate y pimiento, ahora se puede

distinguir fácilmente de ToMV mediante procedimientos serológicos y moleculares (Journal of Molecular Evolution, 2010).

2.2.4 Características moleculares del virus del mosaico del tomate (ToMV)

El genoma de ToMV es de 6383 nucleótidos. Contiene cuatro marcos de lectura abiertos (ORF), acotados por las secuencias no codificantes (UTR) (Figura 6) (Afric Crop Science Journal, 2018).

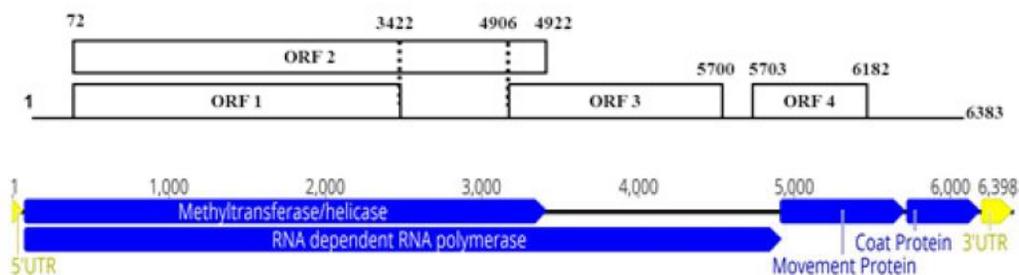


Figura 6. Mapa genético que muestra la composición del genoma de ToMV.

Tomado de Afric Crop Science Journal, 2018)

Cuando el virus del mosaico entra en una célula vegetal, su ARN es transcrito por la ARN polimerasa dependiente de ARN a múltiples ARNs de hebra negativa (Afric Crop Science Journal, 2018).

2.2.5 Cepas del virus del mosaico del tomate (ToMV)

En la siguiente tabla se describen las diferentes cepas del virus del mosaico del tomate con su número de acceso en NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Tabla 2.

Diferentes cepas de ToMV

Número de acceso	Nombre virus	Fuente	Hospedero
AF332868	Virus del mosaico del tomate Queensland	Australia	Tomate
GQ280794	Virus del mosaico del tomate cepa N5	China	Tomate
AJ132845	Virus del mosaico del tomate	China	Tomate
AJ417701	Virus del mosaico del tomate cepa Camellia	China	Tomate
AB083196	Virus del mosaico del tomate L11A-Fukushima	Japón	Tomate
DQ873692	Virus del mosaico del tomate cepa 1-2	Alemania	Tomate

FN985165	Virus del mosaico del tomate China	China	Tomate
----------	---------------------------------------	-------	--------

Tomado de (Afric Crop Science Journal, 2018)

2.3 Antecedentes sobre diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular existe a partir de los estudios en genética y biología molecular. En 1866, Mendel describió la herencia de rasgos biológicos, con lo que comenzaron las primeras observaciones en genética. Seguido, en 1919 por Morgan, quien observó que los caracteres estaban asociados a los cromosomas. Por su parte, Griffith en 1928 determinó que el ADN era material genético transmisible (Rifai *et al.* 2018, pp. 10-13).

Heshey y Chase en 1952, demostraron que la proteína no era el material genético sino el ADN. En cuanto a la biología molecular, en 1953, Watson y Crick describieron la estructura de ADN, lo que definió varias hipótesis que más tarde fueron comprobadas. En 1958, Meselson y Stahl demostraron que la replicación de ADN era semiconservativa y al mismo tiempo, Kornberg descubrió que la ADN polimerasa replicaba el ADN. En otros estudios se describieron los procesos de transcripción y traducción, seguido del aislamiento de la transcriptasa inversa, enzima que sintetiza ADN a partir de ARN, demostrando así que la información genética se puede transferir de manera bidireccional (Rifai *et al.* 2018, pp. 10-13).

Se habla de diagnóstico molecular desde los primeros días del apareamiento de la tecnología de ADN recombinante. La clonación y secuenciación del ADN complementario (ADNc) eran en ese momento herramientas importantes para proporcionar el conocimiento básico de la secuencia primaria de varios genes, y con ello, se desarrollaron sondas de ADN, permitiendo el análisis de regiones genómicas mediante *Southern Blot* y con ello, la aplicación del análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) (Patrinos, 2009, pp. 109-126).

Mullis en el año 1983, desarrolló una metodología para obtener un número ilimitado de copias de una secuencia de ADN específica. Buscaba analizar una

mutación de una enfermedad genética humana y, guiado por los estudios de Kleppe, 1971, en cuanto a la replicación con dos cebadores y el empleo de la enzima tipo polimerasa, consiguió la amplificación del segmento genómico de interés. Después de la validación de la técnica de PCR desarrollada por Mullis, acogida luego por Saiki, mismo que en 1985 aplicó esta técnica para descubrir la mutación en el gen de la hemoglobina causante de la anemia falciforme, arrojando resultados confiables y siendo así, viable para la aplicación en diagnóstico clínico (Green, 2013, pp. 455-470).

Es evidente entonces que, a lo largo de los años las nuevas tecnologías desarrolladas, se han aplicado a los sistemas biológicos para resolver problemas, inclusive en casos de patologías de plantas. Mediante la secuenciación de proteínas en 1960, se secuenció por primera vez la proteína de la cubierta del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Dickinson, 2004, pp. 125-130).

En efecto, la aparición de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos permitió determinar las secuencias de virus de ADN y ARN, como sucedió en el año 1980 se descubrió el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), virus de ADN de doble hebra circular. Se estableció la secuencia de nucleótidos completa de 8024 pb , y en 1982 del virus del mosaico del tomate (TMV), virus de ARN monocatenario de sentido positivo que infecta plantas como tabaco y de la familia Solanaceae. Se estableció la secuencia de nucleótidos completa de 6390 pb (Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982).

Como se mencionó anteriormente las técnicas de diagnóstico molecular tienen una amplia gama de aplicaciones. Sin embargo, deben tomarse en cuenta algunas consideraciones antes de seleccionar la técnica a ser empleada.

2.4 Técnicas para el diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular se define como el conjunto de técnicas de ámbito molecular, que permite detectar o diagnosticar patologías, en dependencia de la presencia o no de secuencias específicas en el ARN o ADN en una muestra sospechosa de padecer dicha patología. Son aplicadas en diferentes campos como: humano, animal y vegetal (Clinics in Laboratory Medicine, 2009).

Específicamente hablando del diagnóstico de patologías infecciosas, la composición genética de un microorganismo le confiere la capacidad de causar enfermedades. En algunos casos, su virulencia se basa en un solo gen. La biología molecular transformó el diagnóstico microbiológico desde la tecnología de hibridación de ADN hasta la reacción en cadena de la polimerasa (Rifai *et al.* 2018, pp. 50-78).

A continuación, se mencionan los métodos más empleados para la detección de patógenos virales.

2.4.1 Métodos basados en la amplificación de segmentos específicos del genoma del patógeno mediante PCR

El desarrollo de la PCR ha facilitado y revolucionado el diagnóstico molecular. La característica más sobresaliente es la gran cantidad de copias de la secuencia objetivo que se genera por su amplificación exponencial, permitiendo la identificación de una mutación o secuencia específica conocida, en un solo día en lugar de meses. La Reacción en Cadena de la Polimerasa se ha convertido en la tecnología dominante para el diagnóstico molecular. Es una técnica que ofrece alta sensibilidad, especificidad y aplicabilidad a una amplia gama de objetivos (Virus Research, 2016).

La técnica de PCR convencional se complementa con una electroforesis en gel, el propósito es visualizar, identificar y distinguir las moléculas, ya que permite separar los fragmentos en función de su tamaño y posteriormente visualizarlos mediante tinción para tener una estimación de su concentración (Green & Sambrook, 2013, pp. 455-470). Al ser una prueba cualitativa permite determinar la identidad o diferenciar las moléculas arrojando como resultado positivo la presencia de una banda específica o negativo la ausencia de una banda específica. Algunas de las técnicas de electroforesis son atractivas en laboratorios clínicos debido a su compatibilidad con la automatización y capacidad de alto rendimiento (Burtis, 2012, pp.4-18).

La aplicación de la PCR ha permitido que las pruebas diagnósticas sean empleadas en laboratorios hacia la detección de varias enfermedades. Cabe

recalcar que en las aplicaciones más importantes se encuentra la detección de patógenos virales, ya que reduce el uso de equipos costosos como el microscopio de barrido y el uso de las técnicas microbiológicas (Gherbawy, 2010, p 35). Es importante mencionar que, dependiendo del tipo de genoma vírico, si es ADN se emplea la técnica mencionada anteriormente, pero en el caso de que sea ARN se necesita utilizar una enzima distinta a la polimerasa que es la transcriptasa inversa (Virus Research, 2016).

2.4.1.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR)

La RT-PCR, consiste en retrotranscribir una hebra de ARN en ADN complementario (cDNA) utilizando una enzima llamada transcriptasa inversa. Posteriormente, el cDNA sintetizado se amplifica mediante PCR convencional (Brown, 2010, pp. 34- 50). La amplificación exponencial mediante PCR en transcripción inversa supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Los principales usos de esta técnica están relacionados con el campo del diagnóstico molecular, ya que puede utilizarse como método de detección molecular de genes, para estudiar el genoma de virus de ARN. Otro de sus usos se relaciona con la cuantificación de la expresión génica (European Journal of Plant Pathology, 2007).

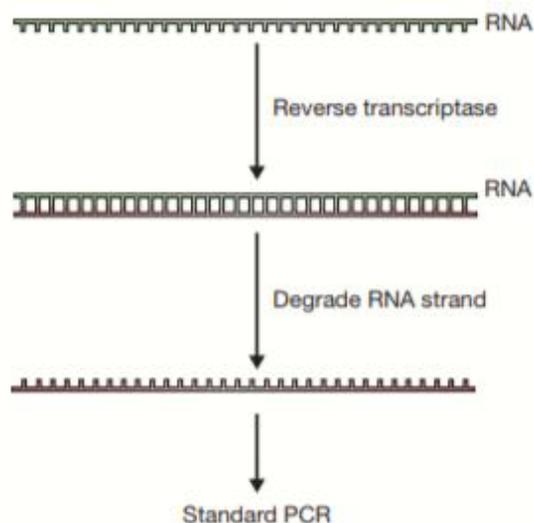


Figura 7. Representación del principio de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR).

