UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CARRERA DE AGRONOMÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

ESPECIALIDAD:

INVESTIGACIÓN CIENTIFICA

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRONÓMO

TEMA:

"CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y SEROLÓGICA DE AISLAMIENTOS VIRALES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum L.*) EN EL VALLE DEL RÍO PORTOVIEJO"

MODALIDAD:

TRABAJO CÍENTIFICO

AUTORES:

MOREIRA MERA ALEXANDER LEONEL

INTRIAGO CEDEÑO SILVIA MARIELA

DIRECTOR:

ING. MILTON PINOARGOTE CHÉRREZ MG. EDS.

SANTA ANA – MANABÍ – ECUADOR

2016

UNIVERSIDAD TECNICA DE MANABI

FACULTAD DE INGENIERIA AGRONOMICA

Título: Caracterización biológica y serológica de aislamientos virales que afectan el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en el Valle del río Portoviejo.

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del Tribunal de Revisión y Evaluación de Trabajo de Titulación y Legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRONOMO

APROBADO POR:

Ing. Sixto Clemente Muñoz Zambrano Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Ariolfo Leonardo Solís Bowen Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Caridad Antonio Torres García

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN

Ingeniero Agrónomo

MILTON PINOARGOTE CHÉRREZ Mg. EDS.

Certifica

Que el trabajo de titulación **"Caracterización biológica y serológica de aislamientos virales que afectan el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en el Valle del río Portoviejo",** es trabajo original de los egresados, Silvia Mariela Intriago Cedeño y Alexander Leonel Moreira Mera, el cual fue realizado bajo mi dirección.

Ing. Milton Pinoargote Chérrez Mg. EDS.

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

DEDICATORIA

Esta meta cumplida en mi vida se la dedico en primer lugar a Dios, por todas sus bendiciones, y guiarme siempre por el camino del bien y permitir culminar mi carrera.

A mis padres, Sr. Plutarco Monserrate Moreira Pinargote y la Sra. Carmen Charito Mera Pinargote ya que este éxito es gracias a ellos por sus consejos y apoyo incondicional siempre y por ellos es quien soy en la actualidad.

A mis hermanos, por su paciencia y siempre tuvieron apoyándome en mis trabajos y proyectos a cumplir.

A mis familiares y amigos que de una u otra manera contribuyeron durante el proceso de mi formación académica.

Atentamente

Alexander Moreira

DEDICATORIA

La presente investigación está dedicada a Dios, a mis padres, mis hermanos, mi marido y mi familia, ya que en conjunto me han dado la fortaleza y la perseverancia de seguir adelante con humildad.

A Dios, por iluminar mi mente, colmar de bendiciones mi vida y guiarme siempre por el camino del bien.

A mis padres, por ser el pilar fundamental de mi vida inculcándome valores que hoy en día son parte de mi formación profesional y personal, por ser mi inspiración para todo lo que hago, por su ayuda incondicional y por el coraje de apoyarme hasta el final sin desmayar.

A mis hermanos, por compartir mis alegrías, sueños y por sus consejos en momentos difíciles.

A mi marido, por ser la persona que complementa mi vida, por sus consejos, por sus esfuerzos, por la lucha que emprendió conmigo para llegar hasta la meta propuesta.

A mis familiares, que me apoyaron desinteresadamente, sin pedir nada a cambio y me extendieron su mano para seguir adelante en este difícil pero no imposible camino.

Atentamente

Mariela Intriago

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, por ser parte de la formación académica inculcada durante el periodo que estuvimos en la institución.

Al Ing. Bertín Vélez Olmedo, por ser el precursor de que se realizara este estudio, por creer en nosotros y ayudarnos a solucionar problemas en todo momento.

A nuestro tutor el Ing. Milton Pinoargote por el aporte de sus conocimientos y guiarnos con sus consejos y subgerencias a la investigación.

A nuestro revisor, el Ing. Ricardo Fundora por sus sabios consejos y apoyo al trabajo.

Al Ing. Roger Torres que fue el apoyo fundamental al momento de realizar las pruebas en los laboratorios, que con sus conocimientos oporto en gran parte a nuestra investigación.

En general a todos los Ingenieros que de una u otra manera nos ayudaron en diferentes ocasiones y aportaron con un granito de arena para nuestra investigación.

La responsabilidad de las investigaciones, resultados y conclusiones, corresponden exclusivamente al autor.

Intriago Cedeño Silvia Mariela

La responsabilidad de las investigaciones, resultados y conclusiones, corresponden exclusivamente al autor.

Moreira Mera Alexander Leone

INDICE GENERAL **PAG.**

RESUMEN 1

SUMMARY 2

I. INTRODUCCIÓN 3

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 4

III. ANTECEDENTES 5

IV. JUSTIFICACIÓN 6

V. OBJETIVOS 7

VI. REVISIÓN LITERARIA 8

6.1. Importancia del cultivo de tomate 8

6.2. ¿Qué es un virus? 9

6.3. Enfermedades causadas por virus 9

6.5. Identificación de virus 10

6.6. Técnicas serológicas 10

6.7. Virus que afectan *Solanum lycopersicum* 10

6.8. Potato Virus Y (PVY) 11

6.8.1. Descripción 11

6.8.2. Sintomatología 11

6.8.3. Especies de diagnóstico 11

6.9. *Potato Virus X* (PVX) 12

6.9.1. Descripción 12

6.9.2. Sintomatología 12

6.9.3. Especies de diagnóstico 12

6.10. *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) 13

6.10.1. Descripción 13

6.10.2. Sintomatología 13

6.10.3. Especies de diagnóstico 13

6.11. *Tobacco Ringspot Virus* (TRSV) 14

6.11.1. Descripción 14

6.11.2. Sintomatología 14

6.11.3. Especies de diagnóstico 14

6.12. Cultivares comerciales 15

6.12.1. Híbrido Miramar 15

6.12.2. Híbrido Pietro 15
6.13. Materiales de laboratorio 15
6.13.1. Tubos Eppendorf 15
6.13.2. Matraz Erlenmeyer 16
6.13.3. Vaso de precipitado 16
6.13.4. Guantes de látex 16
6.13.5. Guantes de nitrillo 16
6.13.6. Micropipetas 16
6.13.7. Rack para 100 puntas 17
6.13.8. Soporte para micropipetas carrusel 17
VII. DISEÑO METODOLÓGICO 18
7.1. Ubicación del ensayo 18
7.2. Producción de plantas indicadoras 18
7.3. Recolección de muestras y obtención del inóculo 18
7.4. Caracterización biológica 19
7.5. Análisis serológico 20
7.5.1. Purificación, conjugación y titulación de las Inmunoglobulinas 20
7.6. Inoculaciones en cultivares comerciales 21
VIII. RESULTADOS 22
8.1. Selección de aislamientos de las inoculaciones preliminares 22
8.2. Caracterización biológica 22
8.3. Caracterización serológica 27
8.4. Determinación de la validación de la resistencia de los híbridos comerciales Pietro y Miramar 27
8.5. Implementación y dotación de materiales para el laboratorio de Fitopatología. 28
IX. DISCUSIÓN 29
X. CONCLUSIONES 31
XI. RECOMENDACIONES 32
XII. CRONOGRAMA 33
XIII. PRESUPUESTO DE LA INVESTIGACIÓN 34
XIV. BIBLIOGRAFIA 36
ANEXOS 40

