

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO
SÁNCHEZ CARRIÓN**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

Identificación molecular de virus ARN que afectan cultivares de tomate
(*Solanum lycopersicum*) en la costa del Perú

Presentado por:

Pedro Manuel Rodríguez Grados

Para optar el Título de Biólogo con mención en Biotecnología

Asesor:

Blgo. Luis Alberto Huayna Dueñas

Huacho – Perú

2023

Identificación molecular de virus ARN que afectan cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en la costa del Perú

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

8%

PUBLICACIONES

10%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | repositorio.unjfsc.edu.pe Fuente de Internet | 2% |
| 2 | repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 3 | Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru Trabajo del estudiante | 1% |
| 4 | bioseguridad.minam.gob.pe Fuente de Internet | 1% |
| 5 | Submitted to Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion Trabajo del estudiante | 1% |
| 6 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 1% |
| 7 | repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet | <1% |
| 8 | repositorio.inta.gob.ar Fuente de Internet | <1% |

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO
SÁNCHEZ CARRIÓN**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

Identificación molecular de virus ARN que afectan cultivares de tomate
(*Solanum lycopersicum*) en la costa del Perú

Miembros del Jurado Evaluador:

Dr. William Andrés Guzmán Sánchez

Presidente

Dr. José Luis Romero Bozzetta

Secretario

Dra. Medalit Nieves Salcedo Rodriguez

Vocal

Dedicatoria

A mi Familia, a la que quiero mucho, en especial a mi madre, por ser el mejor ejemplo de amor y por su apoyo absoluto en toda mi formación como profesional, a mi padre y hermana por su tolerancia y paciencia.

Agradecimiento

En la presente tesis de investigación me gustaría agradecer a mis maestros universitarios y a los grandes profesionales que logre conocer a lo largo de mi vida, de los cuales aprendí mucho, además me brindaron todo su apoyo, consejos y amistad en esta época de aprendizaje constante.

A mi gran amigo y asesor, el Blgo. Luis Alberto Huayna Dueñas por la gran enseñanza de sus cursos y como ser cada día mejor en mi profesión.

Al PhD. Carlos Arbizu por darme la oportunidad para la realización y ejecución de mi tesis en su prestigioso Laboratorio de Investigación del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) perteneciente al Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI).

Al PhD. Sergio Contreras Liza por brindarme todo su apoyo en las investigaciones.

A mis profesores de la Escuela Profesional de Biología con mención en Biotecnología y a la gran persona y amiga Ma. Blga. Carmen Rojas Z; por sus grandes enseñanzas en lo que fue mi formación como profesional.

A mis amigos de la universidad: Joseph, Sofía, Luis, Aníbal, Thalía, William, Marcos, Xiomara, Briguitt, Joselin, Yadira y Filemón los que me demostraron que la amistad no solo queda en las aulas.

A mis amigos y compañeros del INIA: PhD. Claudio Villegas, Blga. Carla Saldaña, PhD. Julio Chávez, Msc. Anita Corredor, Ivan Ucharima, Wilian Salazar, David Saravia, Lamberto Valqui, Esther, Sofía, Richard, Rose, Deyadira, Rosa, Manuel, Edson, Cristina, María Angélica, Erik, Paulo, Paula, Patricio, Rubén, Flavio, Jaide y Malú.

Índice

| | |
|---|------|
| Dedicatoria | I |
| Agradecimiento | II |
| Índice | III |
| Índice de tablas | VI |
| Índice de figuras | VII |
| Resumen | VIII |
| Abstract | IX |
| Introducción | 1 |
| Capítulo I. Planteamiento del problema | 2 |
| 1.1 Descripción de la realidad problemática | 2 |
| 1.2 Formulación del problema | 3 |
| 1.2.1 Problema general..... | 3 |
| 1.2.2 Problema específicos | 3 |
| 1.3 Objetivos de la investigación..... | 4 |
| 1.3.1 Objetivo general | 4 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 4 |
| 1.4 Justificación de la investigación..... | 4 |
| 1.5 Delimitación del estudio | 5 |
| Capítulo II. Marco teórico | 6 |
| 2.1 Antecedentes de la investigación | 6 |
| 2.1.1 Investigaciones internacionales..... | 6 |
| 2.1.2 Investigaciones nacionales | 9 |
| 2.2 Bases teóricas..... | 11 |
| 2.2.1 El tomate | 11 |
| 2.2.2 Origen y diversificación | 12 |
| 2.2.3 Taxonomía..... | 12 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 2.2.4 | Importancia del cultivo de tomate | 13 |
| 2.2.5 | Plagas que afectan tomate | 13 |
| 2.2.6 | Enfermedades que afectan tomate..... | 13 |
| 2.2.7 | Los virus como patógenos de plantas | 13 |
| 2.2.7.1 | Virus que afectan tomate | 14 |
| 2.2.7.2 | Transmisión de virus de plantas | 15 |
| 2.2.7.3 | Movilización de los virus en la planta..... | 19 |
| 2.2.8 | Síntomas Generales | 19 |
| 2.2.9 | Diagnóstico de virus | 21 |
| 2.2.9.1 | Métodos biológicos..... | 21 |
| 2.2.9.2 | Técnicas moleculares..... | 21 |
| 2.3. | Definición de términos básicos..... | 24 |
| 2.4 | Hipótesis de investigación | 25 |
| 2.4.1 | Hipótesis general | 25 |
| 2.4.2 | Hipótesis específicas | 25 |
| 2.4.3 | Operacionalización de las variables..... | 26 |
| Capítulo III. Metodología | | 27 |
| 3.1 | Diseño metodológico | 27 |
| 3.1.1 | Tipo de investigación..... | 27 |
| 3.1.2 | Nivel de investigación..... | 27 |
| 3.1.3 | Diseño de investigación | 27 |
| 3.1.4 | Enfoque de investigación | 27 |
| 3.2 | Población y muestra..... | 27 |
| 3.2.1 | Población | 27 |
| 3.2.2 | Muestra | 27 |
| 3.3 | Técnicas de recolección de datos | 28 |
| 3.3.1 | Recolección de material vegetal | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Extracción de ARN..... | 29 |
| 3.3.3 Síntesis de ADN complementario..... | 29 |
| 3.3.4 Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 29 |
| 3.3.5 Electroforesis | 31 |
| 3.3.6 Secuenciación Sanger | 31 |
| 3.3.7 Análisis Bioinformático | 31 |
| 3.4 Técnicas para el procesamiento de la información..... | 32 |
| Capítulo IV. Resultados | 33 |
| 4.1 Análisis de resultados | 33 |
| Capítulo V. Discusión..... | 38 |
| 5.1 Discusión de resultados | 38 |
| Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones | 39 |
| 6.1 Conclusiones | 39 |
| 6.2 Recomendaciones | 39 |
| Capítulo VII. Referencias | 40 |
| 7.1 Fuentes bibliográficas..... | 40 |
| 7.2 fuentes electrónicas | 47 |
| Anexos..... | 49 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. <i>Virus que afectan a plantas de tomate con su respectiva clasificación</i> | 15 |
| Tabla 2. <i>Variables, definición, dimensiones e indicadores</i> | 26 |
| Tabla 3. <i>Lista de cebadores para la identificación de virus en tomate</i> | 30 |
| Tabla 4. <i>Condiciones del termociclador para lograr amplificar las fracciones de los patógenos</i> | 31 |
| Tabla 5. <i>Resultados de la identificación molecular de los virus ARN muestreados en los campos de tomate en la costa del País</i> | 33 |
| Tabla 6. <i>Resultados del tipo de infección que se encontró de las 57 plantas analizadas</i> 34 | |
| Tabla 7. <i>Resultados con presencia y ausencia de virus de los campos muestreados de tomate</i> | 35 |
| Tabla 8. <i>Resultados obtenidos de las infecciones por virus analizados por las diferentes variedades de tomate</i> | 35 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1.</i> Es quema del diagrama de flujo del procedimiento analítico de la muestra vegetal | 28 |
| <i>Figura 2.</i> Ubicación de las zonas muestreadas de los campos de tomate | 33 |
| <i>Figura 3.</i> Elaboración de la filogenia con las secuencias de las muestras estudiadas con el virus reportado en el NCBI..... | 36 |
| <i>Figura 4.</i> Elaboración de la filogenia con las secuencias de las muestras estudiadas con el virus reportado en el NCBI..... | 37 |

Resumen

Objetivo: Identificar molecularmente los virus ARN que afectan a cultivares de tomate en la costa del Perú.

Materiales y métodos: Se recogieron hojas de plantaciones de tomate que presentaron sintomatología por infección viral, las hojas colectadas se les realizó una molienda con nitrógeno líquido para lograr extraer el ARN utilizando un kit comercial y se le realizó una digestión con la enzima DNAsa para tener una muestra pura de ARN sin rasgos de ADN. Se realizó para sintetizar el ADN complementario, luego de se empleó una PCR, determinando sus condiciones óptimas de amplificación, los resultados se observaron en una electroforesis en gel de agarosa, las muestras que fueron positivas para los patógenos por PCR, se enviaron a secuenciar al extranjero. Las muestras de los virus secuenciados se alinearon con otras secuencias de virus reportados, que se descargaron del GenBank y se realizó un análisis filogenético.

Resultados: Los resultados encontrados nos mostraron la incidencia de 2 virus en particular encontrados el *Peru Tomato Mosaic Virus* (PToMV) en 50% de las zonas muestreadas en la costa del Perú, así como el *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV) en un 83.3% de las zonas muestreadas y en un del 88.9% de todas las variedades analizadas. Además, los análisis genómicos obtuvieron un porcentaje superior al 95% de identidad de las muestras en estudio con las reportadas en el GenBank del NCBI.

Conclusiones: Se identificaron molecularmente dos virus ARN fitopatógenos que afectaron a cultivares de tomate en la costa del Perú y una alta similitud de los mismos con las cepas reportadas.

Palabras claves: PCR, cDNA, cebadores y virus ARN.

Abstract

Objective: Molecularly identify RNA viruses that affect tomato cultivars on the coast of Peru.

Materials and methods: Leaves from tomato plantations that presented symptoms of viral infection were collected, the collected leaves were ground with liquid nitrogen to extract the RNA using a commercial kit, and a digestion was performed with the DNase enzyme to obtain a pure sample of tomato RNA without DNA features. It was carried out to synthesize the complementary DNA, after a PCR was used, determining its optimal amplification conditions, the results were observed in an agarose gel electrophoresis, the samples that were positive for the pathogens by PCR, were sent to be sequenced at the foreign. The samples of the sequenced viruses were aligned with other reported virus sequences, which were downloaded from the GenBank and a phylogenetic analysis was performed.

Results: The results found showed us the incidence of 2 viruses in particular, the Peru Tomato Mosaic Virus (PToMV) found in 50% of the areas sampled on the coast of Peru, as well as the Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) in 83.3 % of the sampled areas and in 88.9% of all the varieties analyzed. In addition, the genomic analyzes obtained a percentage greater than 95% identity of the samples under study with those reported in the NCBI GenBank.

Conclusions: Two phytopathogenic RNA viruses that affected tomato cultivars on the coast of Peru were molecularly identified and their high similarity with the reported strains.

Keywords: PCR, cDNA, primers and RNA virus.

Introducción

Nuestro país se instala en el lugar 61 en la productividad de tomate internacionalmente, seguidamente de países como Brasil (puesto 9), Chile (puesto 21) y Colombia (puesto 30). (FAOSTAT, 2017; Hortoinfo, 2017). En el 2022 se registraron 3 800 hectáreas destinadas a estos cultivos en todo el Perú, lo que estableció una producción promedio de 198 434 toneladas (MIDAGRI, 2022).

En el Perú, se siembra esta hortaliza fundamentalmente en las zonas de Lima, Arequipa, Loreto, Áncash y La Libertad, en donde podemos encontrar las variedades comerciales tales como Katya, redondo, río grande, brigade, chef, entre otras diferentes variedades que predominan por su sabor agradable y excelentes características que son muy aprovechables a nivel gastronómico (MIDAGRI, 2022). Por lo tanto, la productividad de esta hortaliza se ve perjudicada por agentes como son plagas e infecciones; siendo los daños virales considerados como los más notables. (MINAM, 2020).

Actualmente existe una gran diversidad de variedades comerciales de tomate, con una buena resistencia al Tobamovirus, Geminivirus y Potyvirus, el surgimiento de nuevos virus puede afectar la totalidad de la producción, y por ende la economía de un territorio, como suele suceder con la disposición del virus del bronceado del tomate (TSWV). Con esta aparición para nuevos géneros de virus que puede provocar grandes daños por la falta de variedades que sean resistentes a los nuevos virus, así como la creación de medios eficaces de inspección (Luria et al. 2017).

El empleo de metodologías de biología molecular para la detección de los virus, permite una óptima detección y clasificación de los vectores intermediarios, para así, implantar específicamente a los causantes de los problemas fitopatológicos que dañan a los cultivos. Seguido de eso, se deben establecer las medidas de prevención para lograr manejar y disminuir el daño de estos agentes infecciosos en la economía de los productores agrícolas de las regiones (Sepúlveda, 2011).

Considerando que la productividad de tomate en el país estaría siendo dañado por virus del género Tobamovirus, Geminivirus y Potyvirus el cual es nombrado como un agente que afecta a la productividad, se considera importante identificar a nivel molecular los virus del género Tobamovirus, Geminivirus y Potyvirus que infectan plantaciones de tomate a partir de muestras recolectadas en la costa del Perú (Llaczka, 2019).

Capítulo I. Planteamiento del problema

1.1 Descripción de la realidad problemática

Se han descrito muy amplio número para diversos virus nuevos los cuales afectan a las plantas en la última década, debido a que una cierta cantidad de estos fitopatógenos albergan características genéticas nuevas lo que ha conllevado a proponer la elaboración de nuevos géneros y la modificación de la situación actual taxonómico de los virus (Maliogka *et al.* 2018). Las fitopatologías virales han sido atribuidas a los más importantes factores limitantes en términos de producción y condición de los frutos, habiéndose constatado que varios de estos virus pueden repercutir hasta en aproximadamente el 90% de los individuos de un campo de plantaciones lo cual puede llegar a ocasionar una pérdida en las cosechas de entre el 15 al 65%. (Requena *et al.* 2022).

Muchas de las afecciones virales contienen también una afectación en la propagación de la infección que es su propagación de tipo mecánica o también llamada por contacto, por medio de roturas comunes o por daños expuestos por donde el virus puede ingresar por seres vivos asociados como son los insectos, los hongos, los nematodos y también el ser humano. El control de estos vectores que transmiten estos virus por medio del empleo de trampas, productos químicos o controladores biológicos ayuda a la propagación de estos virus sea un poco menor o casi nula, y más si agregamos a este el uso de una variedad de plantas resistentes y la utilización de productos bioestimulantes para el cultivo. Todos estos elementos hacen posible que las infecciones virales logren ser una de las causas epidemiológicas más difíciles de manejar e identificar, los primeros pasos para lograr controlarlo es saber los síntomas que ocasionan los virus más comunes y frecuentes en los campos de cultivo para lograr estar vigilantes ante la posibilidad de aparición de nuevas virosis (Gergerich y Dolja, 2006).