Tomado de (European Journal of Plant Pathology, 2007)

2.4.2 Diagnóstico por secuenciación

En la década del 70, se describieron dos métodos de secuenciación, el método químico, desarrollado por Maxam y Gilbert en 1976. Este método utiliza la rotura química, el marcaje del extremo del radioisótopo y la electroforesis en gel para secuenciar el ADN; y el método enzimático desarrollado por Sanger en el que utiliza dNTPs radiomarcados y electroforesis en gel (Sabari *et al.* 2018, pp. 275-280).

En 1977, se dio a conocer la secuenciación de ADN, gracias al trabajo de Sanger llamado "Secuenciación de ADN con inhibidores de terminación de cadena". El método de Sanger era más eficiente y utilizaba menos sustancias químicas tóxicas. Además, dio paso a varios ensayos de secuenciación de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans* (Walker & Rapley, 2009, pp. 25-66).

La secuenciación de primera generación fue definida por las técnicas de Sanger y Maxam y Gilbert, siendo viable para la secuenciación de algunos miles de pares de bases al mismo tiempo. La secuenciación de primera generación tiene varias aplicaciones como en desórdenes genéticos, ya que es una técnica económicamente factible en el ámbito clínico. Ha permitido la identificación de mutaciones y alteraciones genéticas asociadas a diferentes enfermedades como diabetes mellitus neonatal, enfermedad de Parkinson, Síndrome de Miller, entre otras. También, en cuanto a enfermedades infecciosas como es el caso de virus de influenza, y la detección del virus de inmunodeficiencia humana VIH (El-Metwally, 2014, pp. 29-36). Sin embargo, con el avance de la ciencia, estos métodos se hicieron obsoletos. Con ese objetivo se vio la necesidad de desarrollar métodos más eficientes para la secuenciación de ácidos nucleicos. La secuenciación de última generación se desarrolló cubriendo esa necesidad, ya que se pueden realizar secuenciaciones masivas, generando grandes cantidades de datos en un menor tiempo. Esta incluye tecnologías tales como la *Illumina Solexa®* y *ABI SOLiD®*, otras técnicas secuencian moléculas individuales de ADN,

sin la necesidad de ser amplificadas mediante PCR, como la tecnología *Nanopore*® (Journal of Applied Microbiology, 2013)

2.4.2.1 Secuenciación de primera generación

- Secuenciación de Sanger

Esta técnica se basa en la síntesis de cadenas de ADN con una terminación específica (dideoxynucleótidos ddNTP) mediante la ADN polimerasa. Esta añade los dNTPs hasta que, de manera aleatoria, incorpora los ddNTP con marcadores radioactivos o fluorescentes. Los nucleótidos de parada carecen de 3'-OH, el cual permite que el nucleótido consecutivo sea adicionado, cuando es adicionado por la polimerasa, la síntesis de la nueva hebra es interrumpida obteniendo así fragmentos de diferentes tamaños (Walker & Rapley, 2009, pp. 25-66).

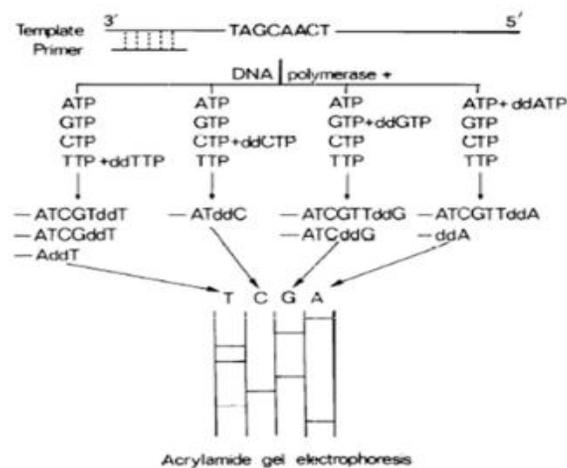


Figura 8. Esquema de la secuenciación de Sanger.

Tomado de (Phytopathologym 2011)

2.5 Detección y diagnóstico molecular en plantas

La importancia del diagnóstico molecular en el campo de la fitopatología, se centra en el diagnóstico de enfermedades de plantas. La aplicación de esta metodología a los diagnósticos moleculares es muy prometedora para la identificación temprana de patógenos de plantas importantes desde el punto de vista agrícola (Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2012).

La técnica más usada por los fitopatólogos para la detección es la PCR, apoyada por otras herramientas moleculares. A continuación, se describirán varias revisiones que han sido publicadas acerca de la aplicación de esta metodología que se relaciona con el diagnóstico y control de las enfermedades de las plantas.

2.5.1 Enfermedades causadas por virus

Los virus causan muchas enfermedades importantes en las plantas, y son responsables de enormes pérdidas en la producción y calidad de los cultivos en todas partes del mundo. Las plantas infectadas pueden mostrar una variedad de síntomas dependiendo de la enfermedad, pero a menudo presentan una coloración amarillenta en las hojas, distorsión de hojas, crecimiento atrofiado, así como anomalías en la formación de flores o frutos. La detección de virus mediante PCR es mucho más sensible en comparación con otras técnicas convencionales incluyendo la sintomatológica, microscópica y serológica. La importancia de aplicarla se debe a la especificidad, velocidad y versatilidad que posee, lo que permite que esta metodología sea la más apropiada y empleada en varias áreas de Biología Molecular, y ampliamente utilizada para la detección de enfermedades virales en los vegetales (Research in Plant Disease, 2014).

El virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (*Sugarcane Yellow Leaf Virus*, SCYLV) infecta a la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Figura 9) en todo el mundo y causa pérdidas significativas en el rendimiento. Las técnicas de detección actuales incluyen el inmunoensayo de transferencia de tejidos (TBIA), la RT-PCR y qRT-PCR. Si bien TBIA sigue siendo un método útil, para la selección rápida de un gran número de muestras, su sensibilidad es menor comparada con la de RT-PCR. En un estudio mediante la utilización de la RT-PCR se demostró que esta forma de detección es más sensible y fiable en comparación a otras técnicas convencionales, y puede ser empleada con resultados favorecedores para detectar este virus. Además, se ha demostrado que la caña de azúcar previamente analizada no está infectada con SCYLV, contiene el virus pero a un nivel demasiado bajo para ser detectado por TBIA (European Journal of Plant Pathology, 2010).



Figura 9. Sintomatología provocada por SCYLV en hojas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*): tres hojas con la nervadura central amarilla (izquierda), mientras que las tres hojas (derecha) no muestran síntomas. Tomado de (European Journal of Plant Pathology, 2010)

Se desarrolló un ensayo de RT-PCR anidada para la detección del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza Virus*, CTV) de muestras de cítricos infectados naturalmente (Figura 10). La RT-PCR anidada implica el uso de dos conjuntos de cebadores y dos reacciones de PCR sucesivas. Los amplicones resultantes de la primera reacción de PCR se utilizan como plantilla para un segundo conjunto de cebadores y una segunda etapa de amplificación. La sensibilidad y especificidad de la amplificación de ADN pueden mejorarse significativamente con esta técnica. El ensayo aplicado en este estudio es una herramienta de diagnóstico específica, sensible y confiable para CTV tanto en las plantas sintomáticas como las enfermas asintomáticas (Current Microbiology, 2011).

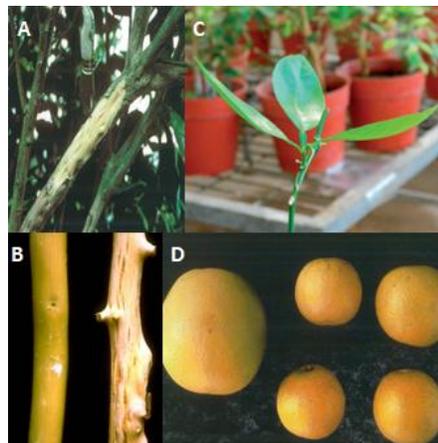


Figura 10. Síntomas provocados por CTV en muestras de cítricos infectados.

- a) Depresiones inducidas en una rama de pomelo (*Citrus x paradisi*)
- b) Plantas de lima (*Citrus x aurantiifolia*) sana (izquierda), necrosis de los vasos conductores y cavidades en las ramas (derecha)
- c) Acucharamiento de hojas en lima (*Citrus x aurantiifolia*)
- d) Fruto de un árbol de naranja (*Citrus x sinensis*) sano (izquierda), disminución del crecimiento en frutos de un árbol infectado (derecha).

Tomado de (Current Microbiology, 2011)

Se desarrolló una PCR multiplex para la detección simultánea del *virus del mosaico de la yuca africana* (*African cassava mosaic virus*, ACMV), el virus del mosaico de la yuca africana del Este de Camerún (*East African cassava mosaic Cameroon virus*, EACMCV), el virus del mosaico de la yuca africana del Este de Malawi (*East African cassava mosaic Malawi virus*, EACMMV) y el virus del mosaico de la yuca africana del Este de Zanzibar (*East African cassava mosaic Zanzibar virus*, EACMZV) que afectan a la yuca en el África subsahariana (Figura 11). La PCR mutliplex es una variante de la PCR en la que se amplifica más de una secuencia objetivo mediante más de un par de cebadores. La aplicación de PCR multiplex en el diagnóstico de agentes infecciosos, está dirigido especialmente a aquellos relacionados con los ácidos nucleicos virales. Usando las técnicas mencionadas, se ahorra tiempo y se reduce la cantidad de reactivos utilizados, lo que se traduce en un menor costo del diagnóstico. Esta herramienta puede ser aplicada por cultivadores de yuca en la detección de resistencia a enfermedades; científicos realizando estudios de diagnóstico de virus; personas encargadas de la parte fitosanitaria que verifican el movimiento de materiales de siembra enfermos y la certificación de semillas (Journal of Virological Methods, 2013).



Figura 11. Síntomas provocados por ACMV: aparición de mosaico en las hojas, clorosis y moteado típico en plantas de yuca (*Manihot esculenta*).

Tomado de (Plant Village, 2017)

Se realizó también una investigación, en la que se desarrolló un ensayo multiplex de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan para la detección y cuantificación simultáneas del virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV), el virus de la papa Y (*Potato virus Y*, PVY) y el virus del mosaico en bandas de la vena del tabaco (*Tobacco vein banding mosaic virus*, TVBMV) (Figura 12) (Dai *et al.* 2013).

A través de este estudio se demostró que, la reacción multiplex fue exitosa en la detección de estos tres patógenos, sin amplificación no específica y reacción cruzada. Este PCR multiplex en tiempo real proporciona un método rápido, efectivo, específico y sensible para la detección y cuantificación simultáneas de los tres patógenos en las plantas de tabaco infectadas. Por lo que, será útil no solo para los estudios de diagnóstico, ecológicos, epidemiológicos y de patogénesis, sino también para investigar las interacciones huésped / virus o virus / virus, en particular durante la infección mixta (Journal of Applied Microbiology, 2013).