INDICE DE CUADROS PAG.

Cuadro 1. Síntomas en plantas indicadoras inoculadas de 11 aislamientos en caracterización biológica 24

Cuadro 2. Caracterización serológica de 11 aislamientos mediante DAS-ELIS... 27

Cuadro 3. Costos de implementación y dotación de materiales de laboratorio de Fitopatología. 28

Cuadro 4. Actividades generales..... 33

Cuadro 5. Actividades y costo de la investigación..... 34

INDICE DE FIGURAS PAG.

Figura 1. N occidentalis. A) Mosaico suave, ampolladuras y Lesiones necróticas en la parte apical con los aislamientos Co-C2-M2, Ev-C1-M3. B) Mosaico suave, hojas filiformes, ampolladuras y deformación de las mismas con los aislamientos Co-C2-M2, Co-C3-M1, Co-C3-M3, Ev-C1-M3, Lo-C2-M2. C y D) mosaico suave, ampollas y encrespamiento de hojas Co-C3-M1, Lo-C2-M2 E) Mosaico moderado, lesiones cloróticas pajizas con los aislamientos Cr-C1-M2, Cr-C1-M3 F) Encrespamiento de la hoja con los aislamientos Co-C3-M3, Co-C3-M4…….…..25

Figura2. N. rustica. A) mosaico moderado y anillos cloróticos, encrespamiento de hoja Cr-C1-M2, Cr-C1-M3, Ev-C1-M2, B) Mosaico suave, pequeñas ampollas y encrespamiento de hojas Ev-C1-M3, C) Mosaico suaves, anillos necróticos con centro amarillentos pajizos Co-C3-M3, D) Mosaico suave, Anillos cloróticos y encrespamiento de hoja Co-C3-M1, Ev-C1-M2, N. tabaco cv. White burley. E) Lesiones pajizas y puntuaciones cloróticas, mosaico suave en Co-C2-M1, Co-C3-M1, Co-C3-M3, Co-C3-M4, Cr-C1-M2, Ev-C1-M2…….…….....26

INDICE DE ANEXOS PAG.

Anexo 1. Muestras de *Solanum lycopersicum,* recolectadas en las zonas productoras del Valle del Río Portoviejo. 41

Anexo 2. Mapa de las zonas productoras de Portoviejo donde fueron recolectadas las muestras…….....42

Anexo 3. Adecuación del ambiente controlado..... 43

Anexo 4. Preparación del sustrato para trasplante de especies indicadoras. 43

Anexo 5. Esterilización del sustrato para el trasplante..... 44

Anexo 6. Preparación de semilleros para las especies indicadoras..... 44

Anexo 7. Trasplante de las plantas indicadoras. 45

Anexo 8. Recolección de muestras en los diferentes campos de cultivos de tomate. 45

Anexo 9. Inoculación de muestras en las plantas indicadoras. 46

Anexo 10. Obtención y mantenimiento de aislamientos. 46

Anexo 11. Caracterización serológica y lectura de placas. 47

Anexo 12. Inoculación de cultivares comerciales Miramar y Pietro. 48

Anexo 13. Implementación y dotación de materiales para el laboratorio de Fitopatología……..….49

RESUMEN

La presente investigación se realizó en una casa de vegetación a prueba de insectos y en los laboratorios de Fitopatología, Biotecnología y Biología Molecular, los dos primeros en la Facultad de Ingeniería Agronómica en Lodana – Santa Ana y el último en la Universidad Técnica de Manabí en Portoviejo. Con el objetivo de caracterizar biológica y serológicamente los virus que afectan el cultivo de tomate y validar la resistencia del híbrido Miramar y Pietro, usando 11 aislamientos obtenidos a partir de 25 muestras procedentes de campos de producción, ubicados en la parroquia Lodana (Lo) Estancia Vieja (Ev) Colón (Co) y Crucita (Cr), lugares situados en la zona de influencia del Río Portoviejo.

Los aislamientos obtenidos fueron inoculados sobre ocho especies indicadoras, las cuales fueron utilizadas para realizar la caracterización biológica inoculando tres plantas por cada especie. Para la caracterización serológica, se utilizó la técnica de conjugados enzimático-s [Double antibody sándwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA)] de Clark y Adams (1977), con los antisueros de *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Potato virus X* (PVX), *Tobacco etch virus* (TEV), *Peru tomato virus* (PTV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus (AMV)*. Por último se validó la resistencia y/o susceptibilidad del híbrido Miramar y Pietro.

Los resultados de la caracterización biológica mostraron síntomas diferentes a los reportados para virus actualmente conocidos en tomate. En la validación de resistencia, los híbridos Miramar y Pietro no mostraron síntomas cuando fueron inoculados con los aislamientos, pero las pruebas de back test, mostraron que 8 aislamientos (Co-C3-M5; Co-C2-M2; Cr-C1-M3; Co-C3-M1; Co-C3-M3; Co-C2-M1: Cr-C1-M2 y Ev-C1-M2) en el caso del híbrido Miramar y 5 aislamientos (Ev-C1-M2; Ev-C1-M3; Cr-C1-M3; Co-C3-M1; Co-C2-M1) en el caso del híbrido Pietro, infectaron en forma sistémica asintomática. Por lo anteriormente mencionado, se cree que los virus tratados en esta investigación, podrían tratarse de virus nuevos anteriormente no estudiado

SUMMARY

This research was conducted in a vegetation´s house to insect proof in the Phytopathology, Biotechnology and Molecular Biology laboratories, the first at the Faculty of Agricultural Engineering and the last at the Universidad Técnica de Manabí (Portoviejo). In order to characterize biological and serologically virus affecting pepper crops and validate the resistance of commercials hybrids Miramar and Pietro, using 11 isolates obtained from 25 samples from eight producing fields, located in Lodana (Lo) Estancia Vieja (Ev) Colón (Co) and Crucita (Cr) places in the catchment area of the River Portoviejo.