En el país se han desarrollado diversas investigaciones de identificación y detección de virus en diferentes cultivares de gran estimación económica. Últimamente en diversos lugares zonas del Perú se han examinado tanto en tomate y papa como en otras plantaciones, daños por virus como son el mosaico, deformación de tejido las hojas y amarillamiento o clorosis; vista esta situación los estudios e investigaciones que se han realizado en son limitados (Álvarez-Quinto, 2017). El rigor de las enfermedades por virus fitopatógenos muy

posiblemente se deba al aumento del área cultivada por diversas condiciones que favorecen tanto para los vectores como para los virus (SEF, 2020).

En los departamentos del Perú, como son el caso de Lima, La Libertad y Junín, este tipo de daños por virus han sido determinados en diversas localidades por sintomatología en las plantas, teniendo así diversas sintomatologías como son la clorosis, distorsión y necrosis de las hojas, disminución del crecimiento provocando enanismo y sintomatología que provoca daño a las nuevas guías de las plantas que se orientan hacia arriba, lo que ha provocado que a la enfermedad se le atribuya una denominación de virosis. (Llacza, 2019). Sin embargo, este tipo de diagnóstico solo por sintomatología en la planta tiene muchos sesgos, ya que no nos da una exactitud en el diagnóstico para poder tratar a la planta o evitar su rápida propagación.

Los virus de las plantas son una limitación importante para la agricultura, ya que provocan una pérdida económica estimada superior a los 30000 millones de dólares al año. Además, causan devastadores brotes de enfermedades en las áreas de producción de tomate ya que pueden reducir el rendimiento del fruto entre un 15 y 55 %, dependiendo de las variedades de la planta (Zhang et al. 2022).

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Se pueden identificar molecularmente los virus ARN que afectan a cultivares de tomate en la costa del Perú?

1.2.2 Problema específicos

PE 1: ¿Se puede determinar la presencia del virus ARN en cultivares de tomate utilizando cebadores específicos?

PE 2: ¿Se logrará determinar la distribución de los virus ARN en cultivares de tomate?

PE 3: ¿Se conseguirá determinar la presencia de los virus ARN en variedades de cultivares de tomate?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Identificar molecularmente los virus ARN que afectan a cultivares de tomate en la costa del Perú.

1.3.2 Objetivos específicos

OE 1: Determinar la presencia del virus ARN en cultivares de tomate utilizando cebadores específicos.

OE 2: Lograr determinar la distribución de los virus ARN en cultivares de tomate

OE 3: Conseguir determinar la presencia de los virus ARN en variedades de cultivares de tomate.

1.4 Justificación de la investigación

El cultivo del tomate es una especie con un gran potencial económico en el país y en resto del mundo, además alberga una variedad de organismos y organismos microscópicos ligados a sus diversas fases fenológicas, las cuales influyen directamente en su producción, calidad y valor nutricional. Además, los geminivirus, que son virus transmitidos por vectores como la mosca blanca, los cuales se encuentran largamente repartidos en las zonas tropicales y subtropicales mundialmente, lo que provoca daños en la producción del tomate y en diversos cultivares, por lo que se han llevado a cabo trabajos fundamentales para diseñar variedades resistentes al virus en plantaciones de tomate. (MINAM, 2020).

Las principales zonas en donde se produce una mayor cantidad de tomate dentro del territorio peruano son los departamentos de la costa como son principalmente Lima, La Libertad, Ica, Arequipa y Lambayeque. En el 2022, la superficie nacional superó las 3800 Ha que produjeron 198,434 toneladas, cuya gran mayoría estuvo destinada para consumo interno (MIDAGRI,2022).

El trabajo sobre el diagnóstico de virus y la búsqueda de nuevos virus aún son escasos o casi nulos en el Perú, lo que provoca una escasa investigación en la forma de prevención. Los trabajos que evidencian la disponibilidad de diagnóstico molecular aumentan la rapidez para obtener información sobre las patologías que afectan a las plantas en este caso solanácea con virus de importancia económica, y los conocimientos que serán adquiridos en esta

investigación permitirán realizar pruebas que logren dar datos exactos de expuesto en teoría y reportar los datos de campo para lograr una rápida solución.

Actualmente en el Perú se desconoce los patógenos virales que afectan al cultivo de tomate, generando un problema potencial en la producción de esta hortaliza. Por otro lado, no existen protocolos reportados para realizar la evaluación de virosis en tomates mediante herramientas modernas de biología molecular (Llacza, 2019), por eso se plantea en esta investigación proporcionar nuevas herramientas para el diagnóstico molecular de virus.

1.5 Delimitación del estudio

La totalidad de la tesis de investigación se ejecutó en el Laboratorio de Investigación en Cambio Climático del INIA que está adscrito al MIDAGRI, por poseer una excelente infraestructura para el desarrollo de la investigación, de esta forma se aprovechó de manera óptima los reactivos y equipos de última generación empleados para la ejecución de la investigación, así como el soporte de profesionales que poseen grados académicos avanzados y con los conocimientos previos del tema ejecutado. Todo esto permitió concentrar la investigación en un área muy específica de investigación en el laboratorio, que se realizó en el transcurso de los meses de enero hasta diciembre del año 2022.

Capítulo II. Marco teórico

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Investigaciones internacionales

Gonzales (2021), estudió diversos aspectos del *Southern Tomato Virus* (STV). En primer lugar, usó la RT-LAMP y también utilizó la técnica de RT-qPCR para realizar una identificación determinada y óptima. Obtuvo datos en sus experimentos sobre el STV en calidad de infección sencilla no producía sintomatología en las plantas. Las observaciones por medio del microscopio óptico y el microscopio electrónico no pudieron lograr revelar la existencia de porciones de material viral, ni alteraciones a en las células comprometidas a estas infecciones. Sin embargo, los exámenes de las partes de siRNAs reveló que el STV fue competente para alterar la manifestación de varios miRNAs importantes con diversas obligaciones. En la parte final de esta investigación estudiaron el daño que podría tener el STV en afecciones variadas con diversos tipos de virus más dañinos comunes como el CMV y el PepMV. Además, tuvieron datos en sus experimentos de interacciones desconocidas por los virus que tienen alteraciones en la seriedad de daños, los valores de aglutinamiento de los virus y de las variedades de miRNAs y vsiRNAs. En el conjunto de plantaciones infectadas por CMV y por PepMV lograron el aprecio de un resultado infectivo que logro que se disminuya las cantidades del CMV, alterando la sintomatología de las plantaciones con relación a los daños sensibles provocados. El STV fue apto para quebrar este tipo de resultado de antagonismo restableciendo la concentración del CMV y alterando de nuevo todas las señales.

Gonzales (2020), detectó al ToBRFV mediante la técnica de RT-PCR uso primers específicos; además caracterizó la expresión de la sintomatología asociada a los daños por ToBRFV en las zonas de las hojas y los frutos en tres diferentes plantaciones; midió el daño en la producción y examino la disposición espacio-temporal del virus en viveros distribuidos para el comercio de tomate var. TOP-2299. Consecuencia de su análisis revelaron que de las variedades de tomate TOP-2299 y Santa West tuvieron daños en el área foliar como mosaicos que son específicos a los daños causados de Tobamovirus en plantaciones comerciales de los tomates. Además, en los frutos, solamente la variedad TOP-2299 tuvo señales de daños por rugosidad, deformaciones, hendiduras y manchas marrones. La identificación lo efectuó óptimamente por el método de RT-PCR. En producción, obtuvo una disminución del 25 al 40% en el peso promedio de los tomates analizados de la var.

TOP-2299. Los análisis de la infección expresaron que las muestras Log-logístico y Logístico son las cuales preferiblemente revelaron sobre el avance de esta infección en casi todo el periodo de análisis. Los exámenes aéreos demostraron que esta infección tuvo un rango leve compuesto al principio de la enfermedad, grandemente compuesto en su periodo máximo, y constante en los periodos de mínima y constante. Esta investigación puso en evidencia lo importante de la identificación de la sintomatología, su conexión con el impacto en la productividad y el conocimiento del examen de las dinámicas aéreas y provisional del virus por carácter comercial para ejecutar programas afiliados de empleo que conlleven a aminorar el daño de esta infección.

Castillo (2019), identificó los virus TMV y ToMV que causan daños a los cultivos de tomate, también por los virus SPCSV, SPFMV y SPVC en las plantaciones estudiadas de camotes, por medio del método de PCR e implementó una metodología para la identificación para ser usado en el diagnóstico de daños por virus. Colectaron 20 muestras; en donde 10 fueron procedentes de las plantas de tomate y de las demás 10 eran procedentes de plantas de camote. Logró determinar la prevalencia de TMV y ToMV en plantas de tomate utilizando primers determinados. En las plantaciones de camotes se encontró con la presencia de SPCSV, SPFMV por medio del uso de primers determinados. Se encontró en siete plantas de tomate al TMV y en tres diversas plantas al virus ToMV; en muestras analizadas de camote las cuales se encontraron con ocho plantas confirmativas para la cepa SPFMV y se encontró en dos de las plantas la existencia de la cepa del virus SPCSV utilizando el método fijado.

Torre (2019), describió un análisis epidemiológico respecto a brotes epidémicos agresivos atribuibles al virus *Tomato Yellow Leaf Curl Disease* (TYLCD) en plantaciones de tomate resistentes a TYLCV, realizado en Murcia y en Almería. Utilizaron métodos de secuenciación masiva, clonaje y secuenciación de tipo Sanger, en donde encontraron un total de 28 secuencias de TYLCV. Los análisis filogenéticos llevados a cabo encontraron que todas las secuencias conseguidas pertenecen a cepas aisladas de TYLCV de la cepa Israeli. Un primer análisis realizado con las secuencias demostró la presencia de dos tipos de aislados, uno relacionado con cepas aisladas con la cepa Israeli antigua en el lugar y otro de reciente aparición, emparentado con aislados mutados con cepas marroquíes, nombrados TYLCV-IS76. Un clon de esta infección proporcionado a partir de una de las secuencias de este segundo grupo fue usado en una prueba de eficiencia biológica hacia TYLCV-IS76, en el cual se apreció que en infección compuesta prevaleció el IS76, mientras que en infección

simple del aislado de Murcia supero al recombinante. En la segunda parte de la investigación, describió la técnica de RT-qPCR combinada con sondas TaqMan para la identificación de tres virus de cucurbitáceas transmitidos por semillas y su parecido con la técnica de ELISA. Con este protocolo se pudo identificar a los tres virus con una gran susceptibilidad y particularidad, teniendo la posibilidad a para la realización de análisis múltiples. La semejanza con la técnica ELISA, efectuada solamente con semillas infectadas, mostró una sensibilidad superior, demostrando así su capacidad para el empleo del examen en semillas.

Betancourt (2017), evaluó la facultad de contaminar plantaciones de tomate y tabaco con los Begomovirus identificados de malezas encontradas en el Valle de Colombia y estableció la posibilidad naciente de éstos virus para proporcionar infección en plantaciones de la familia de las solanáceas. En donde realizaron una extracción de ADN de las malezas, detectaron por el método de PCR la prevalencia de diversos los Begomovirus y emplearon la metodología de RCA para lograr incrementar el material de los patógenos. Además, el ADN de los Begomovirus aumentado logro ser aplicado en plantaciones de tomate y en plantas de tabaco por medio del método de biobalística, donde las plantaciones de tomate lograron ser sembradas en macetas colocadas en un vivero con dos de los ensayos independientes y diez repeticiones de plantaciones individualmente por una diversidad de patógenos virales analizados. Las plantaciones de tabaco lograron ser sembradas de forma in vitro utilizando el medio MS con un ensayo con seis repeticiones de plantaciones para cada uno de los virus. Como muestra en blanco se analizaron plantaciones de tomate y de tabaco que estuvieron sin aplicar inóculo. Se analizaron la sintomatología de forma visual. La replicas y despliegue de los patógenos se llevó por PCR en ejemplares de hojas jóvenes con daños. Los resultados señalan la existencia de los Begomovirus en la mayor cantidad de plantaciones de tomate infectados con las cepas de los virus de las malezas tales como *Hybanthus attenuatus* y *Verbena sp.*, teniendo un porcentaje de 100% de tener contaminación por el patógeno. Para la realización de las pruebas de infección con las cepas de los virus de las malezas tales como *Croton hirtus* y *Rhynchosia mínima* se obtuvo una cantidad de daño de un porcentaje del 90%. Para las pruebas realizadas en las plantas de tabaco se identificó la prevalencia de los Begomovirus encontrados en la totalidad las plantas infectadas teniendo así un total de 100% de daño. No se apreciaron sintomatología característicos de los daños por intermedio de virus en las plantaciones de tomate y de tabaco en los periodos analizados.

2.1.2 Investigaciones nacionales

De Souza (2021), realizó análisis en plantaciones hospederas de arracacha y caracterizó por técnica de biología molecular los virus identificados usando la técnica de Deep sequencing. Identificó el nepovirus (PBRSV) de una plantación mantenida de manera in vitro, constatando la existencia del patógeno no solamente por la identificación a nivel nucleotídicos y análisis de los aminoácidos en la región ORFs esenciales, también de igual forma por DAS-ELISA conteniendo antígenos reportados para el *Tobacco Ringspot Virus* y PBRSV. Además, analizó unos ejemplares que estuvo liofilizados con infección por el *potyvirus* conocido como *Arracacha potyvirus 1*, realizo un secuenciamiento del virus por medio de Deep sequencing y obtuvo dos cepas del virus en ese análisis, de las secuencias analizadas, lo que indico que pertenecen a *Arracacha Mottle Virus* antes reportado en Brasil. También, evaluaron dos tipos de muestras de arracacha que no tuvieron alguna sintomatología por Deep sequencing, obteniendo dos diversas secuencias novedosas que se relacionan a los crinivirus y vitivirus. Fundamentados en las secuencias conseguidas, diseñó primers para analizar accesiones de arracacha y plantaciones de papa en zonas agrícolas del Perú y de Colombia. Pudo identificar estas secuencias novedosas en varias muestras. Las pruebas de transferencia de forma mecánica y por medio de insectos transmisores de estos supuestos virus no obtuvieron buenos resultados. Pero la constitución genética de las secuencias halladas expresa que se podrían tratar de nuevos patógenos con capacidad de dañar la arracacha y la papa.

Llacza (2019), caracterizo un Begomovirus que afecta a cultivares de tomate, en donde colecto muestras en La Libertad, Lima y Junín. Sus muestras presentaron daños específicos de clorosis, distorsión de las hojas, encrepamiento y enroscamiento. La extracción del ADN se hizo por medio del protocolo de CTAB y con un kit comercial. La amplificación del ADN fue realizada por medio del método de PCR, electroforesis detecto bandas de ADN; la limpieza de las porciones amplificadas de PCR lo realizo mediante un kit comercial para ser enviados a secuenciar. Finalmente llevo a cabo el examen informático para lograr establecer el vínculo de semejanza y elaboro el árbol filogenético cotejado con diversos tipos de genes de virus referenciados. Logró la identificación molecular de *Tomato Leaf Deformation Virus* (ToLDeV) perteneciente a la familia de los Begomovirus, que ocasiona un impacto muy dañino en los cultivos comerciales de tomate.

Carrión (2017), ejecuto 5 análisis con 5 diversas variedades comerciales de plantas de papa del CIP, a las cuales se les indujo una infección por *Potato Yellow Vein Virus* (PYVV) por medio de injerto lateral. Evaluó mediante 3 exámenes espectro radiométricas por cada muestra cada 2 veces por semana a lo largo todo el tiempo de análisis y realizó un análisis observacional continuo de los daos. También, valido la aparición del virus PYVV empleo la técnica de RT-PCR. Al final, analizo la productividad de las 5 var. y determino la var. más susceptible a infección por virus. Además, realizó un análisis temprano de la contaminación por el PYVV en las 5 var. analizadas de las plantas de papa.