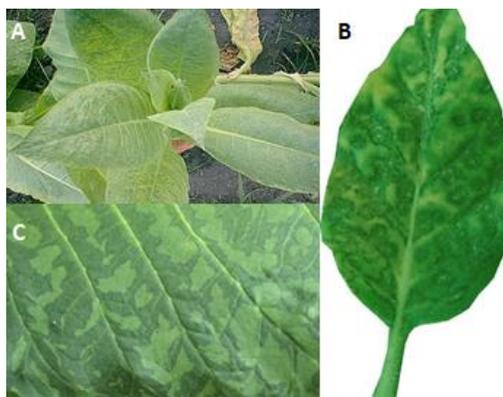


Figura 12. Síntomas provocados por tres *Potyvirus* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

a) TEV provoca empaldecimiento de las venas y moteado

b) PVY, estriado necrótico

c) TVBMV, bandas de tejido verde oscuro a lo largo de las venas.

Tomado de (INRA SCIENCE & IMPACT, 2018)

La expansión de la epidemia provocada por la enfermedad de la raya parda de la yuca (CBSD) (Figura 13) en el Este de África está causada por dos ipomovirus (género *Ipomovirus*; *Potyviridae*), que son el virus de la raya parda de la yuca (*Cassava brown streak virus*, CBSV) y el virus de la raya parda de la yuca de Uganda (*Ugandan cassava brown streak virus*, UCBSV), descritos recientemente. En un estudio se desarrolló una técnica de diagnóstico basado en RT-PCR para la detección simultánea y específica de los dos virus. El método para la detección de CBSV y UCBSV descrito, tiene aplicaciones importantes para la cuarentena de plantas, la reproducción por resistencia de yuca, los estudios sobre epidemiología, detección de hospedadores naturales de los dos virus y control de los mismos en el Este de África (Journal of Virological Methods, 2011).

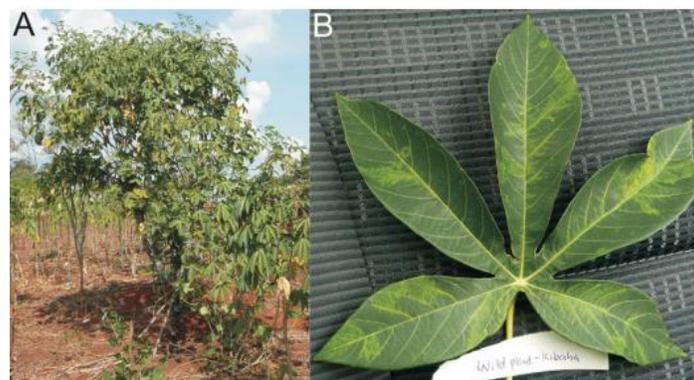


Figura 13. Síntomas provocados por CBSV y UCBSV en el árbol de yuca (*Manihot glaziovii*)

a) *M. glaziovii* crece al borde de un campo de yuca en Tanga, Tanzania, lesiones pardas o rayas en tallos verdes jóvenes

b) Hojas de *M. glaziovii* muestreado en la costa (Kibaha), Tanzania, secciones de las venas amarillentas, necrosis sobre la lámina de la hoja.

Tomado de (Journal of Virological Methods, 2011)

El virus *bunchy top* del banano (*banana bunchy top virus*, BBTV) es el agente causal de la enfermedad de cogollo racimoso del banano (Figura 14). Los métodos de diagnóstico actuales para BBTV son laboriosos y propensos a generar resultados falsos negativos. El análisis de PCR *TaqMan* descrito en un estudio demostró detección de forma rápida y precisa de BBTV en plataneras, pulgones

enteros y la hemolinfa del pulgón. La ventaja es que requiere solo de una muy pequeña cantidad inicial de muestra para el análisis, y la purificación del virus no es necesario. Comparado con PCR convencional y ELISA, este método es rápido, sensible y podría usarse en estudios sobre virus, replicación y otros parámetros de vectores de virus. También, se puede utilizar para el diagnóstico temprano y la predicción de BBTD (Journal of Virological Methods, 2013)

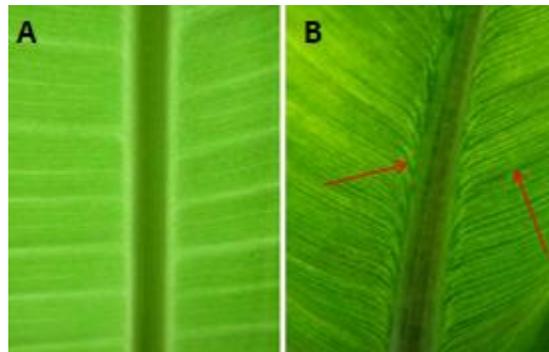


Figura 14. Síntomas provocados por BBTV en hojas de plátano (*Musa x paradisiaca*) a)Hojas sanas

b)Hoja infectada, rayas de color verde oscuro, puntos en las venas menores en la parte baja de la lámina foliar, lo que genera líneas en forma de gancho al llegar a la vena central.

Tomado de (Journal of Virological Methods, 2013)

3 CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Obtención del material de partida

3.1.1 Control Positivo

El control positivo consistió en tejido vegetal infectado por el virus del mosaico del tomate (ToMV), liofilizado y comercializado por Agdia (Agdia, Inc, Estados Unidos). La banda, producto de la amplificación de este control positivo fue validada mediante secuenciación.

3.1.2 Muestras de campo

Se recolectaron muestras con síntomas de infección de tomate de árbol, tomate riñón, naranjilla, uvilla, papa en la provincia de Pichincha y pimiento en la provincia de Santa Elena.

3.2 Extracción de ARN

A partir de los controles, se purificó el ARN mediante el reactivo PureLink™ Plant RNA de (Thermo Fisher Scientific, No. Cat: 12322-012). Se pesaron 15 mg del control positivo y se agregaron 0.5 mL del reactivo frío (4°C). Las muestras se agitaron en vórtex hasta que quedar completamente resuspendidas. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, para aclarar los lisatos, se centrifugaron las muestras a 12,000 × g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos libres de ARNasa. Después, se agregaron 0.1 mL de NaCl 5M a los extractos clarificados y se agitaron por inversión entre 3 y 5 veces. Se agregaron 0.3 mL de cloroformo a las muestras y se agitaron por inversión hasta formar una emulsión. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12,000 × g durante 10 minutos a 4 ° C para separar las fases y se transfirió la fase acuosa superior a tubos libres de ARNasa. A la fase acuosa se le agregó un volumen igual de alcohol isopropílico, se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12,000 × g durante 10 minutos a 4 ° C. Se desechó el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el *pellet*, y se agregó 1 mL de etanol al 75% a cada muestra. Se centrifugaron las muestras a 12,000 × g durante 1 minuto a temperatura ambiente, repitiendo el paso nuevamente en un segundo lavado. Se agregaron 150 µL de agua libre de ARNasa al sedimento de ARN, se mezcló por pipeteo hasta suspender el ARN. Finalmente, se almacenó el ARN extraído a –80 ° C hasta su posterior utilización.

3.3 Cuantificación de ARN

Se evaluó la calidad y cantidad del ARN extraído a partir de espectrofotometría. Para ello se utilizó el equipo Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Como blanco se utilizó 3 µL de agua libre de ARNasa. Se tomaron 2 µL del ARN extraído y se leyeron en el equipo.

3.4 Síntesis de ADN complementario mediante Transcripción Inversa (RT)

Para la obtención de ADN complementario se utilizó el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). La reacción constó de dos mezclas: En la primera (Mix 1, 15 μ l), se colocaron 8 μ l de H₂O DEPC, 1 μ l de *Random primers* (0,5 μ g/ μ l) (Thermo Scientific) en un tubo de 1.5 mL libre de ARNasas. Se dispensó a tubos de 0.2 mL y se añadieron 6 μ l del ARN extraído previamente. Se incubó en el termociclador durante 5 min a 70 ° C. La segunda reacción (Mix 2, 10 μ l) consistió en 1.5 μ l de H₂O, 5 μ l de Buffer RT, 1.5 μ l de dNTP's, 1 μ l de RNasin y se dejó incubar 2 min a 37 ° C. Posteriormente, a esta mezcla se agregó 1 μ l de la enzima MLV y se mezcló mediante pipeteo. Se colocó el Mix 2 en el Mix 1 y se sintetizó el ADN complementario con las siguientes condiciones: un ciclo de 5 minutos a 25 ° C, un ciclo de 60 minutos a 37 ° C, un ciclo de 10 minutos a 70 ° C y un ciclo a 12 ° C.

3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los parámetros iniciales empleados para la amplificación del control positivo, se encuentran detallados a continuación (Tabla 3 y 4).

Tabla 3.

Reactivos y concentraciones iniciales utilizados para la estandarización de la PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 Rx
H ₂ O	N/A	N/A	18 μ l
Buffer PCR	10X	1X	2.5 μ l
MgCl ₂	50mM	1.6mM	0.8 μ l
dNTP's	10mM	0.2mM	0.5 μ l
Primer F	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ l
Primer R	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ l
Enzima Taq Polimerasa	5U/ μ l	1.5U/ μ l	0.3 μ l
Volumen de reacción	-	-	23 μ l
cDNA	-	-	2 μ l
Volumen final		25 μl	

de reacción

Tomado de (Plant Disease, 2017)

Tabla 4.

Perfil térmico inicial utilizado para la obtención de productos de la PCR

N° de ciclos	Temperatura °C	Tiempo min:seg
1	94	03:00
35 veces	94	00:30
	52	00:30
	72	00:45
1	72	10:00
1	4	∞

Tomado de (Plant Disease, 2017)

Las reacciones en cadena de la polimerasa de *Tomato mosaic virus* (ToMV), se realizaron empleando cebadores descritos según bibliografía (Tabla 5).

Tabla 5.

Detalle de las secuencias empleadas para la detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) utilizadas en el presente estudio

Primer	Secuencia 5' – 3'	Genoma de referencia	Región	Ubicación	Tamaño producto
ToMV – F	AAGATGTCAAACCAACTTTA	NC_002692	ARN polimerasa dependiente de ARN	3640 - 4234	595 pb
ToMV – R	GAAACATCCAAGTACG				

Tomado de (Plant Disease, 2017).