The isolates obtained were inoculated on eight indicators species, which were used to the biological characterization inoculating three plants of each species. The conjugated enzyme-s technique was used for serological characterization [Double antibody sandwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA)] Clark and Adams (1977), with antisera to *Cucumber mosaic virus* (PepMV) *Potato virus X* (PVX), *Tobacco etch virus* (TEV), *Peru tomato virus* (PTV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Alfalfa mosaic virus* (AMV), finally the resistance and / or susceptibility of commercials hybrids Miramar and Pietro was validated.

The results of the biological characterization showed different symptoms than those reported for currently known viruses in tomato. In the validation of resistance, the Miramar and Pietro hybrids, no symptoms were showed when they were inoculated with the isolates, but the back tests, showed that eight isolates (Co-C3-M5; Co-C2-M2; Cr-C1-M3; Co-C3-M1; Co-C3-M3; Co-C2-M1: Cr-C1-M2 y Ev-C1-M2) in the case of Miramar hybrid and 5 isolates (Ev-C1-M2; Ev-C1-M3; Cr-C1-M3; Co-C3-M1; Co-C2-M1) in the case of Pietro hybrid, they were infected in asymptomatic systemic form. By the above mentioned, it is believed that the virus treated in this study, could be new viruses previously unstudied.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza más cultivada en todo el mundo y la de mayor valor económico, en las últimas décadas su producción ha venido en aumento debido a su consumo en la dieta diaria y por sus altos valores nutricionales para la salud (Monardes et. al 2009). Esta hortaliza es una fuente importante de vitaminas A y C y en menor cantidad vitamina B y D, además de ser rico en aminoácidos y ácidos orgánicos (Nuez, 2001).

Esta hortaliza está vinculada favorablemente en la salud ya que reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer debido a su alto contenido de antioxidantes (Borguini y Ferraz 2009).

La producción mundial de tomate es de 211 millones de toneladas, el primer país productor es China con el 50%, le sigue India con 18 %, EE.UU con 12%, Turquía con 11% y Egipto con 9%. En Ecuador la producción es de 64 mil toneladas de las cuales 5.152 toneladas se producen en Manabí (FAO 2012; ESPAC-INEC 2012; FAOSTAT 2013).

Se conoce que las enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus, limitan la producción de esta hortaliza, causando el debilitamiento del hospedante y en algunos casos hasta la muerte, las patologías virales son problemas emergentes que si no se manejan adecuadamente pueden causar grandes pérdidas, su incidencia y severidad varía de una época a otra debido a las interrelaciones complejas que existen entre el patógeno-hospedante-vectores, fuentes de inóculo y el medio ambiente (Agrios 2005; Flaño 2013).

Diversas son las causas que pueden provocar la emergencia de estos fitopatógenos y sus vectores, como el intercambio de germoplasma, el turismo, la importación de semillas, la intensificación de los sistemas agrícolas, el incremento del uso de plaguicidas y los efectos del cambio climático (Bandyopadhyay y Frederiksen 1999).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la provincia de Manabí la demanda de tomate aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio, debido a sus múltiples usos y altos valores nutricionales que benefician la salud, actualmente existen limitantes en la producción de esta hortaliza debido a enfermedades causadas por patógenos y condiciones adversas que generan un sinnúmero de síntomas como ampolladuras, mosaico, clorosis y enanismo entre otros. Estos problemas generalmente son asociados a agentes virales los cuales han causado la destrucción de grandes extensiones de cultivo, generando pérdidas económicas considerables a lo largo del Valle del Río Portoviejo y de otras zonas donde se cultiva esta hortaliza. El poco conocimiento de parte de los agricultores y técnicos sobre las enfermedades virales ha generado un manejo inadecuado de esta problemática.

III. ANTECEDENTES

En el país el primer reporte de virosis en tomate (variedad Calace y Jefferson) fue realizado por Figueroa (1982), a partir de muestras colectadas en plantaciones ubicadas en Pimampiro-Imbabura, utilizando 18 especies indicadoras y tres métodos serológicos (látex sensibilizado, microprecipitación, inmunodifusión en gel de agar) determinó la presencia de cuatro virus*: Potato Virus X* (PVX), *Potato Virus Y* (PVY), *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) *y Tobacco Ringspot Virus* (TRSV).

Melgarejo et. al (2010) realizaron estudios a partir de muestras de tomate en Ecuador (Guayas y Santa Elena), mediante tres métodos; el primero, PCR con diferentes pares de cebadores de ADN-B degenerados; el segundo, la restricción de digestión con enzimas de análisis de moléculas de ADN circulares generados por amplificación círculo rodante (RCA) con ADN polimerasa y el tercero, el análisis de ADN gel blot de hibridación de ADN genómico total con el componente de DNA-B clonado del bipartito en condiciones de baja rigurosidad. Se determinó que a partir de muestra de tomate recolectadas en Ecuador y Perú existe la presencia de un nuevo Begomovirus único autóctono de las dos zonas investigadas denominado *Tomato leaf deformation virus* (ToLDeV), es un virus emergente que da un nuevo giro a la investigación científica.

IV. JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador y en nuestra provincia existen problemas fitosanitarios virales que afectan considerablemente el cultivo tomate, causando pérdidas significativas en la producción generando reducciones económicas a los agricultores que se dedican a este cultivo, por esta razón consideramos importante y necesario estudios que brinden información científica en el ámbito agronómico y aporten conocimiento de las mismas, ya que en la actualidad es poca la información que se encuentra referente a problemas virales.

V. OBJETIVOS

GENERAL.

- Caracterizar biológica y serológicamente aislamientos que afectan el cultivo de tomate *(Solanum lycopersicum* L.*)* en el Valle del Río Portoviejo.

ESPECIFICO.

- Establecer la sintomatología inducida en las plantas indicadoras por los aislamientos de virus que infectan *Solanum lycopersicum* L.

- Conocer el comportamiento serológico de los aislamientos, mediante el uso de DAS-ELISA.