González (2016), Estableció la predominancia, repercusión y disposición de siete patógenos importantes mundialmente en los departamentos de Ica, de Arequipa y de Tacna. Por esto analizo una gran cantidad de 1 207 plantaciones, que pertenecían a 28 viñedos. Colectó muestras de las hojas en diversas zonas las cuales fueron examinadas empleando la técnica de DAS-ELISA. El mayor número de sucesos totales fueron de 7.04% para los daños con el virus GFKV. Los datos más altos de incidencia, éstos fueron de 71,4% para el virus GLRaV-2 y 67.9% para GFKV. Con estos datos se seleccionó los virus con mayor importancia para iniciar a un periodo de uniformizar el protocolo de detección molecular para lograr el diagnóstico variado por Inmunocaptura (IC) RT-PCR y RT-PC. Por ello utilizo cebadores específicos de la zona de la cápside de la proteína de los virus. Por eso logro confirmar el resultado, utilizando un contraste con método de DAS-ELISA con relación de su susceptibilidad y particularidad. Para lograr analizar la susceptibilidad de las muestras realizo diluciones en serie de un extracto de plantaciones con infección variada. Decidió que el método de IC-RT-PCR tiene diez mil veces mucha mayor sensibilidad que el DAS-ELISA y que tiene cien veces más sensibilidad que el RT-PCR. La especificidad lo confirmó por medio de secuenciamiento de amplificadas de PCR. Las secuencias analizadas que obtuvo fueron analizadas en el GenBank obteniendo un porcentaje de similitud superiores al 94% y 99% con los diversos aislados reportados de los virus.

Gálvez (2015), realizó un testeo por la técnica de PCR de 394 accesiones de plantas de camote de Latinoamérica y en el este de África, para determinar la prevalencia de Begomovirus, y 46 muestras fueron positivas. Todas eran asintomáticas en plantas de camote, pero presento enrollamiento de las hojas y/o amarillamiento en injertos de *Ipomoea setosa*. El SPLCV es la cepa de los fitopatógenos dominante. La cantidad de seis virus más diversos, por medio de análisis de WGS, que se usaron para analizar las relaciones con el patógeno SPCSV popular por provocar infecciones sinérgicas con diversos patógenos. Las

infecciones múltiples llevaron a un incremento de los Begomovirus y el descenso de los virus SPCSV en todas las muestras, pero la magnitud de los cambios aumento el estrechamiento de los aislados de los Begomovirus. La sintomatología de enrollamiento en las hojas únicamente se presenta parcialmente en conjunto con la cepa aislada de StV1 y correspondieron con la disposición de las cargas más elevadas de los patógenos en las plantaciones. El examen de los genes analizadas de los siRNA develo que las infecciones conjuntas de SPCSV con la cepa aislada de StV1 llevo a un incremento proporcional de siRNA semejante de la zona céntrica del genoma y una disminución en las zonas semejantes a los lados, pero no encontró ninguna variación relativa del StV1.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 El tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las plantaciones de las que más se nutren en el mundo luego de la papa (Baskins *et al.* 2019). La producción sus frutos es distinta, pero forma parte de la familia de la Solanácea, es una de plantas las más notables en los cultivos, no solamente porque se encuentran una gran cantidad de las variedades que las albergan, un aproximado de 2 500, sino también por lo que representa en varias de sus diversidades en la nutrición mundial. (Särkinen *et al.* 2015; Sierra-Muñoz *et al.* 2015).

Esta solanácea es una plantación mundial y su diversidad comprende sus parientes silvestres, los cuales son el origen principal de la sección *Lycopersicum* y de él origen seguido en la sección *Juglandifolia* y *Lycopersicoides*. Estas variedades albergan 17 especies, una que se cultiva y otra con 16 parientes silvestres, todas estas tienen su origen de la zona céntrica y del occidente de los Andes de Sudamérica, se encuentran con una disposición de elevación desde el nivel del mar hasta un promedio de los 3 500 m.s.n.m., además se encuentra en el territorio que actualmente llega a los estados como lo son Colombia, Ecuador, Perú y la parte del norte de Chile (Peralta y Spooner, 2007). En el Perú se encuentran en forma natural una cantidad de las 13 de las 16 especies silvestres existentes (MINAM. 2020).

Del tomate comercial se conocen dos variedades por su peculiar volumen y por la estructura de sus frutos los cuales son: *lycopersicum* y *cerasiforme*, tal como numerosas especies silvestres y cultivos generados por mejora genética para diversos fines, tales como son para alimento fresco como variedades que son comercializados para la industria (MINAM, 2020).

2.2.2 Origen y diversificación

El tomate, tal como la vemos en la actualidad, se habría tenido un origen posiblemente en la parte sur del país de Ecuador, acontecimiento que pudiera haber sucedido por mejoramiento natural hace aproximadamente 78 000 años atrás. Más adelante, las variedades *lycopersicum* se pudo haber movilizó a la parte nororiental del Perú y desde ese lugar a la parte de América central en donde, al encontrarse por acto del ser humano, deberían haber llegado a variedades silvestres con atributos de dominio aproximadamente unos diez mil años atrás (Razifard *et al.* 2020).

En el año 1544 Marthinoli brinda los primeros antecedentes de la planta y su alimentación con el tomate en Italia, por esto se considera que la planta de tomate pudo haber sido insertado en el viejo continente aproximadamente desde el siglo XV. El fruto se expandió a nivel internacional desde el continente americano hacia el continente europeo, y últimamente se han reportado diversos cultivos de tomates con diversas cualidades desarrolladas para tener una precocidad, producción, defensa hacia las plagas, y así también como cultivos de tomates mejorados por medio de ingeniería genética (Peralta *et al.* 2008; Razifard *et al.* 2020).

2.2.3 Taxonomía

Peralta *et al.* (2008) mediante la descripción asociada que reside en las cualidades fisiológicas y genéticas, califican al tomate y sus familias silvestres que son más allegados englobados en el grupo *Lycopersicum* del género *Solanum*. Este grupo fue unificado por 13 variedades, que contienen a esta planta sembrado y a 12 de sus familias locales de parecido genético principal. También, el tomate tiene cuatro especies con relación a sus partes, con un total de 17 especies ligadas.

Según Stevens (2017) el cultivo de tomate tiene la siguiente taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanácea

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum*

2.2.4 Importancia del cultivo de tomate

En la actualidad, este cultivo se cultiva en la gran parte de los países, volviéndose así en un cultivar económicamente fundamental. Esta planta es conocida como un alimento protector por su alto valor nutricional, brinda notables sustancias fundamentales como lo son: el licopeno, betacaroteno, flavonoides, vitamina C y procedentes del ácido hidroxicinámico (Wu *et al.* 2011; Raiola *et al.* 2014).

El país ha avanzado últimamente en la parte económica, resaltando su impulso en los negocios con el tomate en el Perú, planteando con tecnología innovadora con el fin de disminuir las plagas por medio a que se ve evidenciado en disminuciones económicas se trata de incrementar fundamentalmente la tecnología en la productividad de plantas de tomate, así también incrementar la productividad por hectárea a un mayor rango y tener mejores ingresos (Córdova *et al.* 2016).

En el 2019 la productividad global de frutos de tomate, tuvo un promedio de 180 766 T, un 30% superior a la que de hace diez años (FAO, 2021).

2.2.5 Plagas que afectan tomate

Las plagas principales que dañan a las plantas de tomate son: *P. cockerelli*, *P. nemuslatus*, *T. urticae*, *T. cinnabarinus* (Nuño, 2007). *B. tabaci*, *L. sativae*, *L. trifolii*, *M. incognita* y *F. occidentalis* (Jaramillo *et al.* 2007).

2.2.6 Enfermedades que afectan tomate

Esta hortaliza es infectada por aproximadamente 200 enfermedades con diferentes orígenes, los primordiales causantes de estas enfermedades son: los hongos, las bacterias, los virus y los viroides, de estos surgen infecciones graves (Jaramillo *et al.* 2007).

2.2.7 Los virus como patógenos de plantas

Estos microorganismos son parásitos obligados de las células ya que necesitan del metabolismo de la célula a la que infectan. Las partículas virales están formadas por una o varias cadenas de ácidos nucleicos que, normalmente, aparecen envueltas en una capa protectora de naturaleza proteica denominada cápside. Para la replicación de su material genético utilizan enzimas codificadas por su genoma y la maquinaria celular de su huésped generando clones idénticos y variantes con mutaciones nucleotídicas como producto del proceso de replicación (Hull, 2014). Los virus se pueden transmitir verticalmente a la descendencia de su huésped u horizontalmente entre huéspedes mediante vectores o por

contacto mecánico. Fuera de su huésped, los virus están inactivos, por lo que necesitan de un agente externo, ya sea de diversos organismos o del ecosistema, para su dispersión (Gergerich y Dolja, 2006).

Cuando un virus afecta a una plantación se producen una serie de alteraciones fisiológicas que pueden resultar en el surgimiento de las sintomatologías de la enfermedad, que pueden variar desde una reducción del tamaño de la planta, deformaciones foliares o amarillosos, hasta decoloraciones, mosaicos, necrosis o alteraciones en el fruto, entre otros. Los virus de plantas suponen una seria amenaza para una amplia gama de cultivos a nivel mundial, ya que pueden causar una reducción significativa de la cualidad y la producción de los cultivares afectados, lo que conlleva importantes pérdidas económicas. Las pérdidas económicas causadas por virus son las segundas en importancia, comparadas con las causadas por otros patógenos (Loebenstein, 2009).

El control de las enfermedades virales es complicado, no sólo por la compleja dinámica epidemiológica de las mismas, sino también por la rápida dispersión de los virus y por su gran capacidad evolutiva. Además, hasta la fecha, no existen compuestos antivirales directos que se puedan utilizar en agricultura. Estudiar el ciclo biológico de los virus es necesario para el diseño de programación efectivas y duraderas para controlar los daños causados por éstos. Para ello es necesario preparar técnicas de detección adecuadas que, además, puedan permitir monitorizar la dispersión de los virus, facilitando el diseño de medidas preventivas y de contención (SEF, 2020).

2.2.7.1 Virus que afectan tomate

En la actualidad los virus de las plantas de tomate, lograrían considerarse como las infecciones más convenientes, por la importancia que ocasionan graves perjuicios económicos, han ido aumentando debido al paso del tiempo (Alfaro *et al.* 2013). Comprendiendo que los primordiales patógenos vegetales que infectan a plantas de tomate, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.*Virus que afectan a plantas de tomate con su respectiva clasificación*

| Virus | Familia | Género | Tipo de Virus |
|---|-----------------|--------------|---------------|
| <i>Alfalfa Mosaic Virus (AMV)</i> | Bromoviridae | Alfamovirus | RNA |
| <i>Cucumber Mosaic Virus (CMV)</i> | Bromoviridae | Cucumovirus | RNA |
| <i>Beet Curly Top Virus (BCTV)</i> | Geminiviridae | Curtovirus | DNA |
| <i>Pepino Mosaic Virus (GRSV)</i> | Bunyaviridae | Tospovirus | RNA |
| <i>Tomato Chocolate Spot Virus (ToCSV)</i> | Secoviridae | Torradovirus | RNA |
| <i>Tomato Apex Necrosis Virus (ToANV) – Tomato Marchitez Virus (ToMarV)</i> | Secoviridae | Torradovirus | RNA |
| <i>Tomato Torrado Virus (ToTV)</i> | Secoviridae | Torradovirus | RNA |
| <i>Potato Yellow Vein Virus (PYVV)</i> | Closteroviridae | Crinivirus | RNA |
| <i>Tobacco Etch virus (TEV)</i> | Potyviridae | Potyvirus | RNA |
| <i>Lettuce Necrotic Stunt Virus (LNSV)</i> | Tombusviridae | Tombusvirus | RNA |
| <i>Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV)</i> | Tombusviridae | Tombusvirus | RNA |
| <i>Tomato Chlorotic Spot virus (TCSV)</i> | Bunyaviridae | Tospovirus | RNA |
| <i>Tobacco Mosaic Virus (TMV)</i> | Virgaviridae | Tobamovirus | RNA |
| <i>Tomato Mosaic Virus (ToMV)</i> | Virgaviridae | Tobamovirus | RNA |
| <i>Tomato Mottle Virus (ToMoV)</i> | Geminiviridae | Begomovirus | DNA |
| <i>Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)</i> | Bunyaviridae | Tospovirus | RNA |
| <i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)</i> | Geminiviridae | Begomovirus | DNA |
| <i>Tomato Yellow Mosaic Virus (ToYMV)</i> | Geminiviridae | Begomovirus | DNA |
| <i>Potato Virus Y (PVY)</i> | Potyviridae | Potyvirus | RNA |
| <i>Tomato Chlorosis Virus (ToCV)</i> | Closteroviridae | Crinivirus | RNA |
| <i>Tomato Infectious Chlorosis Virus (TICV)</i> | Closteroviridae | Crinivirus | RNA |

Fuente: Adaptada de APS (Jones *et al.* 2015).

2.2.7.2 Transmisión de virus de plantas

Los patrones de las plantaciones son transmitidos de una plantación a otra de diversas formas. Los estilos de propagación contienen la transmisión de forma vegetativa, mecánica por medio de la savia, por intermedio de las semillas, por medio del polen, de los vectores, de los ácaros, de los nematodos y también de determinados tipos de hongos (Agrios, 2005).

Transmisión de virus por propagación vegetativa

Estos patógenos se logran transferir por medio de trasplantes, ya que constantemente que las plantas se dispersan de forma vegetativa por medio de injerto, por medio de esquejes o también por medio de los tubérculos, los cormos, los bulbos o las raíces, en el momento que estas partes se cogen de una planta madre (Agrios, 2005).

Transmisión mecánica de virus por medio de la savia

La transferencia de lo virus de forma mecánica de plantaciones en el ambiente por medio de la transmisión directa de savia por medio de la relación de una planta con otra es poco común y parcialmente de poca importancia. Dicha transferencia lograra tener importancia luego de que un gran ventarrón perjudique las hojas de las plantaciones cercanas infectadas y saludables o cuando las plantaciones sean dañadas en el transcurso de las prácticas culturales por medio de instrumentos, contacto o prendas de vestir, o por mamíferos los cuales se nutren de estas plantaciones, y el patógeno que disipa la savia se trasladan a plantaciones dañadas (De Souza, 2021).

El gran interés de la transferencia mecánicamente de los virus de plantaciones viene de la necesidad en el análisis de los virus que provocan infecciones en plantas. Por ello la transferencia de forma mecánica de un patógeno, se deben triturar las hojas jóvenes y pétalos para lograr romper la célula y desatar al patógeno en la savia para luego inocularlas en plantaciones juveniles, primordialmente en un nivel de plantaciones señalizadas, de las que principalmente demuestran sintomatologías que son más graves que en los cultivares en específico (De Souza, 2021).