Es importante mencionar que el fragmento de interés que se espera obtener es de 595 pb.

3.6 Confirmación de producto de PCR mediante secuenciación

Una vez realizada la amplificación del control positivo con las condiciones del apartado 3.5, se mandó a secuenciar (secuenciación Sanger) a Macrogen.

3.7 Estandarización de la PCR

Una vez confirmado el producto de PCR, se realizó la estandarización de la PCR donde se evaluaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y cebadores (Tabla 6), además, un gradiente de temperatura de alineamiento (Tabla 7).

Tabla 6.

Reactivos y concentraciones para determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ y cebadores

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
H ₂ O	-	-
Buffer PCR	10X	1X
MgCl ₂	50mM	1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3.5 mM
dNTP's	10mM	0.2mM
Primer F	10 μM	0.1μM, 0.4 μM y 0.8μM
Primer R	10 μM	0.1μM, 0.4 μM y 0.8μM
Taq polimerasa	5 U/μL	1U/μL
cDNA	-	-

Tabla 7.

Perfil térmico del Programa PCR para los cebadores específicos

Proceso	Temperaturas	Tiempo	Ciclos
Denaturalización inicial	95 ° C	2:00	1
Denaturalización	95 ° C	1:00	
Alineamiento	48.0 ° C, 49.0 ° C, 50.7 ° C, 53.4 ° C, 56.5 ° C, 59.0 ° C, 60.9 ° C, 62 ° C	1:00	35
Extensión	72 ° C	1:00	
Extensión Final	72 ° C	10:00	1

La amplificación definitiva, para cada una de las muestras, se realizó con las condiciones previamente estandarizadas.

3.8 Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de la amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% (p/v) con 2 µl de *SYBR Safe* (Thermo Scientific) por cada 100 mL de buffer TBE 1X y se corrió a 90V por 45 minutos.

3.9 Análisis de especificidad “*in silico*”

Para verificar la especificidad “*in silico*” de los cebadores, primero se obtuvieron las secuencias de virus relacionados a *solanáceas* en el programa BLAST y posteriormente se utilizó el programa MEGA para realizar el alineamiento de las secuencias.

3.9 Diagrama de flujo

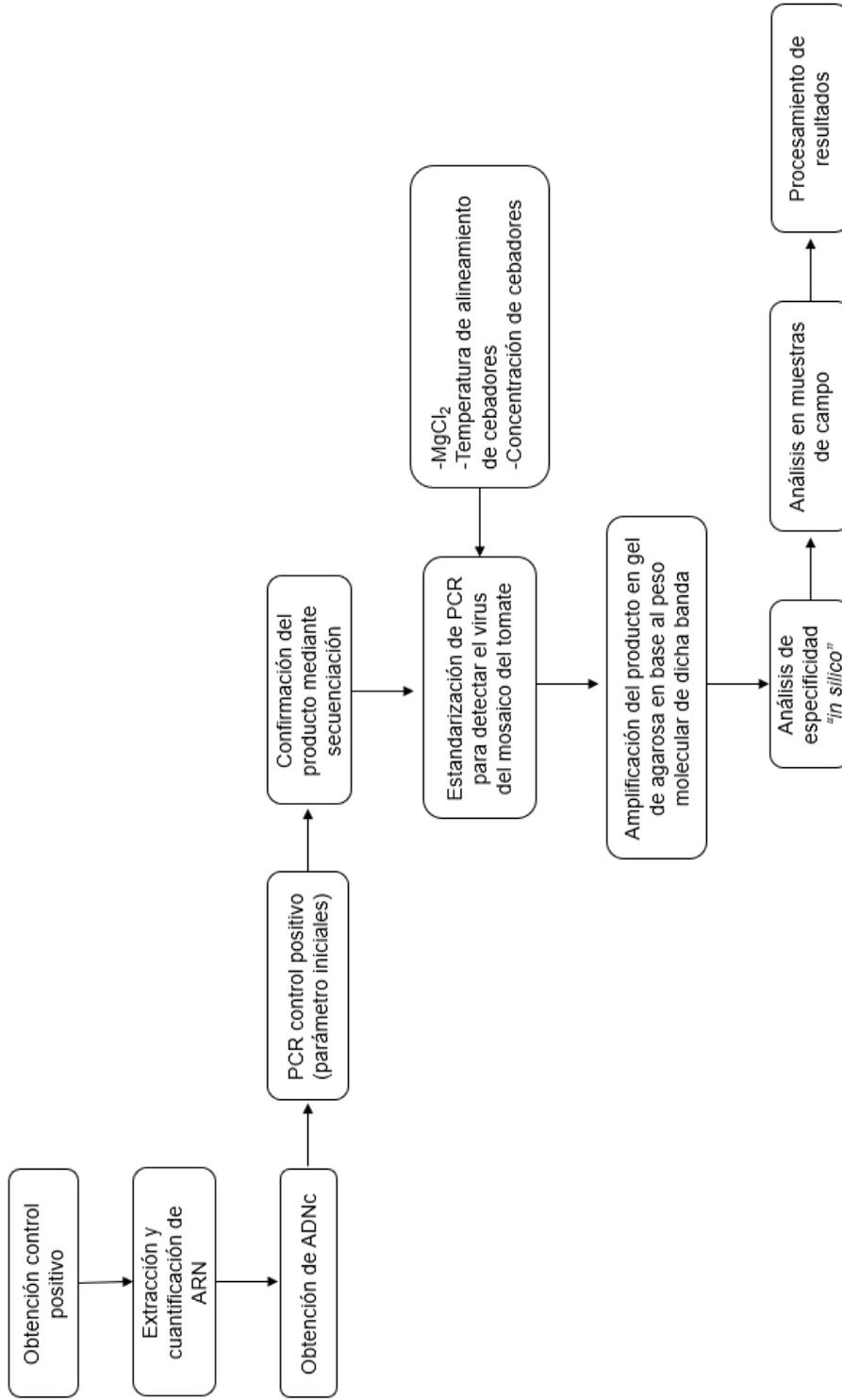


Figura 15. Diagrama de flujo sobre la metodología empleada para la detección del virus del mosaico del tomate.

4 CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RT – PCR del control positivo con parámetros iniciales

Se observó la amplificación del producto de interés (control positivo) correspondiente a 595 pb (Figura 16).

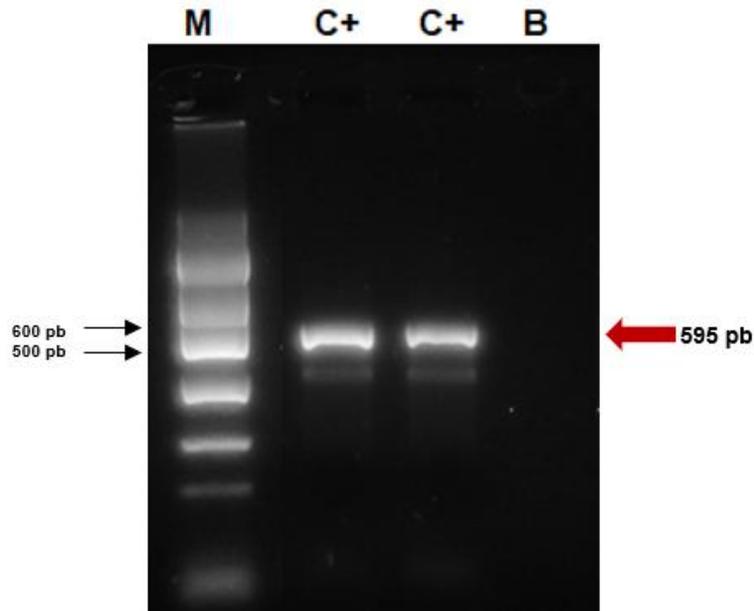


Figura 16. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética del control positivo con parámetro iniciales (Tabla 3 y 4)

- a) M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)
 b) C+: Control positivo. B: Blanco.

4.2 Confirmación de producto de RT-PCR mediante secuenciación

El fragmento de interés (Control positivo) fue secuenciado mediante la metodología Sanger. Una vez obtenida la secuencia, se la validó para obtener la secuencia consenso, la cual fue sometida a un análisis BLAST para confirmar que la secuencia de interés coincidía con las secuencias previamente reportadas para el virus del mosaico del tomate (Tabla 8)

Tabla 8.

Valores obtenidos mediante el análisis del blast

Description	Query Cover	E value	Ident	Accession
Tomato mosaic virus isolate Queensland, complete genome	100%	0.0	99%	AF332862.1
Tomato mosaic virus genes encoding RNA-dependent RNA polymerase, movement protein and coat protein	100%	0.0	99%	MF002485.1
Tomato mosaic virus strain To52 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	65%	0.0	100%	KJ160239.1

En el análisis, se confirmó que la secuencia pertenece al virus del mosaico del tomate (Anexo 1), con un 99% de identidad con el genoma completo, atribuible a pequeños errores de secuenciación o a la variabilidad natural del virus. Se reporta que la secuencia amplificada coincide con la sección de ARN polimerasa del virus con un 100% de identidad y un 65% cobertura total ya que la secuencia no abarca la sección completa de ARN polimerasa (Arinaitwe *et al.*2018).

4.3 Estandarización de la PCR

4.3.1 Gradiente de concentración de $MgCl_2$

La amplificación específica de los controles realizada con cada una de las diferentes concentraciones de $MgCl_2$, permitió determinar que las concentraciones óptimas eran de 2 mM y 2.5 mM (Figura 17), sin la presencia de productos inespecíficos comparados con las otras concentraciones (datos no mostrados).

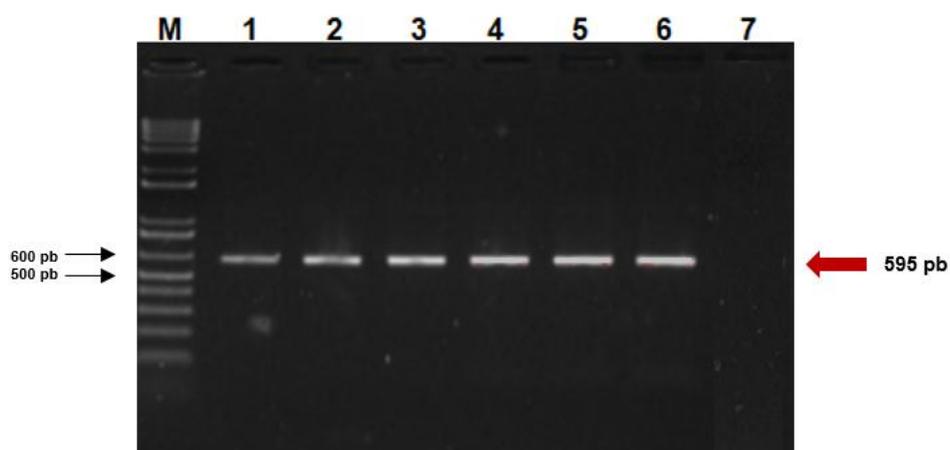


Figura 17. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética de las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ empleadas para los cebadores específicos

- a) M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)
- b) Carril 1: [MgCl₂] 1 mM
- c) Carril 2: [MgCl₂] 1.5 mM
- d) Carril 3: [MgCl₂] 2 mM
- e) Carril 4: [MgCl₂] 2.5 mM
- f) Carril 5: [MgCl₂] 3 mM
- g) Carril 6: [MgCl₂] 3.5 mM
- h) Carril 7: Control negativo.