- Validar la resistencia de dos híbridos comerciales (Pietro y Miramar) de *Solanum lycopersicum* L.

- Adecuación y dotación de materiales para el laboratorio de Fitopatología.

VI. REVISIÓN LITERARIA

6.1. Importancia del cultivo de tomate

El tomate es una planta magnoliopsida, perteneciente a la familia Solanáceae y al género Solanum, la especie *S. lycopersicum* es la especie cultivada, posee nueve especies silvestres relacionadas y es nativo de Sudamérica, todas las especies silvestres relacionadas con el tomate son originarias de la región de Chile, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, incluyendo las Islas Galápagos (Jones 2001; Vallejo 1999).

Después de la papa es la hortaliza más consumida en el mundo, tanto en fresco como procesado, se cultiva en todas las latitudes en condiciones muy variadas. La producción mundial ha progresado regularmente durante el siglo XX y se ha incrementado considerablemente en las tres últimas décadas, se estima que el 30% de los tomates producidos son destinados para la industria. Es probable que la demanda de tomate continúe aumentando, debido al crecimiento de la población humana y a la duración de conservación, que permite el transporte a larga distancia, la diversificación de los tipos varietales y los cambios alimentarios que orientan al consumidor hacia productos como esta hortaliza (Blancard 2011).

La producción de tomate en el Ecuador se lleva a cabo en varias provincias, la región Costa tuvo una producción de aproximadamente 21 mil toneladas siendo el 56% de la producción nacional, la región interandina alcanzó aproximadamente las 16 mil toneladas con el 43% y el oriente obtuvo 550 toneladas que representa el 1%, la producción del tomate en la región costa está básicamente centrada en tres provincias: Guayas, Manabí y El Oro; en la sierra tenemos principalmente a la provincia de Imbabura, seguida por Loja y Azuay, sin dejar de mencionar a las provincias del Carchi, Cañar, Chimborazo y Pichincha que también representan un porcentaje de la producción nacional (MAGAP 2011).

6.2. ¿Qué es un virus?

Los virus no son células, no matan a las plantas directamente con toxinas ni enzimas, desvían el metabolismo y se generan sustancias extrañas que alteran diversas funciones vitales que inducen el desarrollo de síntomas o también existen efectos casi imperceptibles estos son hospedantes asintomáticos (Mena 2010).

La mayoría de los virus de las plantas poseen ARN, comprendiendo cerca del 71% de especies y apenas cerca del 29 % de especies poseen ADN, hace unos años atrás el número de especies de virus de plantas con ARN llegaba al 90% y el 10% para ADN con material genético del total de especies conocidas de virus en plantas (Medeiros et. al 2015).

6.3. Enfermedades causadas por virus

Muchos virus causan síntomas característicos en sus hospedantes, y son estos síntomas los que permiten identificar rápidamente a la enfermedad y al virus. En la mayoría de los casos en los que esto no es posible, las enfermedades se diagnostican y los virus se identifican principalmente a través de pruebas de transmisión de virus a plantas hospedantes específicas mediante inoculación con la savia o a través de injerto y a veces mediante ciertos vectores como insectos, nematodos, hongos o ácaros, en el caso de virus para los cuales existen antisueros específicos, a través de la utilización de pruebas de diagnóstico serológico (Agrios 2005).

6.4. Mecanismo natural de resistencia de las plantas frente a virus

Los virus de planta son dependientes de un hospedero o un vector para sobrevivir, la eficiencia y la extensión de la propagación de la infección dependen de una planta como un factor importante para permitir que el virus sea accesible a su respectivo vector o vectores. La disponibilidad de variedades resistentes es la mejor aproximación para lograr la protección de los cultivos, pero existe la posibilidad de que otros virus o cepas virales sean capaces de superar este tipo de resistencia. Otra estrategia ha sido alterar los tiempos de cultivo para evitar la migración de los vectores, disuadir a los vectores usando coberturas y también el uso de cultivos trampa (Murphy 2006).

6.5. Identificación de virus

Dentro de los criterios para la identificación de virus se encuentran la caracterización de síntomas que inducen en el hospedante, la inoculación de plantas, pruebas serológicas y de biología molecular y la microscopia electrónica. La identificación de los virus por sintomatología no es completamente confiable debido a que dichos síntomas se pueden confundir con desordenes nutricionales o por daños causados por herbicidas u otros patógenos. Las técnicas más eficientes y confiables son las serológicas como ELISA y las de biología molecular como PCR y RT-PCR (Pérez y Rico 2004).

Actualmente la mezcla de virus ha aumentado considerablemente causando una variación de síntomas los cuales pueden confundirse al momento de la identificación de algún virus, este hecho es bastante frecuente de encontrar cuando se lleva a cabo un diagnóstico. En este caso la coexistencia de más de un agente viral no presenta interferencia y el resultado es la suma de sus efectos (Nuez 2001).

6.6. Técnicas serológicas

El ensayo inmunoabsorbente a una enzima (ELISA), es una técnica muy confiable y rápida que permite detectar la presencia de patógenos importantes en especies o variedades de plantas que sean tolerantes o resistentes, aun cuando no muestran síntomas. Según los precursores de esta técnica dicen que la optimización y automatización de esta técnica también se ha convertido en una valiosa herramienta de detección y diagnóstico de enfermedades causadas por virus. La importancia del uso de ELISA radica en su sensibilidad (Clark y Adams 1977).

6.7. Virus que afectan *Solanum lycopersicum*

La emergencia de enfermedades en las plantas se debe a fitopatógenos nuevos que han incrementado su incidencia, distribución geográfica y rango de hospedante, A nivel mundial el cultivo de tomate es afectado por más de 136 especies de virus (Jones 2001; Vallejo 1999; Bandyopadhyay y Frederiksen 1999).

Los virus que se han encontrado infectando tomate bajo las condiciones de Ecuador son los siguientes:

6.8. *Potato Virus Y* (PVY)

Familia: Potyviridae

Género: Potyvirus

6.8.1. Descripción

Ha sido uno de los virus de las plantas más estudiadas. PVY tiene una gran gama de huéspedes que incluye no sólo las especies de la familia solanaceae cultivadas, sino también muchas malas hierbas y otras familias. Su distribución está en todo el mundo y es uno de los patógenos de las plantas de mayor importancia económica. Muchas cepas, variantes y patotipos han sido diferenciados, siendo las principales cepas de PVYº y PVY-n. Se transmite mecánicamente y por áfidos de forma no persistente. También se ha reportado que *Tetranychus urticae* puede transmitirlo (Kerlan 2006).