Transmisión por semillas

Una cantidad mayor de 100 patógenos son transferidos por medio de semillas de procedencia botánica de gran o mínima proporción. Como concepto principal, al menos una mínima parte (1 a 30%) de estas semillas procedentes de plantaciones afectadas por virus, solo pocos huéspedes del virus lo transfieren. En cambio, en diversas interacciones virus-huésped, el promedio o la gran parte de las semillas portan el virus, y en muchas de ellas el 100% de las semillas lo portan. La constancia de transferencia cambia con la relación entre huésped-patógeno, y también con el estado de aumento de la plantación madre cuando sufre una infección por el patógeno (Agrios, 2005).

Transmisión por polen

El patógeno transferido por medio del polen logra disminuir la obtención de fruto, ya se logra infestar la semilla y los plantines que se desarrollaran de estas y, en diversos casos, logran transmitirse por medio de la flor fue fecundada y directo de la plantación originaria, la cual logra ser infestada con el patógeno. Se conoce que cierta transferencia de patógenos entre plantas por medio del polen suele suceder (Agrios, 2005).

Transmisión por insectos

Se conoce que los insectos transmisores son sin duda el método más frecuente y económicamente de mayor importancia de la transferencia del patógeno en los diversos campos. En cambio, son respectivamente pocas porciones de insectos los que logran transferir el virus vegetal. El orden Homoptera, tiene un alto valor con la cantidad de insectos trasmisores más notable de los virus que afectan a las plantaciones. Otro tipo de homópteros que transfieren patógenos de plantaciones son las moscas blancas, los cuales transfieren los geminivirus y crinivirus. Varios de estos individuos transmisores de patógenos de plantaciones forman parte de diversas órdenes. Los saltamontes eventualmente pueden tener y transferir diversos patógenos. Los transmisores de los patógenos más notables son los ácaros, los salta hojas, las moscas blancas y los trips (Agrios, 2005).

Los insectos con parte bucales chupadoras tienen patógenos de plantaciones en sus estilos y de ese modo logran obtener y contagiar el virus luego de breves momentos de nutrición en algunos breves segundos con algunos cortos periodos. Los patógenos transferidos por estiletes permanecen en los trasmisores por solo algunas mínimas o mucho tiempo. Por lo consiguiente, luego se reconocen como patógenos que no son perdurables. Como diversos virus, los insectos transmisores deben nutrirse de una plantación dañada hacia diversos minutos u horas hasta varios días luego de contener bastantes virus para lograr la transferencia. Estos vectores logran transferir el virus luego de tiempos de nutrición suficientemente largo de diversos minutos a muchas horas. Aquellos virus perduran en el transmisor por algunos cuantos días (1 a 4) y se nombran patógenos semipermanentes. Con diversos patógenos, los transmisores de vector almacenan el patógeno en su interior y, luego albergan al patógeno por medio de los partes del vector, vuelve a ingresar el patógeno en las plantaciones por medio de sus partes bucales. Aquellos patógenos se denominan como patógenos móviles o perdurables. Diversos patógenos circulantes logran propagarse en sus distintos transmisores y luego se nombran como patógenos transferidos. Los patógenos

transferidos por vectores con partes bucales masticables luego logran ser circulantes o logran transmitirse en sus partes bucales (Agrios, 2005).

Estos individuos son los transmisores de vectores principales de los patógenos de plantas y transfieren una elevada cantidad (aprox. 275) de la mayoría de los patógenos propagados por medio de estiletes. Estos individuos principalmente tienen el patógeno transferido por medio del estilete luego de nutrirse de diversas plantaciones infectadas por medio de pocos segundos y logran transferir el virus luego de su transmisión y nutrición desde una plantación saludable en el transcurso de un tiempo determinado o de unos mínimos segundos. El lapso del periodo que los pulgones perduran con virulencia luego de la obtención de un patógenos transferido por medio de estiletes difiere de unos pocos a mucho tiempo, luego de esto ya no logran ser transmisores del patógeno. En los ácaros que propagan el patógeno por medio de estiletes, el patógeno puede transferirse en las cabezas de estos estiletes, pero esto se disipa con facilidad por medio del lavado que sucede a lo largo del conteo de las células huésped y no persevera por medio del cambio o en los huevos. Se menciona que los patógenos propagados por medio de estilete se transfieren de forma no obstinada. En algunos sucesos de propagación de pulgones de patógeno transitorios, estos no logran propagar el patógeno de forma inmediata, pero pueden aguardar mucho tiempo luego de la nutrición de obtención; Pero, cuando se empieza a propagar el virus, vuelven a hacerlo a lo largo de varios días luego de la muerte de los insectos que son el origen del virus (Agrios, 2005).

Transmisión por ácaros

Los principales ácaros han logrado propagar por lo mínimo seis virus, incluyendo a el *WSMV* y diversos rymovirus que dañan a las gramíneas. Estos individuos contienen partes bucales masticadoras y succionadoras. La propagación de estos patógenos por medio de los ácaros eriófidos se considera que son muy característicos, ya que varios de estos individuos es el único transmisor reconocido para el patógeno o los diversos virus que se propagan (De Souza, 2020).

Transmisión por nematodos

Un aproximado de 20 virus de plantaciones son propagados por uno o diversos tipos de tres de los géneros de nematodos ectoparasitarios que se encuentran en la tierra. Los nematodos de los principales géneros, propagan diversos patógenos de estructura gemétrica reconocidos como los nepovirus, y diversos patógenos; en tanto los nematodos del género *Trichodorus* y *Paratrichodorus* propagan, aunque sea una cantidad de dos tobnavirus con estructura de

bastón. Los transmisores de nematodos propagan el virus al nutrirse de rizomas de las plantaciones dañadas y después llegan a rizomas de plantaciones saludables. Los nematodos jóvenes y maduros logran tener y propagar el virus; pero, el virus no se transmite por medio de los cambios en los jóvenes ni por medio de los huevos, y, luego de la metamorfosis los nematodos jóvenes o los maduros procedentes tienen que nutrirse de una fuente de virus antes de que logren propagarlo de nuevo (De Souza, 2020).

Transmisión por hongos

Los microorganismos parecidos a los hongos que contagian a los rizomas, propagan alrededor de 30 virus fitopatógenos. Supuestamente, varios de estos virus se propagan interiormente, cuando diversos se dispersan en el exterior por medio de esporas inactivadas y en las zoosporas de los hongos. En el daño de recientes plantaciones huéspedes, donde los hongos ingresan al virus y provocan sintomatologías propias del virus que propagan (De Souza, 2020).

2.2.7.3 Movilización de los virus en la planta

Estos patógenos comienzan con su multiplicación en el propio lugar de su inserción, luego de eso se movilizan en diversas células. Este traslado es lento conforme a que se efectúa por medio de los plasmodesmos (que son la combinación a través de células adyacentes). Al presentarse hacia el sistema vascular de los vegetales (xilema o floema), el traslado del patógenos en las plantas logra gran velocidad y se traslada conjuntamente a los fotosintatos. El periodo que se demora un patógeno en trasladarse en una plantación varía de diversos elementos, semejantes como lo son la diversidad de las plantaciones, diversidad de virus, años de las plantaciones al instante del contagio, y temperatura, entre diversos elementos (Sepúlveda, 2011).

2.2.8 Síntomas Generales

Antes de crearse los protocolos de identificación rápida, la sintomatología eran el principal recurso para acercarse a la identificación de las infecciones provocadas por los virus en las plantaciones. Así por medio del uso de técnicas serológicas, moleculares y genéticas, aumento el diagnóstico acerca de las características de los virus, llegando así a identificar a estos patógenos de plantas de otras diversas infecciones de las plantaciones. Actualmente las sintomatologías albergan un alto beneficio, ya que logran analizar los daños de las infecciones y, en diversas situaciones, son el principal medio para lograr identificar prontamente las infecciones en una plantación. También, el análisis de los síntomas son el

método fundamental para nombrar al intermediario causante de las infecciones provocadas por patógeno. La infección vírica particularmente se conduce de un estado natural del hospedero, provocando contaminaciones sin presencia de síntomas. En el año 1925 ocurrió el primer reporte de plantaciones sin presencia de síntomas al consignar la presencia de virus en plantaciones de papa supuestamente saludables. La problemática de las contaminaciones asintomáticas tiene especial relevancia en la declaración de planes de productividad de plantines limpios de infección viral. También, pone en valor en la inspección de las infecciones provocadas por virus, ya que plantaciones que no presentan síntomas pueden actuar como origen del inóculo para cultivares saludables (Sepúlveda, 2011).

Los síntomas comunes que se logran visualizar en plantaciones son:

- Reducción del volumen de las plantaciones (enanismo).
- reducción del volumen y cantidad de los frutos.
- Mosaico, caracterizado por el cambio de color verduzco original, con el incremento de zonas amarillentas o verde tenue en las hojas o en los frutos. Variando del vigor del color, el mosaico logra ser severo o fuerte y tenues o moteados. Los mosaicos logran mostrarse de manera diferente en las áreas específicas o también logran ser reducidos a los nervios de las hojas.
- Amarillamiento. Aparece en el momento donde hay mayor totalidad de la vegetación de las plantaciones se vuelve clorótica.
- Anillos. Manchas anilladas totales o escasos, provocadas primordialmente por patógenos propagados por los nematodos.
- Necrosis. Comprende a la destrucción de las células, la mayormente concurrentes son las líneas en los ocurridos en los tallos, en los pecíolos y en la parte de los nervios de las hojas.
- Pétalos variegados.
- Deformaciones en las hojas.
- Irregularidad del desarrollo. Es sobre alteraciones en las hojas, disminución de la zona vegetativa, crecimiento hacia la parte inferior, las hojas filiformes y/o la inflación en los tallos.

2.2.9 Diagnóstico de virus

La disminución en la productividad y las disminuciones de la economía que son provocadas a razón de los patógenos que infectan plantas han tenido mucha relevancia a magnitudes globales, por lo que se necesita el incremento de metodologías de identificación efectiva y precisa para lograr admitir las elecciones que logren prever su difusión (De Souza, 2020).

2.2.9.1 Métodos biológicos

El empleo de metodologías biológicas para identificar infecciones provocadas por virus son los principales en emplearse a desde el año 1886 con Meyers, el cual inocularía una planta contaminada con el patógeno del mosaico del tabaco (TMV) en plantaciones saludables corroborando el surgimiento de las mismas sintomatologías que las plantaciones infectadas. Por ende, los síntomas y las plantaciones señalizadoras son los dos tipos de identificación que contiene esta metodología (González-Garza, 2017).

El virus más frecuente reconocido por medio de los síntomas fue principalmente el TMV al término del siglo XIX, este patógeno al contagiarse origina daños situados en las hojas, los cuales se observan como una pared de ladrillos oscuros de fondo verde. Pero según se extendieron los análisis en diversos patógenos, se apreciaron que existían semejanzas en la sintomatología o incluso esas mismas sintomatologías podrían garantizar igualmente a características perjudiciales del tiempo, insuficiencias nutritivas y del campo o daños no provocados por virus (González-Garza, 2017). Los beneficios que se logran atribuir a una identificación rápida, por tanto, es aconsejable corroborarlo con diversos análisis serológicos o de tipo molecular para tener una mejor confirmación en los resultados (Naidu y Hughes, 2003).

2.2.9.2 Técnicas moleculares

Los análisis con tecnologías moleculares se establecen en la identificación del material genético de los patógenos. Son considerablemente empleados en la detección, por medio de una gran especificidad a diferencia con los métodos serológicos. La reacción en la cadena de la Polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) es posiblemente la metodología más empleada para la realización de análisis moleculares para lograr la identificación del patógeno. El análisis es veloz y muy específico, por lo tanto, disminuye o anula las dificultades con la baja cantidad de material (Nassuth *et al.* 2000).

Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes

La PCR se fundamenta en la producción de múltiples copias de las muestras de una porción de ADN determinado por medio del uso de mínimas secuencias flanqueantes (iniciadores) y la acción de polimerasas de ADN termoestables. Desde su descubrimiento (Mullis *et al.* 1986) se ha convertido en la técnica de cabecera de los laboratorios de biología molecular. La gran parte de los virus vegetales, que tienen genomas de ARN, precisan de un paso inicial de transcripción reversa (Reverse transcription, RT), donde el ARN se convierte en ADNc (ADN complementario) y sirve de molde para la PCR (RT-PCR). La RT-PCR se ha colocado como la metodología más usada para la identificación de virus de plantaciones. Las ventajas fundamentales de esta técnica son su rapidez, su especificidad y su sensibilidad. Debido a esa gran sensibilidad, la aparición de diferentes compuestos en las muestras vegetales puede tener un efecto inhibitor y llegar a producir falsos negativos. Se ha observado que la introducción de controles endógenos puede ayudar a la visualización de este problema. También pueden producirse falsos positivos debido a posibles al plegamiento de secuencias inespecíficas de los primers, así como contaminaciones de ADN por el proceso de manipulación (Mumford *et al.* 2006).

Los iniciadores son pequeñas secuencias de 15 a 40 pb que flanquean ambos extremos del fragmento amplificado. De su diseño no sólo depende la eficiencia del proceso, sino también su especificidad. Existe una gran cantidad de información de secuencias parciales y completas para los distintos virus, disponibles en el banco de datos (GenBank, NCBI (Bethesda, MD, USA)) que permiten seleccionar las regiones adecuadas para el diseño de los iniciadores, eligiéndose regiones conservadas capaces de discriminar entre especies virales o capaces de identificar familias enteras (Lotos *et al.* 2014; Luria *et al.* 2017).

Generalmente, la visualización de las muestras de la PCR se realizaba utilizando geles de agarosa pintados con bromuro de etidio, pero debido a su peligrosidad, se ha sustituido por otros tintes menos tóxicos como el Gel Red o MIDORI Green (Torre, 2019).

Además de la PCR convencional, se han implementado múltiples tipos de PCR, dentro de las cuales encontramos la PCR o RT-PCR múltiplex, que proporciona la determinación seguida de 2 o más virus en una misma corrida (Gambino y Gribaudo, 2006; Sánchez-Navarro *et al.* 2018); la PCR anidada y la PCR cooperativa (Olmos *et al.* 2002; López *et al.* 2009), que utilizan dos parejas de iniciadores, una pareja interna y otra externa, para amplificar la molécula diana, y que presentan una sensibilidad hasta 1000 superior que la PCR convencional (Cambra *et al.* 2016).

Secuenciación nucleotídica

Las técnicas de secuenciación son las más precisas y específicas ya que determinan precisamente el código genético del organismo analizado. Son, además, la base de la caracterización molecular, pues el cotejo de la secuencia conseguida con los genes encontradas en las bases de datos permite identificar taxonómicamente al organismo analizado. Existen dos técnicas de secuenciación nucleotídica, según se tenga o no información previa del organismo:

Secuenciación tipo Sanger. Esta técnica se conoce como secuenciación de primera generación y se fundamenta en la reestructuración de una secuencia de ADN complementaria a otra utilizada como modelo, en presencia de un ADN polimerasa, un iniciador, los cuatro desoxinucleótidos que componen la cadena y cuatro didesoxinucleótidos (dNTPs) marcados, que al carecer de grupo hidroxilo en el extremo 3', interrumpen la reacción de síntesis (Sanger *et al.* 1977). Esta técnica se considera como la técnica de secuenciación base en cualquier laboratorio de biología molecular y se utiliza, sobre todo, para la caracterización molecular de un organismo a partir de un fragmento amplificado por PCR o RT-PCR, por lo que se tiene un conocimiento previo del género o la especie del organismo secuenciado. Como ventajas, hay que destacar que es una técnica rápida, relativamente económica y ofrece la mayor longitud de lectura de las técnicas de secuenciación que se han venido utilizando, llegando a longitudes fiables superiores a las 800 pb. El principal inconveniente es que es necesaria una amplificación de la secuencia y su correcta separación por tamaños, previa a la secuenciación (Olmos *et al.* 2016).