Las concentraciones adecuadas de MgCl₂ oscilan entre 0.5 a 3.5 mM, influyendo así en la actividad de la ADN polimerasa, ya que los iones de Mg²⁺ se unen al sitio catalítico de la enzima interviniendo en la reacción (Chauhan, 2018), con lo cual una baja concentración de magnesio la ADN polimerasa puede inactivarse, mientras que a una alta concentración puede generar una amplificación con productos inespecíficos (Chen, 2010). Además, posibilita una unión adecuada del cebador a su secuencia complementaria. Otro de los factores que influyen en la cantidad de MgCl₂ que se emplea en la PCR es el contenido de GC, ya que la fuerza ejercida entre las dos hebras es más alta, por ello la separación de estas requieren de una mayor energía, es decir de una mayor concentración de MgCl₂ (Chauhan, 2018). De acuerdo a un estudio realizado por (Kumar *et al.*2010) para la detección de virus en bulbos de cebolla mediante RT-PCR, la concentración de MgCl₂ óptima fue de 3.5 mM ya que los cebadores empleados en el estudio tenían un alto contenido de GC, en cambio en nuestro estudio la concentración óptima de MgCl₂ fue de 2 mM y 2.5 mM. Debido al bajo contenido de GC en los cebadores empleados para la detección de ToMV, no se requieren altas cantidades de MgCl₂. Además, como ya se mencionó antes, no existió presencia de productos inespecíficos en estas dos concentraciones.

4.3.2 Temperatura de alineamiento

Al emplear diferentes temperaturas de alineamiento se observó que la mejor temperatura fue de 59 ° C con una concentración de 2 mM de MgCl₂ (Figura 18), en la cual se puede distinguir una banda sin presencia de productos inespecíficos comparados con las otras temperaturas (datos no mostrados).

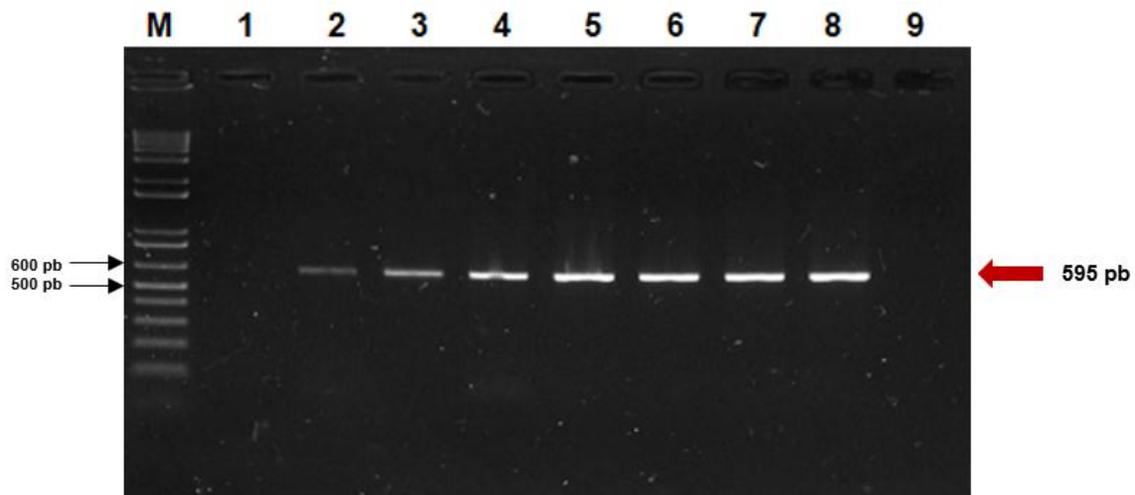


Figura 18. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética de las diferentes temperaturas de alineamiento empleadas para los cebadores específicos, con una concentración de $MgCl_2$ de 2 mM

- a) M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)
- b) Carril 1: 62.0°C
- c) Carril 2: 60.9°C
- d) Carril 3: 59.0°C
- e) Carril 4: 56.5°C
- f) Carril 5: 53.4°C
- g) Carril 6: 50.7°C
- h) Carril 7: 49.0°C
- i) Carril 8: 48.0°C
- j) Carril 9: Control negativo.

La importancia con relación a la temperatura de alineamiento se debe a que, en esta etapa de la PCR, los cebadores se adhieren a una ubicación específica en el ADN de una sola hebra mediante enlaces de hidrógeno (Majumder & Baranwal, 2014). Se debe tomar en cuenta que la temperatura de alineamiento debe ser la más adecuada para que los cebadores se unan a la hebra de ADN, pero no se recomienda temperaturas muy bajas ya que se puede dar la formación de dúplex no específicos y horquillas intramoleculares, reduciendo de esta manera la eficiencia de la reacción (Watpade *et al.*2013). Para evaluar los efectos de diferentes temperaturas de alineamiento en una RT-PCR se deben tomar en cuenta valores entre 54° a 62° C, como indica Crosslin & Hamlin, 2011. En este

caso, la temperatura de alineamiento óptima fue de 58°C para la detección de diferentes virus en papa con características de secuencia similar. En otro caso de estudio, para la detección simultánea de virus en papaya (Usharani *et al.*2013), se empleó una temperatura de 55°C, con lo cual se obtuvieron resultados deseados gracias a una buena amplificación de la banda, de la misma forma con las mismas características de secuencia.

Cabe recalcar que la temperatura de alineamiento es uno de los parámetros más importantes en una estandarización, ya que temperaturas demasiado bajas pueden provocar alineamientos inespecíficos con otras secuencias; y una temperatura demasiado alta puede ocasionar una reducción en el rendimiento de la reacción, por lo que no existiría amplificación (Ver carril 1 de figura 18) (Iqbal *et al.*2017). Con estos resultados, se puede inferir que el Mg^{2+} , conjuntamente con la temperatura de alineamiento tendría una influencia directa sobre la sensibilidad de la reacción, por lo que se sugiere la evaluación de ambos parámetros al mismo tiempo. Es así que, reacciones con temperaturas de alineamiento bajas, conjuntamente con concentraciones altas de Mg^{2+} , tienen mayores posibilidades de amplificación inespecífica. Por el contrario, concentraciones bajas de Mg^{2+} , conjuntamente con temperaturas de alineamiento elevadas, conducen a una menor eficiencia en la amplificación y reducción de la sensibilidad (Surzyki, 2000, pg. 412; Russo *et al.*2014). Este método, al ser de detección rápida de enfermedades, requiere altos niveles de especificidad y sensibilidad, por lo que se hace necesario, encontrar un punto intermedio entre temperaturas de alineamiento elevadas y concentraciones aceptables de Mg^{2+} . Adicionalmente, Hernández y colaboradores mencionan que la temperatura de alineamiento también depende del contenido de GC, ya que, gracias a la presencia de los 3 enlaces de hidrógeno de este par de bases, se permite una mejor estabilidad de las moléculas de ADN. Los cebadores de este estudio tienen 38.9% de GC, lo cual explicaría la relativamente alta concentración de Mg^{2+} que se utiliza en el ensayo estandarizado para mejorar la reacción.

4.3.3 Concentración de cebadores

En cuanto a las diferentes concentraciones de cebadores se observó una mejor amplificación con 0.1 μM (Figura 19), sin la presencia de productos inespecíficos comparados con las otras concentraciones (datos no mostrados).

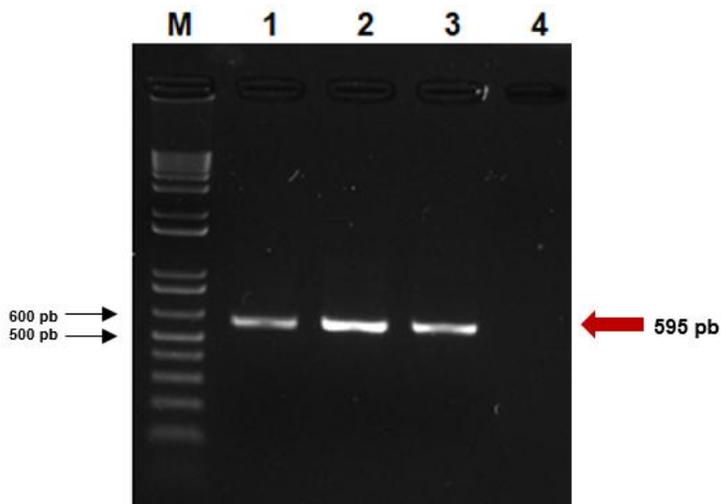


Figura 19. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética de las diferentes concentraciones de cebadores empleados para la PCR, con una concentración de MgCl_2 de 2 mM y una temperatura de alineamiento de 59°C

- a) M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)
- b) Carril 1: 0.1 μM
- c) Carril 2: 0.4 μM
- d) Carril 3: 0.8 μM
- e) Carril 4: Control negativo.

La concentración de cebadores es uno de los componentes más sensibles en el ensayo de PCR, además de tomar en cuenta su concentración en la reacción, el contenido de GC y número de nucleótidos es importante (Boonham *et al.* 2016). Cuando existe una concentración alta de cebadores puede ocasionar acumulación de productos inespecíficos, generando dímeros de cebador. Por otro lado, cuando existe una concentración baja de cebadores, no se llevaría a cabo la amplificación del fragmento esperado (Wilson, 2014). El diseño del primer debe contener una secuencia única dentro del ADN a ser amplificado, para evitar que la secuencia se una a lugares no deseados, mostrando más de una banda. Para que exista una adecuada unión de los cebadores a la cadena molde, la temperatura de alineamiento es importante. En comparación con el estudio acerca de la detección de virus presentes en ajo mediante RT-PCR (Kumar *et al.* 2010), se menciona que

la concentración de cebadores empleados fue de 0.2 μM , lo que permite que el producto amplificado tenga una alta intensidad y sin la presencia de productos inespecíficos, con las mismas características de secuencia.