6.8.2. Sintomatología

En tomate PVY causa un moteado leve, al igual que en el ají y pimiento. Sin embargo existe una alta diversidad de síntomas. Algunas cepas causan necrosis. En tomate se puede producir una necrosis venal y manchas necróticas en las hojas; algunas veces se presentan rayas necróticas en pecíolos y tallos. La gama de huéspedes comprenden 495 especies de 31 familias incluida las solanáceas (Kerlan 2006).

6.8.3. Especies de diagnóstico

Las especies sensibles a todas las cepas de PVY según Kerlan (2006) incluyen:

-*Nicotiana tabacum:* dependiendo de la cepa, presenta distorsión en hojas, reducción del crecimiento y patrones de necrosis.

-*N. benthamiana*: compensación vena sistémica, moteado y la rugosidad.

-*N. occidentalis P1:* lesiones locales cloróticas leves, moteado y clorosis.

-*Datura stramonium*: es inmune a todas las cepas analizadas.

6.9. *Potato Virus X* (PVX)

Familia: Alphaflexiviridae

Género: Potexvirus

6.9.1. Descripción

Se encuentra extendido en todo el mundo donde se cultiva papa aunque la reducción en el rendimiento no es superior al 15%, en condiciones naturales el principal cultivo es papa pero puede afectar ocasionalmente ají, tomate y tabaco. La intensidad de los síntomas depende del cultivar y la temperatura ambiental, cuando sobrepasa los 25º C la infección es asintomática. Es fácilmente transmisible por savia y en la naturaleza principalmente por contacto mecánico (Koenig y Lesemann, 1989; Fribourg, 2007).

6.9.2. Sintomatología

El virus puede causar síntomas de clorosis, mosaico, reducción del tamaño de la hoja, y lesiones necróticas en los tubérculos. El PVX puede interactuar con el PVY y PVA causando síntomas más severos y mayores pérdidas de rendimiento que la causada por cada uno de estos virus por separado. Es trasmitido mecánicamente y no por insectos vectores. Tabaco, pimiento y tomate pueden servir también de huéspedes de este virus (Burrows y Zitter, 2005).

El virus infecta a más de 240 especies en 16 familias, la mayoría de hospederos son de la familia Solanácea (Koenig y Lesemann, 1989).

6.9.3. Especies de diagnóstico

Las especies sensibles según Koenig y Lesemann (1989) incluyen:

-*Nicotiana tabacum* y otras especies de Nicotiana: Las primeras hojas infectadas a menudo se desarrollan manchas necróticas. Las hojas infectadas después muestran moteado clorótico o necrótico, mosaico o clorosis venal.

-*Datura stramonium*: Presenta anillos cloróticos pequeños seguidos de moteado, clorosis o necrosis venal.

6.10. *Tobacco Mosaic Virus* (TMV)

Familia: Virgaviridae

Género: Tobamovirus

6.10.1. Descripción

Se encuentra extendido por todo el mundo afectando principalmente tabaco pero ocasionalmente al tomate, ají y muchas otras solanáceas. No se ha conocido ningún vector verdadero, pero en raras ocasiones se transmite de manera ineficiente por insectos masticadores. Se transmite normalmente mecánicamente. Es el más conocido para las contribuciones a la virología. El virus se sabe que infectan al menos 199 especies de 30 familias de plantas (Zaitlin 2000; Fribourg 2007).

6.10.2. Sintomatología

Los síntomas generados por este virus dependen en parte de la planta huésped y pueden incluir mosaico verde oscuro, moteado, necrosis, retraso en el crecimiento, hojas enrolladas, curvatura de las hojas y amarillamiento general de los tejidos. Algunas cepas de TMV que afectan tomate causan un pobre rendimiento, frutos deformados, retraso en la maduración y color de la fruta no uniforme (Scholthof 2000; Zaitlin 2000).

6.10.3. Especies de diagnóstico

Las especies sensibles según (Zaitlin 2000) incluyen:

-*Nicotiana tabacum cvs. Turco, White Burley y Xanthi*: A los 3-4 días después de la inoculación, existe un mosaico verde oscuro o claro, acompañada por la distorsión y ampolladuras de hojas.

-*N. glutinosa, N.tabacum cv. Samsun NN, NN y Xanthi*, plantas con el genotipo N, y *Chenopodium amaranticolor, C. quinoa, y Phaseolus vulgaris cv. Pinto*: Forman lesiones necróticas que se desarrollan en los sitios de infección, pero sin síntomas sistémicos por debajo de aproximadamente 28 °C. Los síntomas de una infección sistémica necrótica se puede desarrollar por encima de esa temperatura, en particular cuando la temperatura se reduce posteriormente por debajo de 28Cº. *N. clevelandii y N. benthamiana* exhiben una necrosis local, seguido por necrosis sistémica y muerte de la planta.

6.11. *Tobacco Ringspot Virus* (TRSV)

Familia: Secoviridae

Género: Nepovirus

6.11.1. Descripción

Las principales plantas que ataca en condiciones naturales son tabaco, soya, tomate, uva, duraznero, manzano, cerezo, frambueso y plantas ornamentales. Es fácilmente transmisible por inoculación de savia y tiene una amplia gama de huéspedes, incluyendo plantas leñosas y herbáceas. Se transmite por el nematodo *Xiphinema americanum* y otra especies de *Xiphinema spp* estrechamente relacionados (Stace-Smith, 1985; Fribourg, 2007).

La gama de huéspedes experimental es amplia; especies en más de 17 familias de magnoliopsidas y liliopsidas son susceptibles. En la naturaleza, el virus se presenta principalmente en plantas ornamentales y plantas leñosas o semileñosas y es transmisible por inoculación de savia (Stace-Smith, 1985).

6.11.2. Sintomatología

En tomate manchas necróticas locales, moteado sistémico y necrosis. También se reportan síntomas como enrollamiento y necrosis en hojas nuevas y anillos necróticos. Si los frutos están infectados tempranamente desarrollan manchas pardas y anillos superficiales (Stace-Smith, 1985).

6.11.3. Especies de diagnóstico

Las especies sensibles según Stace-Smith (1985) incluyen:

-*Chenopodium Amaranticolor* y *C. quinua*: Lesiones cloróticas o necróticas locales y necrosis apical sistémica.

-*Cucumis sativus* (pepino): Manchas cloróticas locales, clorosis sistémica y moteada.