Secuenciación masiva (High Throughput Sequencing, HTS). Esta técnica, acoplada a análisis bioinformáticos más o menos complejos, permite la estimación de una secuencia completa o parcial del genoma de los virus (o viroides) de una muestra, sin ningún conocimiento a priori (Boonham *et al.* 2014). Por tanto, sirve tanto para el diagnóstico y detección, como para el descubrimiento de nuevos virus. Según la metodología utilizada, existen diversas plataformas para la secuenciación masiva. En primer lugar, están las plataformas que forman parte de la denominada secuenciación de próxima generación (NGS). Las plataformas que han sido más usadas en NGS son la secuenciación 454 (Roche Diagnostics), Illumina y SOLiD (Applied Biosystems) (Radford *et al.* 2012), la cual ha empezado a ser reemplazada desde 2016 por la plataforma Ion Torrent (Radford *et al.* 2012; Adams y Fox, 2016). La plataforma Illumina se sustenta en la unión de los fragmentos de ADN sobre un soporte de vidrio con iniciadores complementarios a los adaptadores. La

secuenciación se realiza por un procedimiento llamado “amplificación por puente” (www.illumina.com) y la incorporación de nucleótidos se detecta por fluorescencia, de un modo similar al método de Sanger, pero los ddNTPs son reversibles, por lo que puede seguirse elongando la cadena. Esta es la plataforma NGS más utilizada en virología vegetal (Olmos *et al.* 2016).

Un inconveniente de las técnicas de NGS es que generan lecturas cortas, de entre 100- 700 pb, y un gran volumen de datos (Barba *et al.* 2014). Afortunadamente, existen diversos programas informáticos y se están desarrollando diversos pipelines para el procesado de los datos (Ho y Tzanetakis, 2014; Flygare *et al.* 2016; Baizan-Edge *et al.* 2019), entre las que se encuentra VirusDetect (Zheng *et al.* 2016), específico para el análisis de virus, por lo que es una herramienta muy importante en virología vegetal (Bernal-Vicente *et al.* 2018; Nisbet *et al.* 2019).

Las técnicas de secuenciación más recientes son las denominadas de tercera (Pacific Biosciences, www.pacificbiosciences.com) y de cuarta generaciones (MinION, de Oxford Nanopore, nanoporetech.com/products/minion), que se caracterizan por la secuenciación en tiempo real de moléculas individuales (Single molecule real time, SMRT). A diferencia de las técnicas de NGS producen longitudes de lectura mucho mayores, desde 5.000 pb el sistema de Pacific Biosciences (Barba *et al.* 2014), hasta las 150.000 pb del sistema MinION (Laver *et al.* 2015), lo que las convierte en tecnologías rápidas, obteniéndose lecturas completas en un solo día (Barba *et al.* 2014). El sistema MinION ha sido evaluado recientemente sobre distintas muestras vegetales, avalando su posible futuro como herramienta diagnóstica de rutina (Chalupowicz *et al.* 2019).

2.3. Definición de términos básicos

- **Identificación:** Establece las características propias de alguien o de algo, de modo que claramente se diferencie de las otras.
- **Diagnóstico:** Método en el que se reconoce una infección, afección o lesión por sus sintomatologías y signos.
- **Electroforesis:** Es un método que se utiliza para amplificar el ADN, el ARN, moléculas o proteínas por medio de su estructura y carga eléctrica.

- **Fitopatógenos:** Es un individuo, generalmente un microorganismo, que provoca infecciones en las plantaciones por medio de perturbaciones en el metabolismo de la célula, al eliminar enzimas, toxinas, fitoreguladores y diversas sustancias, también, digiriendo alimentos de la célula para sí lograr su propio desarrollo.
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** es una metodología usada para el diagnóstico e identificación de una porción del material genético de un organismo.
- **Primer o cebador:** Son polímeros pequeños del ácido nucleico empleados en la investigación, análisis genéticos y medicina legal.
- **Prueba Molecular:** Análisis in vitro en el que se emplea una muestra celular, de sangre o líquido corporal para comprobar se encuentra diversos genes, proteínas u diversas moléculas que son signo de una infección o daño.
- **Retrotranscripción:** Tratamiento celular por el cual una enzima realiza un duplicado del ADN a partir del ARN. La enzima que realiza la copia de ADN se denomina retrotranscriptasa y se localiza en los retrovirus. La retrotranscripción también se lleva a cabo de manera invitro.
- **Secuenciación Sanger:** Es el método de secuenciación del material genético que nos consigue reconocer la distribución de los nucleótidos de una parte del ADN que provienen de una muestra de PCR.
- **Análisis Bioinformático:** Disciplina que permite recabar, manejar, almacenar y analizar los datos biológicos, a partir de los derivados de los nucleótidos de una secuenciación, proteómica, metabolómica.

2.4 Hipótesis de investigación

2.4.1 Hipótesis general

Si existe similitud a nivel molecular de los virus ARN que afectan a cultivares de tomate en la costa del Perú.

2.4.2 Hipótesis específicas

HE 1: Si se puede determinar la presencia de los virus ARN en cultivares de tomate utilizando cebadores específicos.

HE 2: Si existe relación entre la distribución de los virus ARN en cultivares de tomate.

HE 3: Si existe relación entre las variedades de cultivares de tomate y la presencia de los virus ARN.

2.4.3 Operacionalización de las variables

En este punto se aprecia el cuadro de la operacionalización de las variables estudiadas.

Tabla 2.

Variables, definición, dimensiones e indicadores

| Variables | Definición | Dimensiones | Indicadores | Escala de medición |
|--|--|---|--|---------------------------|
| Independiente Virus ARN | Patógenos que están conformado principalmente por genes que tienen ácidos nucleicos que conforman moléculas entre cortas y largas de ADN o ARN, conjuntamente con proteínas. | - Extracción de ARN - Primer o Cebador - Presencia de virus ARN | - Calidad de extracción - Tamaño del cebador (pb) - Calidad del cebador (bandas de amplificación) - Secuenciamiento | Nominal (%) |
| Dependiente Cultivares de tomate | Es una de las hortaliza con extraordinaria importancia mundial, ya que se siembra en todo el globo. | - Fitopatología | - Daños en hoja y fruto - Variedad de Planta - Estadio de planta | Nominal (%) |

Capítulo III. Metodología

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de investigación

El presente estudio realizado es de tipo aplicado, ya que no se tuvo que emplear el manejo directo de las variables de estudio.

3.1.2 Nivel de investigación

Es del tipo descriptivo, se emplea cuando el estudiante pretende sólo describir la situación o caso bajo en que se encuentra su estudio de investigación, ya que se determinaron las especies de virus en muestras codificadas provenientes del campo.

3.1.3 Diseño de investigación

El diseño es de tipo no experimental, ya que no se manipulan las variables.

3.1.4 Enfoque de investigación

Es cualitativo ya que no es primordial para este estudio el empleo de magnitudes numéricas.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Fue establecida por los diversos cultivares de tomate que presentaron sintomatología de infección por virus.

3.2.2 Muestra

La muestra fueron hojas de 84 plantaciones de tomate en estado de cosecha y el llenado de fruto, en la costa del Perú (Lima e Ica).

3.3 Técnicas de recolección de datos

Se muestra el diagrama de flujo de la investigación propuesta (Figura 1).

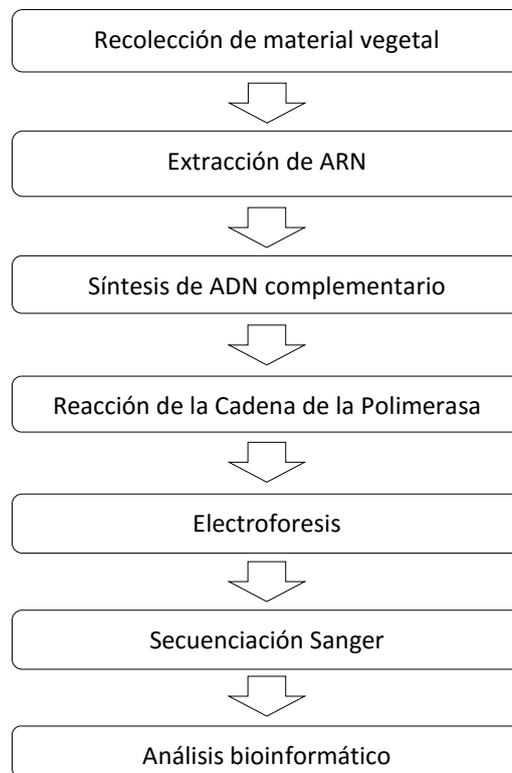


Figura 1. Es quema del diagrama de flujo del procedimiento analítico de la muestra vegetal

Fuente: Elaboración propia

3.3.1 Recolección de material vegetal

Según Saldaña *et al.* 2021 recomienda la metodología para este ítem.

Se tomaron muestras de las hojas de las plantaciones de tomate que presentaron sintomatología por infección viral (como mosaico, deformación de hojas, enrollamiento, amarillamiento, necrosis, aborto de flores y maduración precoz de frutos), se les quitó el exceso de contaminantes (restos de insecticida, tierra e insectos) utilizando agua destilada, se colocaron las hojas dentro de sobres de papel aluminio rotulados y se colocaron en un tanque de nitrógeno líquido (MVE, USA), posteriormente las muestras se trasladaron al laboratorio para su procesamiento. Los datos de ubicación se tomaron con un GPS (Garmin, USA).

3.3.2 Extracción de ARN

Metodología según el protocolo de Mishchenko *et al.* 2021.

Se procesaron las hojas recolectadas, moliéndolas con nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero hasta tener un polvo refinado y luego dispensado en tubos de microcentrífuga de capacidad de 2 mL.

Se dispuso un aproximado de 100 mg del tejido vegetal triturado en otro tubo cónico de 1,5 mL, luego se procedió a extraer el ARN utilizando el kit comercial Gene JET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Luego se realizó una digestión con la enzima DNAsa para tener una muestra pura de ARN sin rasgos de ADN, utilizando el kit comercial RQ1 Rnase-Free Dnase (Promega, USA).

Se cuantificó la concentración y calidad del ARN por medio de las lecturas de la absorbancia en un Nano espectrofotómetro (Implen, USA), se corroboró el estado del ARN en electroforesis. Posteriormente la muestra se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.3.3 Síntesis de ADN complementario

Metodología según protocolo de Mishchenko *et al.* 2021.

Para seguir con el paso de PCR de las muestras, primeramente, se requirió sintetizar el ADN complementario (cDNA) por RT-PCR para pasar las secuencias de ARN a ADN, para ello se utilizó el kit comercial RevertAid RT Kit (Thermo Scientific, USA).

La transcripción inversa se realizó en tubos de 0.2 mL, se toma 1 μ L de ARN y se le agrega 1 μ L de RNA, 1 μ L de Random hexamer primers, se completa con agua libre de nucleasas (NFW) para tener una cantidad final de 12 μ L, luego se incubó a 65°C por 5 min, se le agrega una mezcla con 4 μ L de 5X Reaction Buffer, 1 μ L de Ribolock RNase Inhibitor (20 U/ μ L), 2 μ L de 10 mM dNTPs Mix y 1 μ L de RevertAid RT (200U). Seguidamente las muestras se incubaron en el termociclador con un programa de 25°C por 5 min, 45°C por 60 min y 70°C por 5 min, luego se colocó en frío.

3.3.4 Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)

El desarrollo de las condiciones básicas de PCR fue a través de los cebadores, se evaluará según la metodología realizada por Saldaña *et al.* 2021.

La PCR se realizó usando cebadores que fueron diseñados y proporcionados por el laboratorio, los cuales son determinados para la zona de la cubierta proteica (cp) de los seis virus analizados (Tabla 3).

Tabla 3.

Lista de cebadores para la identificación de virus en tomate

| Virus | Primer Forward | Primer Reverse | Tamaño del Amplificado | T ^o m |
|---|-----------------------|----------------------|------------------------|------------------|
| <i>Peru Tomato Mosaic Virus (PToMV)</i> | CCAATGCTAGAGCCACTCAA | CCAAACCATGAGACCATTCA | 113 bp | 59 |
| <i>Tomato Mosaic Virus (ToMV)</i> | TACGGTTGCAATTCGGTCT | TTAAGATGCAGGTGCAGAGG | 127 bp | 59 |
| <i>Tomato yellow leaf curl Virus (TYLCV)</i> | GGAATGAAGGAACAGGCATTA | GTAAGTGGCTGCCTCTGAT | 84 bp | 59 |
| <i>Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV)</i> | GCAACGGTGGCTATAAGGAG | TAAACCGGATGCACTTTCAA | 102 bp | 59 |
| <i>Tomato Leaf Deformation Virus (ToLDeV)</i> | TAAGGTCACGGGAGGTCAGT | CCCAGCTTCCTGATGGTTAT | 100 bp | 59 |
| <i>Tomato leaf curl disease (ToLCD)</i> | TAAGGATTTTGGGCAGGTGT | TATTGCCACCAGTGACAGT | 126 bp | 59 |

El PCR se realizó siguiendo las especificaciones del kit comercial KAPA HiFi Hot Start Ready Mix PCR Kit (Roche, Suiza) con una cantidad de muestra final de 25 μ L el que contendrá 5 μ L de ADNc (previamente transcrito), 2X KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (2.5 mM MgCl₂ (1X)), 0.3 mM de dNTPs (1X) y 0.5 U de KAPA HiFi Hot Start DNA Polymerase (25 uL por reacción), 0.75 uL de 10 uM de Forward Primer, 0.75 uL de 10 uM de Reverse Primer y agua libre de nucleasas hasta completar los 25 uL.

Se determinó las condiciones óptimas de amplificación para ejecutar el programa en el termociclador Simpli Amp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA), la cual se realizó según el protocolo de tiempo, temperatura y ciclos del fabricante del kit y con unas mínimas modificaciones para poder realizar un análisis múltiple de los seis virus en un mismo programa como se visualiza en la Tabla 4.

Tabla 4.

Condiciones del termociclador para lograr amplificar las fracciones de los patógenos

| Ciclos | Temperatura | Tiempo | N° de ciclos |
|----------------------------------|-------------|--------|--------------|
| Desnaturalización Inicial | 95°C | 3 min | |
| Desnaturalización | 98°C | 30s | |
| Alineamiento | 60°C | 30s | 35 ciclos |
| Extensión | 72°C | 30s | |
| Extensión final | 72°C | 3 min | |
| Almacenamiento | 72°C | ∞ | |

3.3.5 Electroforesis

Las muestras del termociclador se observaron por medio de electroforesis y se visualizan por medio del fotodocumentador de luz UV (Uvitec, Reino Unido) (Saldaña *et al.* 2021).

3.3.6 Secuenciación Sanger

Las muestras que fueron positivas para los virus por el método de PCR, se corroboró su positividad enviándolas a purificar el productora PCR y secuenciar mediante el método de electroforesis capilar por Secuenciación de tipo Sanger a la empresa Psomagen, USA (De Souza, 2021).