Los parámetros estandarizados para la detección del virus del mosaico del tomate se detallan a continuación:

Tabla 9.

Condiciones estandarizadas de la PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
H ₂ O	-	-
Buffer PCR	10X	1X
MgCl ₂	50mM	2 mM
dNTP's	10mM	0.2mM
Primer F	10 μM	0.1μM
Primer R	10 μM	0.1μM
Taq polimerasa	5 U/ μl	1U/ μl
cDNA	-	-
Volumen final		25 μl

Tabla 10.

Perfil térmico del Programa PCR para los cebadores específicos

Proceso	Temperaturas ° C	Tiempo	Ciclos
Denaturalización inicial	95	2:00	1
Denaturalización	95	1:00	35
Alineamiento	59	1:00	
Extensión	72	1:00	
Extensión Final	72	10:00	1
Final	4	∞	1

4.4 Análisis de especificidad “*in silico*”

Al realizar la comparación con otros virus (Figura 20, zona resaltada perteneciente a los cebadores) se muestra que los cebadores empleados son específicos para el

virus del mosaico del tomate, ya que no coinciden en su totalidad con los pares de bases de las secuencias analizadas correspondientes a otros virus, específicamente en la zona perteneciente a los cebadores empleados en el presente estudio.

Tabla 11.

Nombre de los diferentes virus empleados para realizar el alineamiento *in silico*

Número	Nombre del virus
1	Tomato mosaic virus complete genoma
2	Tomato mottle mosaic virus isolate CpB1 complete genoma
3	Tomato brown rugose fruit virus isolate Tom1-Jo complete genome
4	Tobacco mosaic virus isolate Zhenfeng complete genoma



Figura 20. Alineamiento de los extremos 5' y 3' de las secuencias de virus que afectan a solanáceas donde se muestra la zona de los cebadores (zona resaltada perteneciente al cebador forward y cebador reverse).

4.5 Análisis de muestras de campo

Se realizó la RT-PCR de muestras de campo con los cebadores específicos, arrojando resultados negativos para todas las muestras empleadas de diferentes cultivos (Figura 21). Cabe mencionar que previamente a las muestras se les realizó un ensayo ELISA (datos no mostrados) y a pesar de que las muestras presentaban sintomatología característica del virus, los resultados fueron negativos. Mediante el análisis "*in silico*", se determinó que los cebadores tienen una alta especificidad, por lo que se puede deducir que las muestras que no amplificaron podrían estar relacionadas a otros virus.

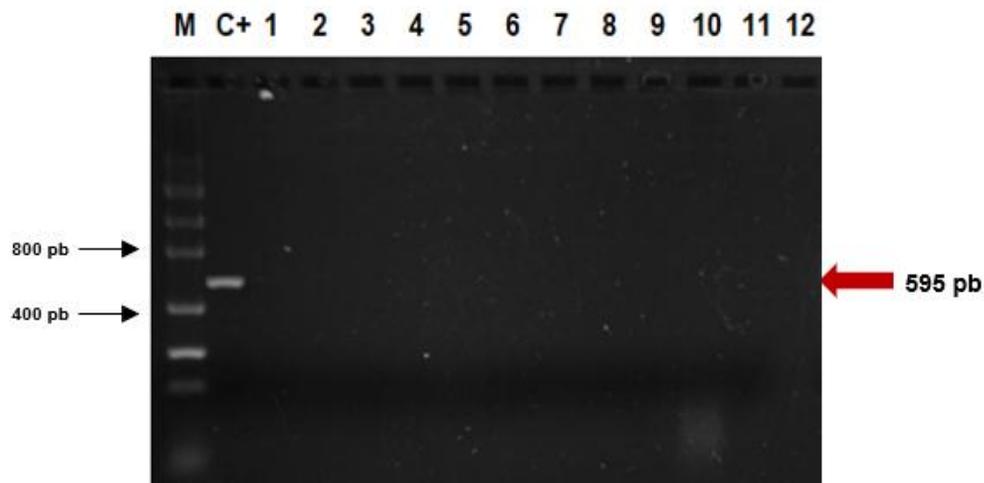


Figura 21. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética de las diferentes muestras con las condiciones previamente estandarizadas (Tabla 9 y 10)

- a) M: marcador de peso molecular (*Low DNA Mass Ladder*)
- b) C+: Control positivo
- c) Carril 1-2: tomate de árbol
- d) Carril 3-4: tomate riñón
- e) Carril 5-6: uvilla
- f) Carril 7-8: naranjilla
- g) Carril 9: papa
- h) Carril 10-11: pimiento
- i) Carril 12: Control negativo.

Finalmente, las condiciones estandarizadas de RT-PCR descritas en el presente estudio, proporcionan una metodología rentable, útil, precisa y conveniente para su aplicación en laboratorios de investigación para la detección rápida del virus del mosaico del tomate, permitiendo de esta manera un análisis de este virus en varios cultivos.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La técnica de secuenciación permitió corroborar que los amplicones obtenidos, efectivamente corresponden al virus del mosaico del tomate, presentando un 99% de identidad con las secuencias encontradas en la base de datos.

El método de detección para el virus del mosaico del tomate (ToMV) empleado en el estudio es efectivo y nos permite amplificar la región de ARN polimerasa del virus. Las condiciones estandarizadas en la técnica de PCR para la hibridación fueron: concentración de $MgCl_2$ 2 mM, temperatura de alineamiento 59°C y concentración de cebadores de 0,1 μM , las cuales resultaron adecuadas dentro de los rangos esperados para una PCR.

La especificidad de los cebadores es importante debido a que deben tener la capacidad de poseer una secuencia única dentro del ADN a ser amplificado. Se determinó que los cebadores empleados para la amplificación de la región de ARN polimerasa dependiente de ARN del virus del mosaico del tomate (ToMV), poseen una alta especificidad para la misma.

5.2 Recomendaciones

Plantear un método diagnóstico para el virus del mosaico del tomate (ToMV) con una prueba de sensibilidad.

A partir de los datos obtenidos, desarrollar un método de detección del virus del mosaico del tomate con RT-PCR en tiempo real.

Realizar estudios epidemiológicos a nivel molecular para determinar la prevalencia de este virus en plantas que se han afectadas por el virus del mosaico del tomate en el territorio ecuatoriano.

REFERENCIAS

- Acosta, A., & Serrano, A. (2009). Ecuador frente a la crisis económica internacional: un reto de múltiples aristas. *Polémika*, 1(1). Recuperado el 13 de octubre de 2018 de <http://revistas.usfq.edu.ec/index.php/polemika/article/view/306>
- Adkar-Purushothama, C. R., Maheshwar, P. K., Sano, T., & Janardhana, G. R. (2011). A Sensitive and Reliable RT-Nested PCR Assay for Detection of Citrus tristeza Virus from Naturally Infected Citrus Plants. *Current Microbiology*, 62(5), 1455-1459. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9883-7>
- AGROCALIDAD. (2015). Guía fitosanitaria de campo Ornamentales. Recuperado el 3 de noviembre de 2018 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2015/04/guia-de-campoORNAMENTALES.pdf>
- AGROCALIDAD. (2014) REQUISITOS FITOSANITARIOS Y DECLARACIONES ADICIONALES OFICIALES PARA PLANTAS Y PRODUCTOS VEGETALES. Recuperado el 5 de noviembre de 2018 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wpcontent/uploads/2014/11/Requisitos-Fitosanitarios-MATRIZ-21.11.2014.pdf>
- Aloyce, R. C., Tairo, F., Sseruwagi, P., Rey, M. E. C., & Ndunguru, J. (2013). A single-tube duplex and multiplex PCR for simultaneous detection of four cassava mosaic begomovirus species in cassava plants. *Journal of Virological Methods*, 189(1), 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.007>
- Andolfo, G., Ferriello, F., Tardella, L., Ferrarini, A., Sigillo, L., Frusciante, L., & Ercolano, M. R. (2014). Tomato Genome-Wide Transcriptional Responses

to Fusarium Wilt and Tomato Mosaic Virus. PLOS, 9(5).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094963>

Arinaitwe, W., Ochwo-Ssemakula, M., Mbewe, W. K., Sseruwagi, P., Kyamanywa, S., Erbaugh, M., & Qu, F. (2018). Molecular characteristics of tomato mosaic virus infecting tomato in Uganda. *African Crop Science Journal*, 26(3), 433-445–445. Recuperado el 4 de noviembre de <https://www.ajol.info/index.php/acsj/article/view/176814>

Blancard, D. (2012). *Tomato Diseases* (Segunda ed.). Londres: Academic Press.

Boben, J., Kramberger, P., Petrovič, N., Cankar, K., Peterka, M., Štrancar, A., & Ravnikar, M. (2007). Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 59-71. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9112-1>

Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>

Boonham, N., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2016). *Molecular Methods in Plant Disease Diagnostics - Principles and Protocols* (Tercera ed.). Boston: CABI.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2012). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Health Sciences. New York: CSHL PRESS

CABI. (2018). Centre for Agriculture and Bioscience. Recuperado el 20 de noviembre de 2018 de <https://www.ajol.info/index.php/acsj/article/view/176814>

Chauhan, T. (2018). Role of MgCl₂ in PCR reaction. Recuperado el 18 de octubre de 2018 de <http://geneticeeducation.co.in/role-of-mgcl2-in-pcr-reaction/>

- Chen, J. (2010). *Experimental Plant Virology* (Segunda ed.). Hangzhou: Zhejiang University Press - Springer.
- Chen, Y., & Hu, X. (2013). High-throughput detection of banana bunchy top virus in banana plants and aphids using real-time TaqMan® PCR. *Journal of Virological Methods*, 193(1), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.013>
- Chen, Y., Zhi Zhang, W., Liu, X., Hua Ma, Z., Li, B., Allen, C., & Hua Guo, J. (2010). A Real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in the horticultural soil and plant tissues. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20 (1), 193-201. <https://doi.org/10.4014/jmb.0906.06019>
- Crosslin, J. M., & Hamlin, L. L. (2011). Standardized RT-PCR Conditions for Detection and Identification of Eleven Viruses of Potato and Potato spindle tuber viroid. *American Journal of Potato Research*, 88(4), 333-338. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9198-z>
- Crosslin, J. M., Lin, H., & Munyaneza, J. E. (2011). Detection of 'Candidatus *Liberibacter Solanacearum*' in the Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) , by Conventional and Real-Time PCR. *Southwestern Entomologist*, 36(2), 125-135. <https://doi.org/10.3958/059.036.0202>
- Dai, J., Peng, H., Chen, W., Cheng, J., & Wu, Y. (2013). Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 502-508. <https://doi.org/10.1111/jam.12071>.
- Deng, J., Li, S., Hong, J., Ji, Y., & Zhou, Y. (2013). Investigation on subcellular localization of Rice stripe virus in its vector small brown planthopper by

electron microscopy. *Virology Journal*, 10(1), 310.