-*Solanum lycopersicum* (tomate): Manchas necróticas locales.

-*Nicotiana tabacum* (tabaco): Manchas necróticas locales o anillos después de cierto tiempo la infección suele ser asintomática.

-*Petunia hybrida*: Lesiones necróticas locales, colapso de las hojas jóvenes infectadas sistémicamente.

-*Phaseolus vulgaris* (fréjol): Lesiones cloróticas locales y necrosis en la punta de hojas.

-*Vigna unguiculata* (caupí): Lesiones locales cloróticas o necróticas y la mayoría de las cepas causan necrosis sistémica en la puntas de las hojas.

6.12. Cultivares comerciales

6.12.1. Híbrido Miramar

Hibrido de larga vida, indeterminado, gran adaptabilidad, fruto rojo redondo, calibre grande, peso promedio de 180-250gr, alto rendimiento resistente a *Tabacco Mosaic Virus (TMV)*, nemátodos, Fusarium raza 1 y 2 (SEMINIS 2011).

6.12.2. Híbrido Pietro

Tomate hibrido de larga vida, indeterminado, de gran adaptabilidad produce frutos ligeramente redondos de color rojo y de calibre grande, peso promedio de 230-250 gr, planta vigorosa con buena cobertura foliar y entrenudos cortos, racimos uniformes de cinco a siete frutos, mantienen gran calibre hasta el último racimo con excelente post cosecha., se adapta bien a campo abierto e invernadero. Tolerancia a *Tomato Mosaic Virus (ToMV)*, Verticilium, *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium sp* y nemátodos ((Imporalaska, 2015).

6.13. Materiales de laboratorio

6.13.1. Tubos Eppendorf

Sirve para medir cantidades pequeñas y limitadas de aislamientos de ADN. Se usa en aplicaciones de cultivo celular de manera seguras reduciendo el riesgo de contaminación y también se optimiza el espacio de almacenamiento (Eppendorf, 2013).

6.13.2. Matraz Erlenmeyer

Es un frasco cónico de vidrio con base ancha y cuello estrecho o ancho, existen de distintas capacidades, sirven para calentar sustancias a temperaturas altas. También existen de cuello esmerilado lo que les permite un cierre hermético en caso de trabajar con sustancias muy volátiles (Romero, 2009).

6.13.3. Vaso de precipitado

Este material es de forma cilíndrica, fondo plano y poseen pico vertedor, de distintos volúmenes y de forma alta o de forma baja. Se utiliza para la obtención de precipitados, de disolución, para calentar líquidos o soluciones, para evaporar soluciones. Vienen graduados pero a pesar de ello no se los utiliza para mediciones volumétricas. La capacidad varía de 25 ml. hasta varios litros. Resisten cambios bruscos de temperatura, pero deben calentarse sobre tela de amianto (Romero, 2009).

6.13.4. Guantes de látex

Los guantes constituyen una medida de prevención frente al riesgo biológico. Aunque de por sí no evitan el pinchazo. La utilización de guantes es el método de protección de barrera más importante para prevenir la contaminación de las manos cuando existe contacto con material biológico infeccioso (Ramos 2006).

6.13.5. Guantes de nitrillo

Estos guantes proporcionar protección química. Están elaborados a partir de polímeros, naturales o sintéticos. Tiene propiedades de resistencia a agentes atmosféricos y químicos. No son transpirables al aire (Cohen 2000).

6.13.6. Micropipetas

Es un instrumento de laboratorio empleado para succionar y transferir pequeños volúmenes de líquidos y permitir su manejo en las distintas técnicas analíticas. Su uso implica emplear distintos líquidos sin tener que lavar el instrumento. Para ello, se emplean puntas desechables, de plástico, que son estériles. Existen varios tipos de puntas: por ejemplo, las amarillas para pipetear volúmenes pequeños de 10 µl, y las azules para pipetear volúmenes grandes de 800 µl (Rebolledo 2010).

6.13.7. Rack para 100 puntas

El rack para 100 puntas ha sido diseñado para albergar puntas de grandes volúmenes y extra largas, es un instrumento que sujeta puntas erguidas para su menor manejo (QSP 2000).

6.13.8. Soporte para micropipetas carrusel

Cuando la pipeta no está en uso, se debe colocar en posición vertical para evitar la contaminación de las mesas de trabajo. El soporte carrusel es ideal para ahorrar espacio en la mesa de trabajo y así realizar otros trabajos sin necesidad de ocupar más espacio (Romero 2009).

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Ubicación del ensayo

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Fitopatología y de biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica y de biología molecular perteneciente a la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la parroquia Lodana del cantón Santa Ana, provincia de Manabí; localizada geográficamente a 01° 09'51" de latitud Sur y 80°23´ 24 W de longitud Oeste con una altitud de 60 msnm (INHAMI 2014).

7.2. Producción de plantas indicadoras

Para las plantas indicadoras se efectuaron semilleros en macetas, conteniendo un sustrato de turba (norvArvo). Cuando las plántulas tuvieron sus dos primeras hojas verdaderas en el almacigo, fueron trasplantadas a macetas de ½ kilo, compuestas de una mezcla: 1:1:1, de arena, tierra y compost. Las plantas fueron mantenidas en un invernadero a prueba de insectos y a un rango de temperatura de 18-38ºC **(Anexo 6 y 7).**

La identificación de los virus se realizó con base a la sintomatología inducidas por ellos en plantas indicadoras, utilizándose las siguientes especies: *Nicotiana glutinosa; N. occidentalis; N. rustica; N. tabacum* cv. Samsum*; N. tabacum* cv. White Burley*; N. benthamiana; N. bigelovii; Datura stramonium; Solanum lycopersicum* cv. Marglobe*; Petunia hibrida; Chenopodium quinua; Vignia unguiculata* subp. Black.

7.3. Recolección de muestras y obtención del inóculo

Se tomaron como muestras las ramas, hojas y frutos con síntomas de virosis (clorosis, enanismo, manchas cloróticas, encrespamiento de hojas) en plantaciones comerciales de tomate de las zonas muestreadas, luego se colocaron en bolsas plásticas y se llevaron al invernadero para la preparación de la fuente de inóculo. Cada muestra contó con el respectivo levantamiento de identificación como; lugar de procedencia, numero de muestra, variedad, síntomas visibles, códigos de identificación **(Anexo 1)**.