3.3.7 Análisis Bioinformático

Las muestras de los virus secuenciados se alinearon utilizando Muscle en el programa Aliview con otras secuencias de virus reportados, que se descargaron del GenBank de NCBI. El alineamiento fue limpiado y la historia evolutiva (el análisis filogenético) se realizó utilizando MEGA XI, con el protocolo de máxima verosimilitud basado en el modelo GTR. El soporte bootstrap se evaluó mediante un remuestreo de arranque con 1000 repeticiones. El árbol se visualizó y editó en ITOL, las distancias génicas fueron calculadas en base al alineamiento en Mega XI (Tamura *et al.* 2013).

3.4 Técnicas para el procesamiento de la información

Empleamos los paquetes estadísticos SPSS versión 26, para determinar la concordancia entre la descripción de daños en los cultivos y el resultado de los amplificadores de PCR. También se calculó el coeficiente kappa, para analizar las diferencias entre frecuencias de las variedades de tomate y se empleó la prueba de ji cuadrada (χ^2), considerando estadísticamente significativa cuando P será igual o menor a 0.05.

Capítulo IV. Resultados

4.1 Análisis de resultados

Seguidamente, se observa la figura 2 con la ubicación geográfica de los seis campos de tomate distribuidos entre el departamento de Lima e Ica, en donde se recolectaron un total de 84 plantas de tomate (hojas) para ser analizadas.

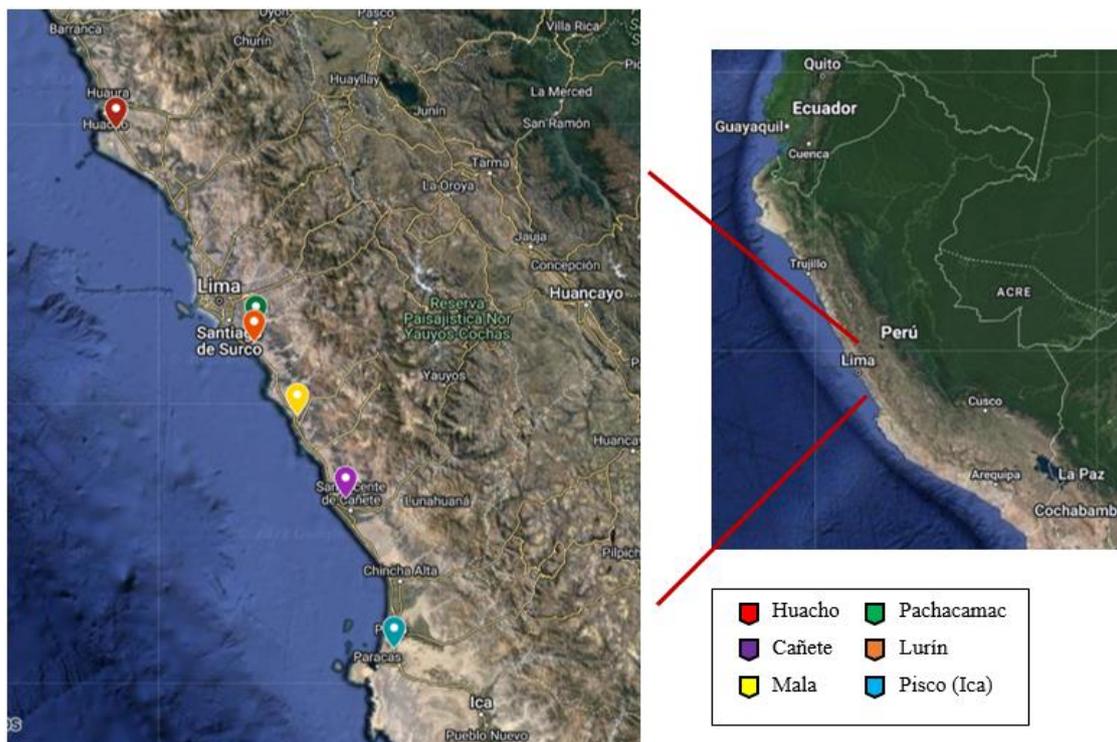


Figura 2. Ubicación de las zonas muestreadas de los campos de tomate

Fuente: Elaboración propia

Respuesta al objetivo general

En la tabla 5 se aprecia los datos resultantes en el análisis molecular de los virus ARN que infectan a cultivos de tomate en la costa del Perú, donde de un total de 84 (100%) plantas de tomate muestreadas y analizadas, 57 (67.9%) de ellas resultaron positivas o presentaron infección por virus y 27 (32.1%) resultaron negativas o con ausencia de infección por virus.

Tabla 5.

Resultados de la identificación molecular de los virus ARN muestreados en los campos de tomate en la costa del País

| Características | Cantidad Total | % |
|------------------------|----------------|------------|
| Presencia de virus ARN | 57 | 67.9 |
| Ausencia de virus ARN | 27 | 32.1 |
| Total | 84 | 100 |

Respuesta al objetivo específico 01

La tabla 6 nos demuestra los resultados de la prevalencia de los virus ARN en cultivares de tomate utilizando los cebadores específicos de la tabla 3, de los cuales solo PToMV y ToBRFV fueron encontrados en este estudio, con un total de 57 plantas infectadas por estos dos virus.

Además de los resultados totales obtenidos se aprecia dos tipos de infecciones, una mono infección con en 09 plantas con presencia de PToMV y 37 plantas con el virus ToBRFV; también podemos apreciar que hubo una Bi infección con 11 plantas infectadas con PToMV y ToBRFV a la vez.

Tabla 6.

Resultados del tipo de infección que se encontró de las 57 plantas analizadas

| Cantidad de plantas infectadas por virus ARN | Cebadores específicos de Virus ARN | Tipo de Infección | |
|--|---|-------------------|--------------|
| | | Mono infección | Bi infección |
| 57 (67.9%) | <i>Peru Tomato Mosaic Virus (PToMV)</i> | 9 (10.7%) | 11 (13.1%) |
| | <i>Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV)</i> | 37 (44%) | |
| | ToMV | 0 | 0 |
| | TYLCV | 0 | 0 |
| | ToLDeV | 0 | 0 |
| | ToLCD | 0 | 0 |

Respuesta al objetivo 02

Los resultados de la tabla 7 apreciamos la presencia y ausencia de infección por virus en cultivares de tomate de las diferentes zonas muestreadas entre los departamentos de Lima e Ica, en donde se observò la presencia de virus en la mayor parte de los lugares a excepción de Lurín (Lima) que no presenta plantas infectadas por virus.

Tabla 7.

Resultados con presencia y ausencia de virus de los campos muestreados de tomate

| Localidad Características | Pisco | Cañete | Mala | Huacho | Pachacamac | Lurín | Total |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|----------|-----------|
| Presencia de virus | 18 | 15 | 10 | 04 | 10 | 0 | 57 |
| Ausencia de virus | 02 | 03 | 08 | 08 | 0 | 06 | 27 |
| Total | 20 | 18 | 18 | 12 | 10 | 06 | 84 |

Respuesta al Objetivo 03

La tabla 8 nos muestra los resultados con presencia y ausencia de virus encontrados en las diferentes variedades de cultivares de tomate estudiadas en esta tesis, donde la mayor cantidad de variedades presentan infección por virus, pero la variedad Arbazón es la única con ausencia de virus.

Tabla 8.

Resultados obtenidos de las infecciones por virus analizados por las diferentes variedades de tomate

| Variedad Características | Bisonte | Rex | Montesuma | Galilea | Katia | Matusalem | Runner | Pai Pai | Arbazón | Total |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Presencia de virus | 03 | 07 | 02 | 25 | 03 | 07 | 06 | 04 | 0 | 57 |
| Ausencia de virus | 0 | 02 | 01 | 07 | 03 | 08 | 0 | 0 | 06 | 27 |
| Total | 03 | 09 | 03 | 32 | 06 | 15 | 06 | 04 | 06 | 84 |

Análisis bioinformático del material genético del virus ARN secuenciado

Para lograr corroborar que los cebadores diseñados pertenecen a los virus encontrados en el estudio, nuestras muestras secuenciadas fueron comparadas con las cepas de virus ya reportadas en el GenBank del NCBI.

Según el análisis realizado se obtuvo un porcentaje de similitud de 95.7% de nuestra muestra en estudio con la cepa PToMV con código NC_004573.1 y 100% de similitud de nuestra muestra con la cepa de ToBRFV con código NC_028478.1 reportadas del NCBI. Luego, se procedió a realizar una comparación con la cepa control y con otros virus también reportados para elaborar un análisis filogenético de estos virus y comprobar que estos virus tienen una relación. Esto se puede apreciar en las figuras 3 y 4.

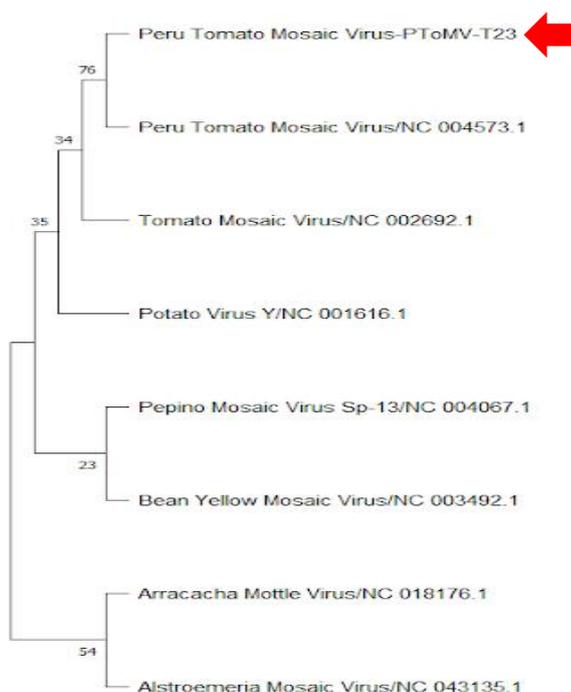


Figura 3. Elaboración de la filogenia con las secuencias de las muestras estudiadas con el virus reportado en el NCBI

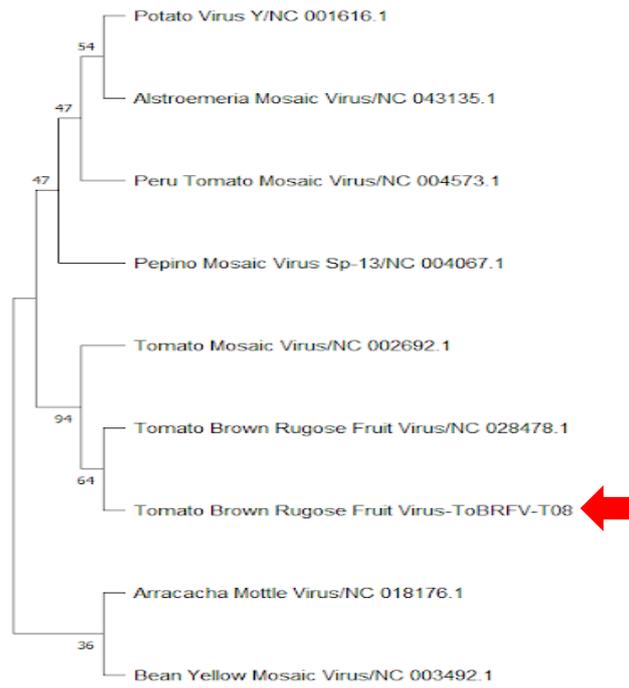


Figura 4. Elaboración de la filogenia con las secuencias de las muestras estudiadas con el virus reportado en el NCBI

Capítulo V. Discusión

5.1 Discusión de resultados

El reporte de los análisis, encontramos que la infección por *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV) está concurrente en mayor cantidad y en segunda posición encontramos al *Peru Tomato Mosaic Virus* (PToMV), lo que hace que los cultivos de tomate en el estudio tengan como patógenos principales a estos dos virus, que infectan muy fácilmente y se propaga con facilidad en la gran parte de las plantas de tomate. De acuerdo con estos resultados y los análisis bioinformáticos utilizados comprueban la presencia de estos virus en el país. En la investigación de Zhang (2022), al analizar semillas de tomate y pimiento exportadas del Perú a países europeos y norteamericanos encontraron en sus estudios al ToBRFV, pero no han sido reportados en esta parte del continente. Los estudios de Sepúlveda *et al.* (2011) en Chile y de Insuasti *et al.* (2016) en Ecuador, en donde encontraron la presencia de PToMV en plantas de tomate, lo cual nos informa que estos virus han sido estudiados en otras partes del continente, pero menos en el Perú su principal centro de origen, ya que no se encuentra un reporte oficial de este virus en el país.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre mono infecciones y biinfecciones se encuentran en las 57 plantas positivas para virus. Ya que tal como menciona Syller (2012), las monoinfecciones son muy comunes, pero las bi infecciones o infecciones mixtas son poco encontradas, este tipo de infecciones dan lugar a una gran variedad de interacciones virus-virus dentro del huésped. Algunos pueden resultar en la generación de variantes que muestran nuevas características genéticas y por lo tanto cambien la estructura genómica de las diversas variedades de los virus, y en consecuencia causar problemas para el desarrollo de métodos de control eficientes. Como destacan Rentería-Canett *et al.* (2011), el número de informes sobre infección mixta se ha incrementado recientemente, lo que proporciona un conocimiento valioso que puede ser útil en el control de enfermedades complejas. Hasta el momento Zhang (2022), no informa que solo se han observado interacciones sinérgicas en infecciones mixtas relacionadas con ToBRFV con otros virus que no resultaron positivos en el estudio.

Los resultados mostrados de los análisis de los seis campos de tomate muestreados en el cual encontramos infección en cinco de ellos, a comparación del estudio realizado por Llacza (2019) en donde solo logró identificar virus en la zona de La libertad del total de sus tres

zonas estudiadas; tampoco encontró presencia en el distrito de Lurín (Lima), donde al igual que este estudio no pudo encontrar ningún virus.

Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- De las 84 plantas de tomate que presentaron sintomatología por infección viral en campo, se corroboró la presencia por ensayos de biología molecular por RT-PCR; resultaron positivas 57 plantas para los virus PToMV y ToBRFV.
- Se realizó la estandarización de un protocolo de colecta de hojas para evitar la degradación del ARN de los virus, ya que la calidad del ARN influye mucho en los análisis posteriores.
- Se logró estandarizar un protocolo de tiempo y temperatura en el proceso del termociclador.
- Se logró una identificación mediante secuenciación nucleotídica de los virus ARN que infectan al tomate.

6.2 Recomendaciones

- Se sugiere continuar los estudios con el fin de establecer un mapa de presencia de estos virus en las zonas agrícolas donde se cultivan tomate en todo el país, además de realizar más estudios en la zona de Lurín, ya que es un punto donde no se encontraron infección por virus, no solo en esta investigación sino en otras ya reportadas.
- Realizar futuros trabajos a nivel de genómica de los virus, ya que se cuenta con stock de tejido vegetal.
- Realizar investigaciones de identificación molecular de virus que dañan a otros cultivos vegetales de consumo humano en nuestro país.