<https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-310>

Dickinson, M. (2004). *Molecular Plant Pathology* (Primera ed.). Londres, Nueva York: BIOS Scientific Publishers.

El-Metwally, S., Ouda, O. M., & Helmy, M. (2014). *Next Generation Sequencing Technologies and Challenges in Sequence Assembly* (Tercera ed.). Boston: Springer Science & Business.

Ephytia. (2018). INRA SCIENCE & IMPACT. Other parasitic tobacco virus . Recuperado el 23 de octubre de 2018 de <http://ephytia.inra.fr/en/C/10907/Tobacco-Tobacco-vein-banding-mosaic-virus-TVBMV>

Espinoza, D., Viera, W., Debut, A., Vásquez, W., Ayala, L. (2017). Virus diagnosis in tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) by RT-PCR and transmission electron microscopy in Pichincha and Tungurahua Provinces of Ecuador. *Agronomía Colombiana*, 35(1), 35-43. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n1.60960>

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Gherbawy, Y., & Voigt, K. (2010). *Molecular Identification of Fungi* (Segunda ed.). Michigan: Springer Science & Business Media.

Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J., & Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(19), 5818-5822. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.5818>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2013). *Molecular Cloning* (Cuarta ed). New York: CSH PRESS.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 539-548. <https://doi.org/10.1094/mpmi-23-5-0539>
- Hernandez Fernandez, J., Otálora, K. E. A., Beltrán-Torres, G., & Angélica Daza, L. (2013). Estandarización de la técnica de PCR para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas cabezona (*Caretta caretta*) y Carey (*Eretmochelys imbricata*) anidantes del Caribe colombiano. *Mutis* 2256-1498, 3, 21–30. <https://doi.org/10.21789/22561498.882>
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00–00. Recuperado el 4 de octubre de 2018 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (Quinta ed.). Londres: Academic Press.
- ICTV. (2017). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Virus Taxonomy*. Recuperado el 23 de octubre de 2018 de <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2008). Informe Nacional sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación. Quito- Ecuador. Recuperado el 1 de noviembre de 2018 de <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Ecuador.pdf>
- Iqbal, S., Shah, H., Ashfaq, M., & Khan, A. (12 de abril de 2017). Standardization of PCR protocol to check diversity among Pakistani isolates of cucumber

mosaic Cucumovirus (CMV) infecting chilli pepper. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 729-735. Recuperado el 3 de noviembre de 2018 de <http://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue3/PartK/5-2-238-697.pdf>

Ishibashi, K., Mawatari, N., Miyashita, S., Kishino, H., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2012). Coevolution and Hierarchical Interactions of Tomato mosaic virus and the Resistance Gene Tm-1. *PLoS Pathogens*, 8(10), e1002975. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002975>

Jaramillo Zapata, M. M., Álvarez, J. A., & Marín Montoya, M. (2012). Characteristics of the viruses related to virosis of tamarillo (*Solanum betaceum*) in Colombia. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 115-127. Recuperado el 15 de noviembre de 2018 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-44492012000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Jeong, J.-J., Ju, H., & Noh, J. (2014). A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease*, 20, 173-181. <https://doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>

Kiechle, F. L., & Holland, C. A. (2009). Point-of-Care Testing and Molecular Diagnostics: Miniaturization Required. *Clinics in Laboratory Medicine*, 29(3), 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.06.013>

Kumar, S., Baranwal, V. K., Joshi, S., Arya, M., & Majumder, S. (2010). Simultaneous Detection of Mixed Infection of Onion yellow dwarf virus and an Allexivirus in RT-PCR for Ensuring Virus Free Onion Bulbs. *Indian Journal of Virology*, 21(1), 64-68. <https://doi.org/10.1007/s13337-010-0008-x>

- Kumar, S., Shankar, A. C. U., Nayaka, S. C., Lund, O. S., & Prakash, H. S. (2011). Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 53(3), 359-363. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03117.x>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Rodrigo, I., Bellés, J. M. (2012). Metabolic fingerprinting of Tomato Mosaic Virus infected *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Physiology*, 169(16), 1586-1596. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.021>
- Madariaga, M. (2017). *Virología – Virus en frutales: Tristeza de los cítricos* (Tercera ed.). Chile: INIA La Platina.
- Majumder, S., & Baranwal, V. K. (2014). Simultaneous detection of four garlic viruses by multiplex reverse transcription PCR and their distribution in Indian garlic accessions. *Journal of Virological Methods*, 202, 34-38. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.019>
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Dandekar, A. M. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 1-25. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1>
- Matsushita, Y., Usugi, T., & Tsuda, S. (2010). Development of a multiplex RT-PCR detection and identification system for Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 128(2), 165-170. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9672-3>
- Mbanzibwa, D. R., Tian, Y. P., Tugume, A. K., Mukasa, S. B., Tairo, F., Kyamanywa, S., & Valkonen, J. P. T. (2011). Simultaneous virus-specific detection of the two cassava brown streak-associated viruses by RT-PCR

reveals wide distribution in East Africa, mixed infections, and infections in *Manihot glaziovii*. *Journal of Virological Methods*, 171(2), 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.024>

McRoberts, N., Hall, C., Madden, L. V., & Hughes, G. (2011). Perceptions of Disease Risk: From Social Construction of Subjective Judgments to Rational Decision Making. *Phytopathology*, 101(6), 654-665. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0126>

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). (2016). *La Política Agropecuaria Ecuatoriana*. Quito - Ecuador. Recuperado el 23 de octubre de 2018 de <http://servicios.agricultura.gob.ec/politicas/La%20Pol%C3%ADticas%20Agrop%20ecuaras%20al%20%202025%20I%20parte.pdf>

Mullis, K. B., Ferre, F., & Gibbs, R. A. (2012). *The Polymerase Chain Reaction (Segunda ed.)*. Michigan: Springer Science & Business Media.

Pagán, I., Firth, C., & Holmes, E. C. (2010). Phylogenetic Analysis Reveals Rapid Evolutionary Dynamics in the Plant RNA Virus Genus Tobamovirus. *Journal of Molecular Evolution*, 71(4), 298-307. <https://doi.org/10.1007/s00239-010-9385-4>

Patrinós, G. P., Patrinós, G., & Ansorge, W. (2009). *Molecular Diagnostics*. (Primera ed). New York: Academic Press.

PlantVillage. (2017). *PlantVillage. Crops: Cassava (manioc)*. Recuperado el 2 de octubre de 2018 de <https://plantvillage.psu.edu/topics/cassava-manioc/infos>

Rifai, N., Horvath, A. R., Wittwer, C. T., & Park, J. (2018). *Principles and Applications of Molecular Diagnostics (Primera ed.)*. Amsterdam: Elsevier.

- Russo, A., Menegazzi, P., & Tagliaferro, L. (2014). *Il laboratorio di biologia molecolare: consigli pratici* (Primera ed.). Italia:Biologi Italiani.
- Sabari, G., & Sharma, A. (2018). *Fundamentals of bioanalytical techniques and instrumentation* (Second ed.). Boston: Learning Pvt. Ltd.
- Sastry, K. S. (2013). *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics: Volume 1: Introduction of Plant Viruses and Sub-Viral Agents, Classification, Assessment of Loss, Transmission and Diagnosis* (Second ed.). Michigan:Springer Science & Business Media.
- Srinivasa, C., Sharanaiah, U., & Shivamallu, C. (2012). Molecular detection of plant pathogenic bacteria using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(3), 217-223. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr129>
- Soler, S., Prohens, J., López, C., Aramburu, J., Galipienso, L., & Nuez, F. (2010). Viruses Infecting Tomato in València, Spain: Occurrence, Distribution and Effect of Seed Origin: Viruses Infecting Tomato in Valencia, Spain. *Journal of Phytopathology*, 158(11-12), 797-805. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01706.x>
- Sui, X., Zheng, Y., Li, R., & Padmanabhan, C. (2017). Molecular and Biological Characterization of Tomato mottle mosaic virus and Development of RT-PCR Detection. *Plant Disease*, 101(5). <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1504-RE>
- Thermo Fisher Scientific. PureLink™ Plant RNA Reagent. Recuperado el 14 de noviembre de 2018 de <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS->

Assets/LSG/manuals/plantrna_man.pdf&title=PureLink%20Plant%20RNA%
20Reagent

Usharani, T., Laxmi, V., Jalali, S., & Krishnareddy, M. (Abril de 2013). Duplex PCR to detect both Papaya ring spot virus and Papaya leaf curl virus simultaneously from naturally infected papaya (*Carica papaya* L.). *Indian Journal of Biotechnology*, 5(7), 269-272. Recuperado el 24 de noviembre de 2018 de <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/19287/1/IJBT%2012%282%29%20269-272.pdf>

Viera Arroyo, W. F., Sotomayor Correa, A. V., Tamba Sandoval, M. V., Vásquez Castillo, W. A., Martínez, A., Viteri Díaz, P. F., & Ron, L. (2016). Estimación de parámetros de calidad del fruto para segregantes interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en respuesta de resistencia a la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds). *Acta Agronómica*, 65(3), 304-311. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n3.49771>

Walker, J. M., & Rapley, R. (2009). *Molecular Biology and Biotechnology* (Fourth ed.). Hatfield: Rpyal Society of Chemistry.

Watpade, S., Raigond, B., Pramanick, K. K., Sharma, N., Handa, A., & Sharma, U. (2013). Simultaneous detection of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Apple mosaic virus in crab apples and apple rootstocks by duplex RT-PCR. *Scientia Horticulturae*, 164, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.015>

Zhu, Y. J., Lim, S. T. S., Schenck, S., Arcinas, A., & Komor, E. (2010). RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian

sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 263-273. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9591-3>

ANEXOS

Anexo 1.