La recolección de muestras se las realizó en la cuenca media (Lodana, Estancia Vieja y Colon) y baja (Crucita) del Valle del Río. **(Anexo 2).**

El proceso de obtención del inóculo se la realizó en un invernadero construido con una cubierta plástica transparente y con paredes protegidas por malla anti áfidos para dar las condiciones adecuadas al trabajo. Las inoculaciones fueron realizadas mecánicamente, haciendo maceraciones de la muestras para la obtención de la fuente de inóculo y utilizando Carborundum malla 600 como abrasivo, en el has de la hojas de las plantas indicadoras, para permitir la apertura de la células sin que se dé la rotura celular que mate o dañe el tejido, abriéndole paso así a la solución inoculante **(Anexo 9)**.

A los 20 días después de las inoculaciones se empezaron a observar síntomas en las plantas indicadoras de los cuales solo 11 aislamientos reaccionaron positivamente a las inoculaciones. *N. occidentalis* fue tomada como planta fuente para mantener el inóculo ya que fue la especie indicadora que presento síntomas en los 11 aislamientos que reaccionaron. **(Anexo 10 y Fig. 1).**

7.4. Caracterización biológica

Los 11 aislamientos fueron inoculados en las especies de *N. occidentalis, N. rustica, N. tabacum cv.* White Burley, *N. tabacum cv.* Samsum, *N. glutinosa y Solanum lycopersicum cv.* Marglobe, utilizando tres plantas de cada especie por cada aislamiento. Durante este proceso hubieron especies que no mostraron síntomas, por lo que se realizaron retroinoculaciones (back test) que consistió en macerar hojas de especies que no mostraron síntomas, en la planta indicadora de *N. occidentalis* con el objeto de comprobar si hubo infecciones sistémicas asintomáticas.

Todos los síntomas vistos en la caracterización se registraron y se evaluaron de acuerdo al color e intensidad de las lesiones observadas.

7.5. Análisis serológico

7.5.1. Purificación, conjugación y titulación de las Inmunoglobulinas

La técnica utilizada para la reacción serológica fue la prueba de conjugados enzimáticos [Double antibody sándwich enzyme-linked immuno-sorbent assay (DAS-ELISA)] descrita por Clark y Adams (1977). Para esto se purificaron las inmunoglobulinas (IgG) de los antisueros a utilizarse: (PepMv, PVX-C, TEV, PTV, PVY°, TRSV, APMV, CMV, AMV*)* mediante precipitación con sulfato de amonio, según la metodología de Ball et al. (1990). Se realizó una dilución 1/10 de antisuero crudo con agua destilada, en agitación contínua y se agregó 10 ml de sulfato de amonio saturado al 75%.

Después de incubar esta mezcla durante 45 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos en la microcentríga Eppendorf modelo 5415D. El precipitado se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS ½ X) pH 7,4 y se dializó cuatro veces contra la misma solución buffer por 16 horas a 4°C. La concentración de las IgG, previamente diluidas 1/100 en agua destilada, se calculó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-Visible Recording spectrophotometer) a una absorbancia de 280 nm. La IgG purificada fue estandarizada a una concentración de 1 mg/ml (densidad óptica A280 nm = 1.4) y se agregó 0,01% de azida de sodio antes de almacenarla en un frasco de vidrio a 4 °C.

La preparación del conjugado de la IgG con la enzima fosfatasa alcalina se realizó siguiendo la metodología descrita por Mackenzie (1990) modificada en el Centro internacional de la Papa: Después de mezclar un ml de la IgG purificada (1mg/ml) con 1250 unidades de fosfatasa alcalina (Sigma Diagnostic Inc.) y 2.6 µl de glutaraldehido al 25%, se dejó incubar a medio ambiente por 3 horas, agitando cada 15 minutos. La mezcla se dializó a 4°C contra el buffer PBS 1X, pH 7.4 por 4 horas cambiando el buffer cada 1 hora. Pasado este periodo, la preparación fue colocada en un tubo siliconizado. Antes de almacenar el conjugado a 4°C, se agregó 5 mg de albúmina de suero bovino (BSA) por ml de conjugado + 0.02% de azida de sodio.

Las titulaciones de las IgG, la IgG-conjugada y del antígeno se hicieron en una placa de microprecipitación de poliestireno de fondo plano (Dynatech Laboratories Inc.)

marcada con tinta indeleble. Se colocó 100 µl por hoyo de la IgG purificada diluida a 1/500, 1/1000 y 1/1500 con buffer de cobertura (buffer carbonato 50 mM, pH 9.6). Después de incubar la placa a 37°C por 12 horas, se enjuagó tres veces por 3 minutos con buffer de enjuagado PBS-Tween (PBS ½ X + Tween 1%, pH7.4).

Posteriormente se añadió savia de N. occidentalis o N. tabacum cv Samsum infectada con el virus (antígeno) de cada aislamiento y savia de un planta sana (testigo) diluidos a 1/10 y 1/100 [peso (g)/volumen (ml)] con buffer de maceración (PBS 1X-Tween + 2% de polivinilpirrolidona + 1% de albúmina de huevo. La placa fue incubada a 4°C hasta el día siguiente, se enjuagó nuevamente tres veces por 3 minutos por PBS-Tween y se añadió 100 µl por hoyo de la IgG-conjugada diluida a 1/500, 1/1000 7 1/1500 en buffer de conjugado (PBS 1X-Tween + 2% de polivinilpirrolidona + 0.2 de albúmina de huevo) y se encubó por 4 horas a 37°C.

Finalmente, se lavó como en las veces anteriores con PBS-Tween y se añadieron 80 µl del sustrato de la enzima fosfatasa alcalina [a la dosis de 1 tableta por 100 ml de buffer de sustrato (dietanolamina + HCL 37%, pH 9.8)] por hoyo. Se dejó incubar a medio ambiente. Las lecturas se realizaron en un lector de placas de ELISA (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation) a 405 nm.

La lectura de las placas se realizó visualmente en el laboratorio ya que no se contaba en el laboratorio con un lector de placas **(Anexo 11).**

7.6. Inoculaciones en cultivares comerciales

Para estas inoculaciones se seleccionaron dos híbridos indeterminados de tomate; Pietro y Miramar, que se comercializan a nivel nacional. El proceso que se realizó en los cultivares comerciales fue el mismo que en la caracterización biológica, utilizándose 3 plantas de cada hibrido para cada aislamiento. **(Anexo 12).**

VIII. RESULTADOS

8.1. Selección de aislamientos de las inoculaciones preliminares

Se recolectaron 25 muestras en campos de agricultores de la cuenca media y baja del Valle del Río Portoviejo, las cuales fueron inoculadas en 12 especies indicadoras, de las que solo 11 aislamientos reaccionaron positivamente con síntomas.