Capítulo VII. Referencias

7.1 Fuentes bibliográficas

- Adams, I. & Fox, A. (2016). Diagnosis of plant viruses using next-generation sequencing and metagenomic analysis. *Current Research Topics in Plant Virology*. 323–335. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2_14
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. Florida, Estados Unidos: Academic press.
- Alfaro, A.O., Córdoba, M.C., Font, I. y Jordá, M.C. (2013). *Virosis relevantes en el cultivo del tomate. (Detección, diagnóstico y control)*. Valencia, España: Phytoma.
- Alvarez-Quinto, R.A., Cornejo-Franco, J.F. & Quito-Avila, D.F. (2017). Characterization of a not so new potexvirus from babaco (*Vasconcellea x heilbornii*). *Plos One*, 12(12). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189519>
- Baizan-Edge, A., Cock, P., MacFarlane, S., McGavin, W., Torrance, L. y Jones, S. (2019). Kodoja: A workflow for virus detection in plants using k-mer analysis of RNA-sequencing data. *Journal of General Virology*, 100(3), 533-542. doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001210>
- Barba, M., Czosnek, H. y Hadidi, A. (2014). Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*, 6(1), 106-136. doi: 10.3390/v6010106
- Bernal-Vicente, A., Donaire, L., Torre, C., Gómez-Aix, C., Sánchez-Pina, M. A., Juárez, M., Hernando, Y. y Aranda, M. A. (2018). Small RNA-Seq to Characterize Viruses Responsible of Lettuce Big Vein Disease in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-16. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03188>
- Betancourt, M.D. (2017). *Evaluación de la capacidad de infectar cultivos de tomate (Solanum lycopersicum L.) y tabaco (Nicotiana tabacum L.) de Begomovirus aislados de arvenses localizadas en el Valle del Cauca, Colombia*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Valle del Cauca, Colombia.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., Van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. y Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next

generation sequencing, *Virus Research*, 186, 20-31. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.007

- Cambra, M., Pallas, V. y Bertolini, E. (2016). Diagnóstico y detección. En: Ayllón, M. A., Cambra, M., Llave, C., y Moriones, E. (Eds.) *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides* (pp. 93-132). Madrid, España: Sociedad Española de Fitopatología.
- Carrión, C.M. (2017). *Detección temprana del Potato Yellow Vein Virus en cultivos de Solanum tuberosum L. mediante la teledetección*. (Tesis de pregrado). Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.
- Castillo, G.Y. (2019). *Identificación de virus en camote (Ipomoea batatas (L.) Lam.) y tomate (Solanum lycopersicum L.) empleando la técnica de PCR*. (Tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Córdova, M.T., Pinasco, R.G., Pizarro, G.J. y Quiñones, T.M. (2016). *Planeamiento estratégico del tomate en el Perú*. (Tesis de Maestría). Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú.
- Chalupowicz, L., Dombrowsky, A., Gaba, V., Luria, N., Reuven, M., Beerman, A., Lachman, O., Dror, O., Nissan, G. & Manulis-Sasson, S. (2019). Diagnosis of plant diseases using the Nanopore sequencing platform. *Plant Pathology*, 68(2), 229-238. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12957>
- De Souza, J.A. (2020). *Caracterización molecular de un nuevo nepovirus encontrado en papa (Solanum tuberosum L.) mediante la tecnología de secuenciación profunda (Deep Sequencing)* (tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru.
- De Souza, J.A. (2021). *Caracterización molecular de secuencias asociadas a virus provenientes de arracacha (Arracacia xanthorrhiza Bancroft) y su detección en papa* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Flygare, S., Simmon, K., Miller, C., Qiao, Y., Kennedy, B., Di Sera, T., Graf, E.H., Tardif, K. D., Kapusta, A., Ryneerson, S., Stockmann, C., Queen, K., Tong, S., Voelkerding, K.V., Blaschke, A., Byington, C.L., Jain, S., Pavia, A., Ampofo, K., Eilbeck, K., Marth, G., Yandell, M. & Schlaberg, R. (2016). Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and

host mRNA expression profiling. *Genome Biology*, 17(1), 111. doi: 10.1186/s13059-016-0969-1

Gálvez, M.E. (2015). *Caracterización molecular de tres aislamientos de Sweet Potato Leaf Curl Virus y sinergismo con el Sweet Potato Chlorotic Stunt Virus*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Gambino, G. & Gribaudo, I. (2006). Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Virology*, 96(11), 1223-1229. doi: 10.1094/PHYTO-96-1223

Gergerich, R.C. & Dolja, V.V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *Advances in Microbiology*, 4(9). doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01

González, M.J. (2016). *Estandarización de técnicas moleculares (RT-PCR E IC-RT-PCR) para el diagnóstico de infección por los principales virus que atacan a las uvas pisqueras del Perú*. (Tesis de maestría). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

González, L.F. (2020). *Detección y distribución Espacio-Temporal del Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) en invernaderos comerciales de tomate (Solanum lycopersicum)*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Occidente, Sinaloa, México.

Gonzales, L.E. (2021). *Detección y caracterización del virus meridional del tomate (STV)*. (Tesis de doctorado). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

González-Garza, R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 591-610. doi: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-1>.

Ho, T. y Tzanetakis, I. E. (2014). Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing. *Virology Academic Press*, 471-473, 54-60.

Hull, R. (2014). *Plant Virology*. Oxford, Reino Unido: Elsevier.

Insuasti, M.L., Ochoa, J.B., Martin, R.R., Alvarez, R.A. & Quito-Avila, D.F. (2016). First Report of *Potato virus V* and *Peru tomato mosaic virus* on Tamarillo (*Solanum*

betaceum) Orchards of Ecuador. *Plant Disease*, 100(4). doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1063-PDN>

Jaramillo, J., Rodríguez, V.P., Guzmán, M., Zapata, M. y Rengifo, T. (2007). *Manual técnico de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Bajo condiciones protegidas en la producción de tomate*. Medellín, Colombia: CTP Print Ltda.

Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P.A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K. & Studholme, D.J. (2015). Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular Detection and Quantification*. 3, 1-8. doi: 10.1016/j.bdq.2015.02.001

Llacza, S.L. (2019). *Caracterización molecular de un Begomovirus en tomate (Lycopersicon esculentum Mill) en costa y selva del Perú*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú.

Loebenstein, G. (2009). Plant Virus Diseases: Economic Aspects. En: Mahy, B.W. & Van Regenmortel, M.H. (Eds.). Desk encyclopedia of plant and fungal virology (pp. 426-430). Oxford, Reino Unido: Elsevier.

Lotos, L., Efthimiou, K., Maliogka, V.I. & Katis, N. I. (2014). Generic detection of poleroviruses using an RT-PCR assay targeting the RdRp coding sequence. *Journal of Virological Methods*. 198, 1-11. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.12.007

Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., ... Dombrovsky, A. (2017). A new Israeli tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-2 2 resistance genes. *PLoS ONE* 12(1): e0170429. doi: 10.1371/journal.pone.0170429

Maliogka, V.I., Minafra, A., Saldarelli, P., Ruiz-García, A.B., Glasa, M., Katis, N., & Olmos, A. (2018). Recent advances on detection and characterization of fruit tree viruses using high-throughput sequencing technologies. *Viruses*, 10(8), 1-23. doi: 10.3390/v10080436

MIDAGRI (2022). *Boletín estadístico mensual: El agro en Cifras*. Lima, Perú: biblioteca Nacional del Perú.

Ministerio del Ambiente (MINAM) (2020). *Línea de base de la diversidad del tomate peruano con fines de bioseguridad*. Lima, Perú: Ministerio del Ambiente.

- Mishchenko, L., Dunich, A., Molodchenkova, O. & Hlushchenko, L. (2021). First report of cherry leaf roll virus from *Sambucus nigra* in Ukraine. *Journal Plant Pathology*, 103, 1077
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J. & Barker, I. (2006). Advances in molecular phytodiagnosics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), 1-19. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9037-0>
- Naidu, R.A. & Hughes, J.D.A. (2003). Methods for the detection of plant virus diseases. In *Plant Virology in Sub-Saharan Africa: Proceedings of a Conference Organized by IITA: 4-8 June 2001, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria* (p. 233). IITA.
- Nassuth, A., Pollari, E., Helmeczy, K., Stewart, S. & Kofalvi, S. (2000). Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *Journal of Virological Methods*, 90(1), 37–49. doi: 10.1016/s0166-0934(00)00211-1
- Nisbet, C., Monger, W. A., Ross, S., Holmes, R. F., Nova, Y., Thomson, C., Goodfellow, H. A., Lacomme, C. & Jeffries, C.J. (2019). Biological and molecular characterization of *Potato Yellow Blotch Virus*, a new species of the genus Potyvirus. *Plant Pathology*, 68(2), 251-260. doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12943>
- Nuño, R., Ponce, J.F., Hernández, C., & Machain, G.M. (2007). *Manual de producción de tomate rojo bajo condiciones de invernadero para el valle de Mexicali, Baja California*.
- Olmos, A., Bertolini, E. & Cambra, M. (2002). Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106(1), 51-59. doi: 10.1016/s0166-0934(02)00132-5
- Olmos, A., Yuste, A. y Bertolini, E. (2016) Nuevas tecnologías en virología vegetal. En: Ayllón, M. A., Cambra, M., Llave, C., y Moriones, E. (Eds.) *Enfermedades de*

plantas causadas por virus y viroides (pp. 415-438). Madrid, España: Sociedad Española de Fitopatología.

- Peralta, I. & Spooner, D. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). En: Razdan, M.K. & Mattoo, A.K. (Eds.), *Genetic Improvement of Solanaceous Crops, Volume 2: Tomato* (pp. 1-24). Enfield, Estados Unidos: Science Publishers.
- Peralta, I., Spooner, D. & Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, 84, 1-186.
- Radford, A. D., Chapman, D., Dixon, L., Chantrey, J., Darby, A. C. y Hall, N. (2012). Application of next-generation sequencing technologies in virology. *Journal of General Virology*, 93. 1853-1868. doi: 10.1099/vir.0.043182-0
- Raiola, A., Rigano, M.M., Calafiore, R., Frusciante, L. & Barone, A. (2014). Enhancing the human- promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Hindawi Publishing Corporation, 2014*. doi: 10.1155/2014/139873
- Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., Knaap, E. & Caicedo, A. (2020). Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1118-1132. doi: 10.1093/molbev/msz297
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R. % Rivera-Bustamante, R.F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal* 8(104). doi:10.1186/1743-422X-8-104.
- Saldaña, C.L., Cancan, J.D., Cruz, W., Correa, M.Y., Ramos, M., Cuellar, E. & Arbizu, C.I. (2021). Genetic Diversity and Population Structure of Capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth.) from the Peruvian Amazon Revealed by RAPD Markers. *Forests*, 12, 1125. doi: <https://doi.org/10.3390/f12081125>
- Sánchez-Navarro, J.A., Cooper, C.N. & Pallás, V. (2018). Polyvalent Detection of Members of the Genus Potyvirus by Molecular Hybridization Using a Genus-Probe.

Virology, 108(12), 1522-1529. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0146-R>

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463

Särkinen, T., Baden, M., Gonzales, P., Cueva, M., Giacomn, L., Spooner, D., Simon, R., Juárez, H., Nina, P., Molina, J. y Knapp, S. (2015). Listado anotado de *Solanum L.* (Solanácea) en el Perú. *Revista Peruana de Biología*, 22(1). doi: <https://doi.org/10.15381/rpb.v22i1.11121>.

Sepúlveda R., P. (ed.) 2011. Virus transmitidos por insectos vectores en tomate en la Región de Arica y Parinacota: situación actual y manejo. 64 p. Boletín INIA No 224. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Investigación Agropecuaria del Desierto y Altiplano, Ururi. Arica, Chile.

Sierra-Muñoz, J.C., Siquieros-Delgado, M.E., Flores-Ancira, E., Moreno-Rico, O. y Arredondo-Figueroa, J.L. (2015). Riqueza y distribución de la familia Solanácea en el estado de Aguascalientes. *Botanical Sciences*, 93(1), 97-117. doi: 10.17129/botsci.63

Sociedad Española de Fitopatología (SEF) (2020). *Control de enfermedades de plantas*. Madrid, España: Hélice.

Syller, J. (2012) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13(2): 204– 216. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00734.x

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197

Torre, C. (2019). *Detección y Caracterización de Virus Epidemiológicamente Relevantes en Cultivos de Tomate y Cucurbitáceas*. (Tesis de doctorado). Universidad de Murcia, Murcia, España.

- Wu, Z., Sun, S., Wang, F., & Guo, D. (2011). Establishment of regeneration and transformation system of *Lycopersicon esculentum* MicroTom. *Biotechnology Journal International*, 1(3), 53-60. doi: 10.9734/BBJ/2011/356
- Zhang, S., Griffiths, J.S., Marchand, G., Bernards, M.A., & Wang, A. (2022). Tomato brown rugose fruit virus: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. *Molecular Plant Pathology*. 23(9), 1262-1277. 10.1111/mpp.13229
- Zheng, Y., Gao, S., Padmanabhan, C., Li, R., Galvez, M., Gutierrez, D., Fuentes, S., Ling, K.S., Kreuze J, Fei Z. (2016). VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. *Virology*. 500, 130-138. doi: 10.1016/j.virol.2016.10.017

7.2 fuentes electrónicas

- Baskins, S., Bond, J. & Minor, T. (2019). Unpacking the Growth in Per Capita Availability of Fresh Market Tomatoes. *Electronic Outlook Report from the Economic Research Service*. Recuperado de: <https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/92442/vgs-19c-01.pdf?v=430.5>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2021). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. División estadística – FAOSTAT. Roma Recuperado de: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- FAOSTAT, (2022). *Cultivos y productos de ganadería*. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). Roma, Italia. Recuperado de: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Hortoinfo (2017). Informe Tomate. Diario Digital de Actualidad Hortofrutícola. Almería, España. Recuperado de: <https://hortoinfo.es/informe-cultivo-tomate/>
- Jones, J.P., Ziller, T.A., Momol, T.M., y Miller, S.A. (2015). Disease of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *The American Phytopathological Society (APS)*. Recuperado de: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Tomato.aspx>
- Requena, A.M., Requena, M.E., Ezziyyani, M., Candela, M.E. y Egea-Gilabert, C. (2022). Virosis en los principales cultivos hortícolas de la región Murcia. *InfoAgro*.

Recuperado de:
https://www.infoagro.com/hortalizas/virus_hortícolas_murcia.htm

Stevens, P.F. (2017). Angiosperm Phylogeny Website. Recuperado de:
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Anexos

A continuación, se muestran las evidencias del trabajo de investigación desarrollado, así como documentos, fotografías y cuadros pertinentes.

Anexo 1

Fotografía de la zona de muestreo



Figura 1. Campo de Tomate en la Localidad de Pisco - Ica.

Anexo 2

Fotografía de los frutos de tomate



Figura 2. Frutos de tomate con daños por maduración irregular producto del virus.

Anexo 3

Fotografía de las hojas de las muestras de tomate con daño ocasionado por virus



Figura 3. Hojas con sintomatología viral A. Mosaico, necrosis y enrollamiento en las hojas B. Mosaico y clorosis de la hoja y C. Mosaico y deformación de la hoja.

Anexo 4

Fotografía de la recolección de muestras de las hojas de cultivares de tomate



Figura 4. Muestreo de plantaciones de tomate con sintomatología viral.

Anexo 5

Fotografía del procesamiento de las muestras



Figura 5. Molienda del tejido vegetal con nitrógeno líquido.

Anexo 6

Fotografía de la procesamiento de las muestras de tomate



Figura 6. Extracción de material genético total de las muestras de tomate.