Secuencia consensada obtenida en el estudio del virus del mosaico del tomate (ToMV).

```
TACGTCCATTGGGACATGGCTGTCTAGATCTCCGAAGAAATCTTCGATCTGAGCTGGTGTCTTTCTCGTAAA
GAACAAGAATCTGCTTGAGTCAATACTGTCAAGTAATTGCCTTGTAAGCTCACTGAAAAGAGGACCAAATAT
TGCGTTGATTTTCTTTGAATGATACACAATCGTTTGCAACGCTGGATATTCTGTCTGAATTGACAGATCCAGT
TTCTGCTTCGTTGCGCTTTAATCATATGCCTGTACTGATCAACGGCTGGAAGATCCACAAAATCAAATCG
GCCAACTGACCAATTGTGACTTGTTCTTGCTTTGCTATCCACCTATTGAGAGACTCTCTACTAACAGTGAAA
AATTTTGTGGTTTTCTTTTTCTTAAGTAAATACTATCAAAAACTTATCTACCACTAAAGATGCAGTA
TTTTCAATATCAACTACTCCGGACAACCTCTGGTGAATTAATAATTTCTTTAATCATCGCAACTAGATTTTCAA
CAGTCCAGTCTGGCGAGGCATTTCTGCCGCCGTTCTGACCATCGGTATTAAGTTG
```

Anexo 2.

Secuencia de la base de datos de NCBI con 100 % de identidad con la secuencia consensada obtenida en el estudio del virus del mosaico del tomate (ToMV).

```
>KJ160239.1 Tomato mosaic virus strain To52 RNA-dependent RNA polymerase gene,
partial cds
ATCATTGGAGATTTAGGACGGGCAGGTAGTTACTTATTGGACATGTACAAAGTGGATG
CCGGTACTCAATAGCGATTACAGGTCGACTCTGTGTTTTAAAATTTCAATCTTTTTGTA
TCAGCTTCAAAGACTGGAGATATATCTGATATGCAATTTTACTATGATAAATGTCTTCC
AGGGAACAGCACGTTGTTGAACAACACTACGACGCTGTTACCATGAAATTGACTGACATT
TCTCTGAATGTCAAAGATTGCATATTAGATATGTCTAAGTCTGTAGCTGCTCCGAAAGA
TGTCAAACCAACTTTAATACCGATGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCTCGCCAGAC
TGGACTGTTGGAAAATCTAGTTGCGATGATTAAGAAATTTTAATTCACCAGAGTTGT
CCGGAGTAGTTGATATTGAAAATACTGCATCTTTAGTGGTAGATAAGTTTTTTGATAGT
TATTTACTTAAGGAAAAAAGAAAACCAAACAAAATTTTTCACTGTTTAGTAGAGAGTC
TCTCAATAGGTGGATAGCAAAGCAAGAACAAGTCACAATTGGTCAGTTGGCCGATTTT
GATTTTGTGGATCTTCCAGCCGTTGATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCGA
AGCAGAACTGGATCTGTCAATTCAGACAGG
```

Anexo 3.

Secuencia del genoma completo del virus del mosaico del tomate (ToMV).

```
>AF332868.1 Tomato mosaic virus isolate Queensland, complete genome
GTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTACATTTTACATT
CTACAATAAATGGCATAACACAAACAGCCACATCGTCCGCTTTGCTTGAGACCGTC
CGAGGTAACAATACCTTGGCAACGATCTTGCAAAGCGGCGTCTATATGACACAGCGG
```


AACTGGTTTCCCGTACCCTGCGCACTTTGCAAATTGGAGGTCGACGAAGTCGAAAC
AAGAAGA ACTACTCTTCGCTGTCCGGCTGATGTCACACACTTCCTAAATCAAAGGTAT
GAAGGACACGTAATGTGCACGTCTTCTGAAAAGAAATCAGTTTCCCAGGAAATGGTTA
GTGGGGCTGCGTCTATCAATCCTGTGTCCAAGCCGCTTAAAGGGAAAATTTTACTTT
CACACAGTCTGACAAGGAGGCCCTTCTCTCAAGGGGCTACGCAGATGTCCATACTGT
ACATGAGGTACAAGGTGAGACTTATGCAGACGTATCGTTAGTTGACTAACACCTACG
CCTGTATCTATCATCGCAAGAGACAGTCCGCATGTTCTGGTCTCGTTGTCAAGACACA
CAAAATCCCTAAAGTACTACACCGTTGTGATGGATCCTTTAGTTAGTATCATTAGAGAT
TTAGAACGGGTTAGTAGTACTTATTAGACATGTACAAAGTAGATGCAGGTA CTCAATA
GCAATTACAGGTCGACTCTGTGTTTAAAATTTCAATCTTTTTGTAGCAGCTCCAAAGA
CTGGAGATATATCTGATATGCAATTTTACTATGATAAGTGTCTTCCTGGGAACAGCAC
GTTGTTGAACA ACTACGACGCTGTTACCATGAAATTGACTGACATTTCTCTGAATGTCA
AAGATTGCATATTAGATATGTCTAAGTCTGTAGCTGCTCCGAAAGATGTCAAACCAAC
TTAATACCGATGGTACGAACGGCGGCAGAAATGCCTCGCCAGACTGGACTGTTGGA
AAATCTAGTTGCGATGATTA AAAAGAAATTTTAATTCACCAGAGTTGTCCGGAGTAGTTG
ATATTGAAAATACTGCATCTTTAGTGGTAGATAAGTTTTTTGATAGTTATTTACTTAAGG
AAAAAAGAAAACCAAACAAAATTTTTCACTGTTTAGTAGAGAGTCTCTCAATAGGTGG
ATAGCAAAGCAAGAACAAGTCACAATTGGTCAGTTGGCCGATTTTGATTTTGTGGATC
TTCCAGCCGTTGATCAGTACAGGCATATGATTAAGCGCAACCGAAGCAGAAACTGG
ATCTGTCAATTCAGACAGAATATCCAGCGTTGCAAACGATTGTGTATCATTCAAAGAAA
ATCAACGCAATATTTGGTCCTCTTTTCAGTGAGCTTACAAGGCAATTACTTGACAGTAT
TGACTCAAGCAGATTCTTGTCTTTACGAGAAAGACACCCGGCTCAGATCGAAGATTC
TTCGGAGATCTAGACAGTCATGTCCCAATGGACGTACTTGAGTTGGATGTTTCGAAGT
ATGATAAGTCTCAAACGAGTTTCATTGTGCTGTTGAGTACGAAATCTGGAGGAGACT
GGGTCTGGAGGATTTCTTGGCAGAAGTGTGGAAACAAGGGCATAGAAAACCACTCT
GAAAGATTACACTGCTGGTATAAAAACGTGTTTATGGTACCAGAGAAAGAGTGGTGAT
GTTACA ACTTTTATCGGTAATACCGTCATCATTGCTTCGTGTCTTGCATCAATGCTCCC
GATGGAAAATTGATAAAAAGGAGCCTTCTGCGGAGATGACAGTTTGTTGTACTTTCTCT
AAGGGTTGTGAGTATCCCGATATAACAAGCTGCCAATCTAATGTGGAATTTTGAGG
CCAACTGTTCAAGAAGCAATATGGGTACTTCTGCGGGAGGTACGTGATTCATCACG
ATAGAGGTTGCATAGTATACTACGACCCTTTGAAGCTGATTTCGAACTTGGTGCTAA
ACACATCAAGGATTGGGATCATTGGAGGAGTTCAGAAGATCCCTCTGTGATGTTGCT
GAGTCGTTGAACAATTGCGCGTATTACACACAATTGGACGACGCTGTTGGGGAGGTT
CATAAAACCGCCCCACCTGGTTCGTTTGTATAAGAGTTTAGTTAAGTATTTGTCAGA
TAAAGTTTTGTTTAGAAGTTTATTTCTTGATGGCTCTAGTTGTTAAAGGTAAGGTAATA
TTAATGAGTTTATCGATCTGTCAAAGTCTGAGAACTTCTCCCGTCGATGTTACGCC
TGTAAGAGTGTTATGGTTTCAAAGGTTGATAAGATTATGGTCCATGAAAATGAATCAT
TGTCTGAAGTAAATCTCTTAAAAGGTGTA AAACCTTATAGAAGGTGGGTATGTTTGCTTA
GTCGGTCTTGTGTGTCCGGTGAGTGGAAATTTACCAGATAATTGCCGTGGTGGTGTG
AGTGTCTGCATGTTGACAAGAGAATGGAAAGAGCGGACGAAGCCACACTGGGGTC
ATATTACACTGCTGCTGCTAAAAAGCGGTTTCAGTTTAAAGTGGTCCCAAATTACGGT
ATTACAACAAGGATGCAGAAAAGACATATGGCAGGTCTTAGTAAATATTA AAAATGT
AAAATGAGTGCGGGCTACTGCCCTTGTGATTAGAAATTTGTGTCTGTGTGATTGTTT
ATAAAAATAATATAAAATTGGGTTT GAGGGAGAAAGTAACGAGTGTGAACGATGGAGG
ACCCATGGA ACTTT CAGAAGAAGTTGTTGATGAGTTCATGGAGAATGTTCCAATGTCCG
GTTAGACTCGCAAAGTTT CGAACCAAATCCTCAAAAAGAGGTCCGAAAATAATAATA
ATTTAGGTAAGGGGCGTT CAGGCGGAAGGTCTAAACCAA AAAAGTTTTGATGAAGTTGA

AAAAGAGTTTGATAATTTGATTGAAGATGAAGCCGAGACGTCGGTCGCGGATTCTGAT
TCGTATTAATATGTCTTACTCAATCACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTGCATCTG
TATGGGCTGACCCTATAGAATTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCAGTTT
CAAACACAGCAAGCAAGAATACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCT
TTCCCTCAGAGCACCGTCAGATTTCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAGGTACAATG
CAGTTTTAGATCCTCTAATTACTGCGTTGCTGGGGGCTTTCGATACTAGGAATAGAAT
AATCGAAGTAGAAAACCAGCAGAGTCCGACAACAGCTGAAACGTTAGATGCTACCCG
CAGGGTAGACGACGCTACGGTTGCAATTCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAA
CTAGTAAGAGGTAAGTGGACTGTACAATCAGAATACTTTTGAAAGTATGTCTGGGTTGG
TCTGGACCTCTGCACCTGCATCTTAAATGCATAGGTGCTGAAATATAAATTTTGTGTTT
CTAAAACACACGTGGTACGTACGATAACGTACAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGA
AGGGTAGTGTCTTGGAGCGCGGGAGTAAACATATATGGTTCATATATGTCCGTAGG
CACGTAAAAAAGCGAGGGATTCTGAATTCCTCCCGGAACCTCCCGGTTGGGGCCCA