Anexo 7

Fotografía del gel de agarosa con muestras de ARN

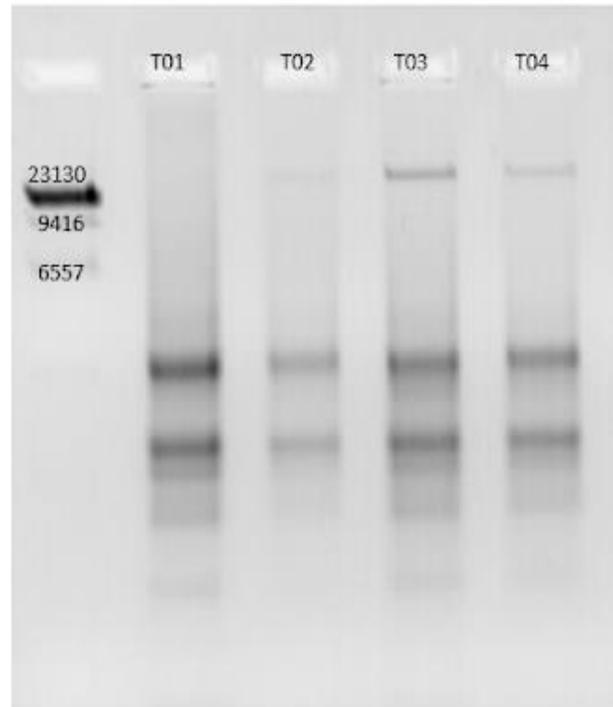


Figura 7. Gel de agarosa con muestras de la extracción de ARN totales de la planta de tomate.

Anexo 8

Fotografía del gel de agarosa con muestras de los amplificados de ToBRFV

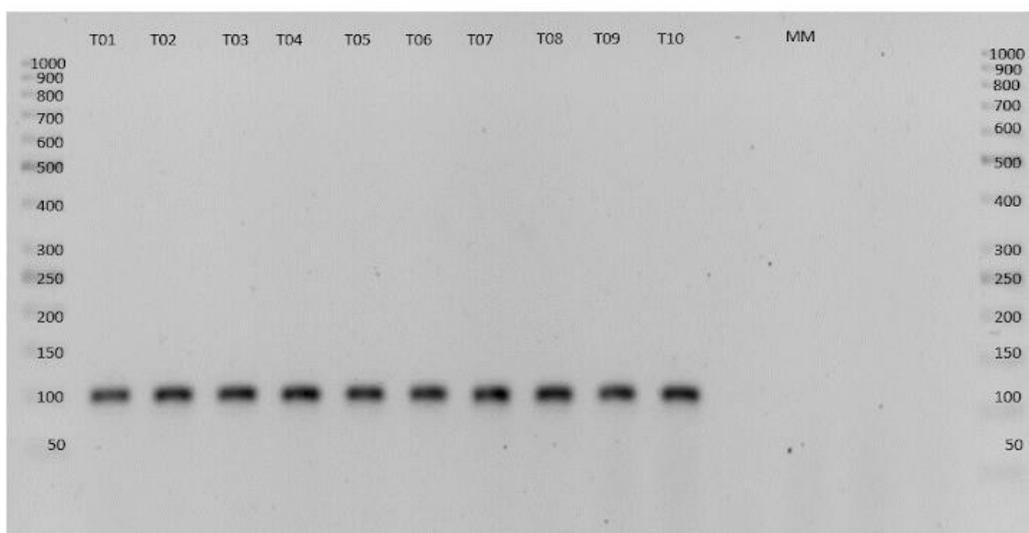


Figura 8. Gel de agarosa con muestra positiva para ToBRFV.

Anexo 9

Tabla 1.

Datos del muestreo de tomate en los diferentes campos de cultivo y los resultados del análisis molecular.

| Lugar de muestreo | Plantas colectadas | Ubicación GPS | Variedades | Sintomatología de la planta |
|-------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------|---|
| Pisco (Ica) | 20 | S-13.752624, W-76.174181 | Galilea | Mosaico, enrollamiento, necrosis, deformación de la hoja y maduración irregular de frutos |
| Cañete (Lima) | 18 | S-13.016564, W -76.416802 | Bisonte, Rex y Matusalem | Mosaico, enrollamiento, necrosis, amarillamiento y deformación de la hoja |
| Mala (Lima) | 18 | S -12.606664, W-76.65509 | Galilea y Katia | Mosaico, amarillamiento, enrollamiento, necrosis, deformación de la hoja y maduración irregular de frutos |
| Huacho (Lima) | 12 | S -11.198441, W -77.561498 | Matusalén | Mosaico, amarillamiento, enrollamiento, necrosis y deformación de la hoja |
| Pachacamac (Lima) | 10 | S -12.174893, W-76.863232 | Runner y Pai Pai | Mosaico, enrollamiento, amarillamiento, necrosis, deformación de la hoja y maduración irregular de frutos |
| Lurín (Lima) | 6 | S -12.249072, W -76.871026 | Arbazón | Mosaico, necrosis, amarillamiento y deformación de la hoja |

Anexo 10

De las diferentes zonas muestreadas de la costa del país se observó la prevalencia de los virus PToMV y ToBRFV los cuales fueron prevalentes en la gran parte de las variedades de tomate siendo una variedad totalmente negativa a la totalidad de virus.

Tabla 2.

Resultados obtenidos de los virus encontrados por las diferentes zonas de muestreo de los campos de tomate en Ica y Lima

| Virus | Pisco | Cañete | Mala | Huacho | Pachacamac | Lurín |
|---|-------|--------|------|--------|------------|-------|
| <i>Peru Tomato Mosaic Virus (PToMV)</i> | - | + | + | + | - | - |
| <i>Tomato Mosaic Virus (ToMV)</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>Tomato yellow leaf curl Virus (TYLCV)</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV)</i> | + | + | + | + | + | - |
| <i>Tomato Leaf Deformation Virus (ToLDeV)</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>Tomato Leaf Curl Disease Virus (ToLCD)</i> | - | - | - | - | - | - |

Anexo 11

Tabla 8.

Resultados obtenidos de la infección por virus encontrados en las diferentes variedades de tomates analizados.

| Virus | Bisonte | Rex | Montesuma | Galilea | Katia | Matusalem | Runner | Pai Pai | Arbazón |
|---|---------|-----|-----------|---------|-------|-----------|--------|---------|---------|
| <i>Peru Tomato Mosaic Virus (PToMV)</i> | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>Tomato Mosaic Virus (ToMV)</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Tomato yellow leaf curl Virus (TYLCV)</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV)</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>Tomato Leaf Deformation Virus (ToLDeV)</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Tomato Leaf Curl Disease Virus (ToLCD)</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Anexo 12

Cromatograma de muestras de *Peru Tomato Mosaic Virus (PToMV)*

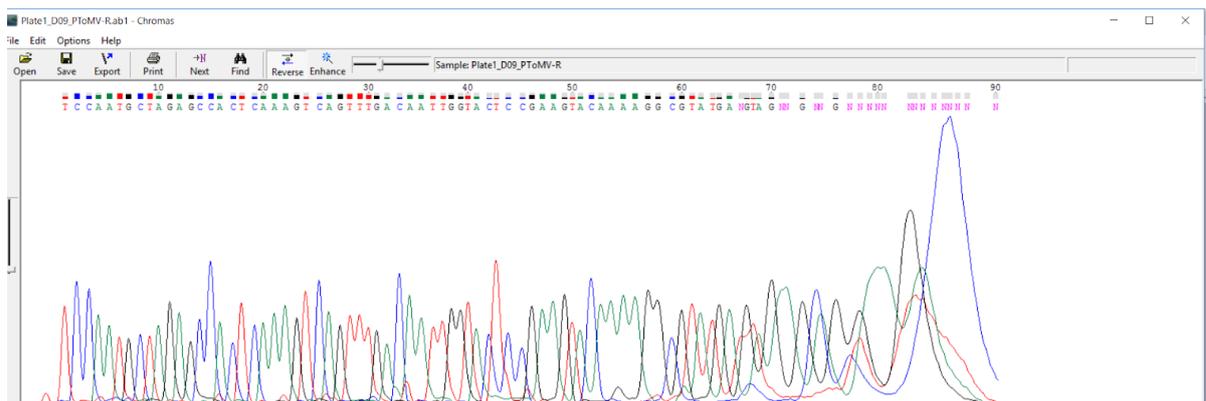


Figura 9. Cromatograma del virus PToMV

Anexo 13

Cromatograma de muestras de ToBRFV

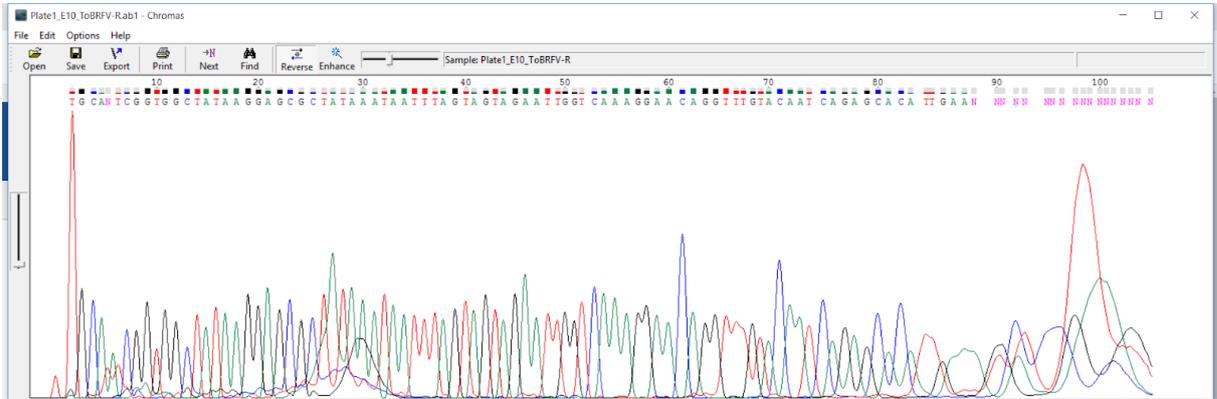


Figura 10. Cromatograma del virus ToBRFV

Anexo 14

| | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|-------------------------------------|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|--|
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato mosaic virus isolate Cuzqueno2 polyprotein mRNA, partial cds | 114 | 114 | 77% | 1e-21 | 95.71% | gij183229352 EU495235.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Peru tomato mosaic virus complete genome | 114 | 114 | 77% | 1e-21 | 95.71% | gij28460475 AJ437280.1 |
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato virus partial gene for polyprotein_3' end genomic RNA isolate Z1 | 102 | 102 | 75% | 8e-18 | 92.65% | gij38322967 AJ516016.1 |
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato virus partial gene for polyprotein_3' end genomic RNA isolate V2 | 93.3 | 93.3 | 75% | 4e-15 | 89.71% | gij38322965 AJ516015.1 |
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato virus proviral partial cp gene for coat protein isolate TM | 88.7 | 88.7 | 75% | 2e-13 | 88.24% | gij56310550 AJ616024.1 |
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato virus proviral partial cp gene for coat protein isolate LS6 | 88.7 | 88.7 | 75% | 2e-13 | 88.24% | gij54019630 AJ616023.1 |
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato virus proviral partial cp gene for coat protein isolate LS1 | 88.7 | 88.7 | 75% | 2e-13 | 88.24% | gij54019628 AJ616022.1 |
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato mosaic virus isolate Ca_Sal polyprotein gene, complete cds | 83.3 | 83.3 | 77% | 8e-12 | 85.71% | gij2026531550 MW291539.1 |
| <input type="checkbox"/> | Potato virus V isolate Cus098, complete genome | 70.7 | 70.7 | 75% | 5e-08 | 82.35% | gij2246382265 MZ503954.1 |
| <input type="checkbox"/> | Ecuadorian rocoto virus isolate Rocoto polyprotein mRNA, partial cds | 70.7 | 70.7 | 75% | 5e-08 | 82.35% | gij183229350 EU495234.1 |
| <input type="checkbox"/> | Peru tomato virus gene for polyprotein_genomic RNA isolate PPK11 | 70.7 | 70.7 | 75% | 5e-08 | 82.35% | gij38322959 AJ516010.1 |
| <input type="checkbox"/> | Potato virus V isolate Apu069, complete genome | 66.2 | 66.2 | 75% | 6e-07 | 80.88% | gij2246382215 MZ503929.1 |
| <input type="checkbox"/> | Brugmansia mosaic virus gene for coat protein partial cds isolate SW | 64.4 | 64.4 | 72% | 2e-06 | 81.54% | gij540344323 AB851482.1 |
| <input type="checkbox"/> | Brugmansia mosaic virus strain SK complete genome | 64.4 | 64.4 | 72% | 2e-06 | 81.54% | gij440463100 JX867236.1 |
| <input type="checkbox"/> | Brugmansia mosaic virus isolate D-437 complete genome | 55.4 | 55.4 | 55% | 0.001 | 84.00% | gij444246412 JX874139.1 |
| <input type="checkbox"/> | Potato virus V polyprotein gene, partial cds | 52.7 | 52.7 | 75% | 0.013 | 76.47% | gij41352828 AY521595.1 |
| <input type="checkbox"/> | Zucchini tigre mosaic virus isolate HFL complete genome | 50.9 | 50.9 | 33% | 0.046 | 96.67% | gij1280074262 MF362994.1 |
| <input type="checkbox"/> | Zucchini tigre mosaic virus isolate Q10 complete genome | 50.9 | 50.9 | 33% | 0.046 | 96.67% | gij551702279 KC345605.1 |
| <input type="checkbox"/> | Zucchini tigre mosaic virus isolate VET-041 polyprotein gene partial cds | 50.9 | 50.9 | 33% | 0.046 | 96.67% | gij551702199 KC345565.1 |
| <input type="checkbox"/> | Zucchini tigre mosaic virus isolate GP98-44 polyprotein gene partial cds | 50.9 | 50.9 | 33% | 0.046 | 96.67% | gij551702189 KC345560.1 |
| <input type="checkbox"/> | Squash chlorosis mottling virus isolate HFL polyprotein gene partial cds | 50.9 | 50.9 | 33% | 0.046 | 96.67% | gij509523655 KC522968.1 |

Figura 11. Se observan las secuencias alineadas con BLAST del virus PToMV comparado con virus ya reportados en el GenBank del NCBI con un 95.71% de identidad.

Anexo 15

| Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results | | | | | | | |
|---|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|--|
| | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate Zar-Kp coat protein (CP) gene, compl | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2385384960 OM386673.2 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate JoNS-Soln, partial genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2312657949 OP009342.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate Jol-F-2022 coat protein gene, partial c | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2311047298 OM807073.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate Mex2_26r, partial genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2305988293 OK339579.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate Tom-BA21, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2289973204 OK624678.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41903150, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445772 OM515272.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41849131, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445767 OM515271.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 33613331, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445762 OM515270.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 38665691, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445757 OM515269.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41903222, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445752 OM515268.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41903230, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445747 OM515267.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41106995, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445742 OM515266.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 6165965, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445737 OM515265.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41903353, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445732 OM515264.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 40002318, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445727 OM515263.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 39474756, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445717 OM515261.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 40002270, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445712 OM515260.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 40002289, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445707 OM515259.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41108421, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445702 OM515258.1 |
| <input type="checkbox"/> | Tomato brown rugose fruit virus isolate 41108448, complete genome | 143 | 143 | 74% | 4e-30 | 100.00% | gii2201445697 OM515257.1 |

Figura 12. Se observan las secuencias alineadas con BLAST de ToBRFV con virus ya reportados en el GenBank del NCBI con 100% de identidad.