8.2. Caracterización biológica

Los aislamientos inoculados sobre las plantas indicadoras, mostraron diferentes patrones de síntomas:

En ***N. occidentalis*** los aislamientos Co-C3-M1; Co-C3-M3; Lo-C2-M2 mostraron un mosaico suave en las hojas, mientras que el aislamientos Ev-C1-M3 mostró un mosaico suave y necrosis apical. El aislamiento Co-C3-M4 presentó lesiones cloróticas con centros pajizos amarillentos, el aislamiento Co-C2-M1 presentó lesiones necróticas y un mosaico moderado y el aislamiento Co-C2-M2 presentó lesiones cloróticas con un mosaico suave y necrosis apical; el aislamiento Cr-C1-M3 presentó un mosaico suave con lesiones cloróticas; el aislamiento Cr-C1-M2 presentó lesiones pajizas y mosaico suave y el aislamiento Ev-C1-M2 presentó un mosaico moderado y lesiones cloróticas pajizas **(Cuadro 1 y Fig. 1).** EL aislamiento Co-C3-M5 se le realizó back test el cual reaccionó positivamente con infección sistémica asintomática.

En ***N. rustica***. Los aislamientos Co-C3-M1 y Co-C3-M3 presentaron gran porcentaje de pequeños anillo en las hojas, mientras que el aislamiento Ev-C1-M3 presentó lesiones cloróticas con un mosaico suave. El aislamiento Lo-C2-M2 presentó un mosaico pajizo en las hojas. El aislamiento Co-C3-M4 mostró síntomas visibles como lesiones necróticas con centros pajizos amarillentos. El aislamiento Co-C2-M1 mostró puntuaciones con anillos cloróticos pajizos. El aislamiento Co-C2-M2 mostró síntomas de lesiones cloróticas abundante sistémicas. Los aislamiento Cr-C1-M3 y Cr-C1-M2 presentaron lesiones cloróticas con un mosaico moderado sistémico. El aislamiento Ev-C1-M2 presentó lesiones cloróticas locales **(Cuadro 1 y Fig. 2)**, mientras que el aislamiento Co-C3-M5 no presentó síntomas visibles por lo cual se realizó back test el cual tuvo como resultado una infección sistémica asintomática.

En ***N. tabacum*** **cv. White burley**. El aislamiento Co-C3-M3 presentó un mosaico suave en las hojas. El aislamiento Co-C3-M4 presentó lesiones necróticas pajizas y un mosaico suave. El aislamiento Co-C2-M1 presentó un mosaico suave con puntuaciones y anillos cloróticos en las hojas. El aislamiento Co-C3-M1 presentó un mosaico suave. El aislamiento Cr-C1-M2 presentó mosaico moderado y puntuaciones con anillos cloróticos. El aislamiento Ev-C1-M2 presentó un mosaico moderado y lesiones con anillos cloróticos **(Cuadro 1 y Fig. 3)**. Se realizó el back test en los cinco aislamientos que no se observaron síntomas, teniendo como resultado que los aislamientos Co-C3-M5; Ev-C1-M3 y Co-C2-M2 respondieron positivamente con una infección sistémica asintomática mientras que los aislamientos Lo-C2-M2 y Cr-C1-M3 no hubo reacción alguna.

N. tabacum **cv Samsum**. No presentó síntomas, por lo que se realizó el back test teniendo como resultado que el aislamiento Co-C3-M4 y Co-C2-M1 no indujeron infección mientras que el resto de aislamientos si presentaron infecciones sistémicas asintomáticas. En ***Solanum lycopersicum*** **cv. Marglobe** no hubo síntomas por lo cual se realizaron retroinoculaciones (back test) en el cual todos los aislamientos provocaron una infección sistémica asintomática. **(Cuadro 1).**

N. glutinosa, V. unguiculata y D. stramonium no presentaron síntomas, por esta razón se realizaron retroinoculaciones (back test) que no presentaron infección.

Cuadro 1: Síntomas en plantas indicadoras inoculadas de 11 aislamientos en caracterización biológica

Aislamientos	*N. occidentalis*	*N. rustica*	*N.* cv. White burley	*N.* cv. Samsum	*N. glutinosa*	*S. lycopersicum*	*D. stramonium*	*V. unguiculata*
Lo-C2-M2	MS/AM	MP	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Ev-C1-M2	MM/LCP	LCL/PAC	MM/PAC	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Ev-C1-M3	MS/NA	LC/MS	SS/BT (+)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Co-C2-M1	LN/MM	PACP	MS/ PAC	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Co-C2-M2	LC/ MS/NA	LCAS	SS/BT (+)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Co-C3-M1	MS/AM	AC/PAC	MM	SS/ BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Co-C3-M3	MS/EM	AC/LCCPA	MS	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Co-C3-M4	LCCPA/EM	LNCPA	LNP/MS	SS/BT (-)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Co-C3-M5	SS	SS/BT (+)	SS/BT (+)	SS/ BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Cr-C1-M2	LP/MM	LC/MMS	MM/PAC	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)
Cr-C1-M3	MM/LC	LC/MMS	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (+)	SS/BT (-)	SS/BT (-)

SS=Sin síntomas, **AM**= Ampolladuras, **EM**=Encrespamiento de hojas **MS**=Mosaico suave, **MM**= Mosaico moderado, **MP**= Mosaico pajizo, **MMS**= Mosaico moderado sistémico, **NA**= Necrosis apical, **AC**= Anillos Cloróticos, **LN**=Lesiones necróticas, **LC**= Lesiones cloróticas, **LCL=** Lesiones cloróticas locales, **LCCPA**= Lesiones cloróticas con centro pajizo amarillento, **LNCPA**= Lesiones necróticas con centro pajizo amarillo **LP**= Lesiones pajizas, **LCP**= Lesiones cloróticas pajizas, **LNP**= Lesiones necróticas pajizas, **PAC**= Puntuaciones y anillos cloróticos, **LCAS**= Lesiones cloróticas abundantes sistémicas, **PACP**= Puntuaciones con anillos cloróticos pajizos, **BT (+)=** Back Test positivo, **BT (-)=** Back Test negativo.

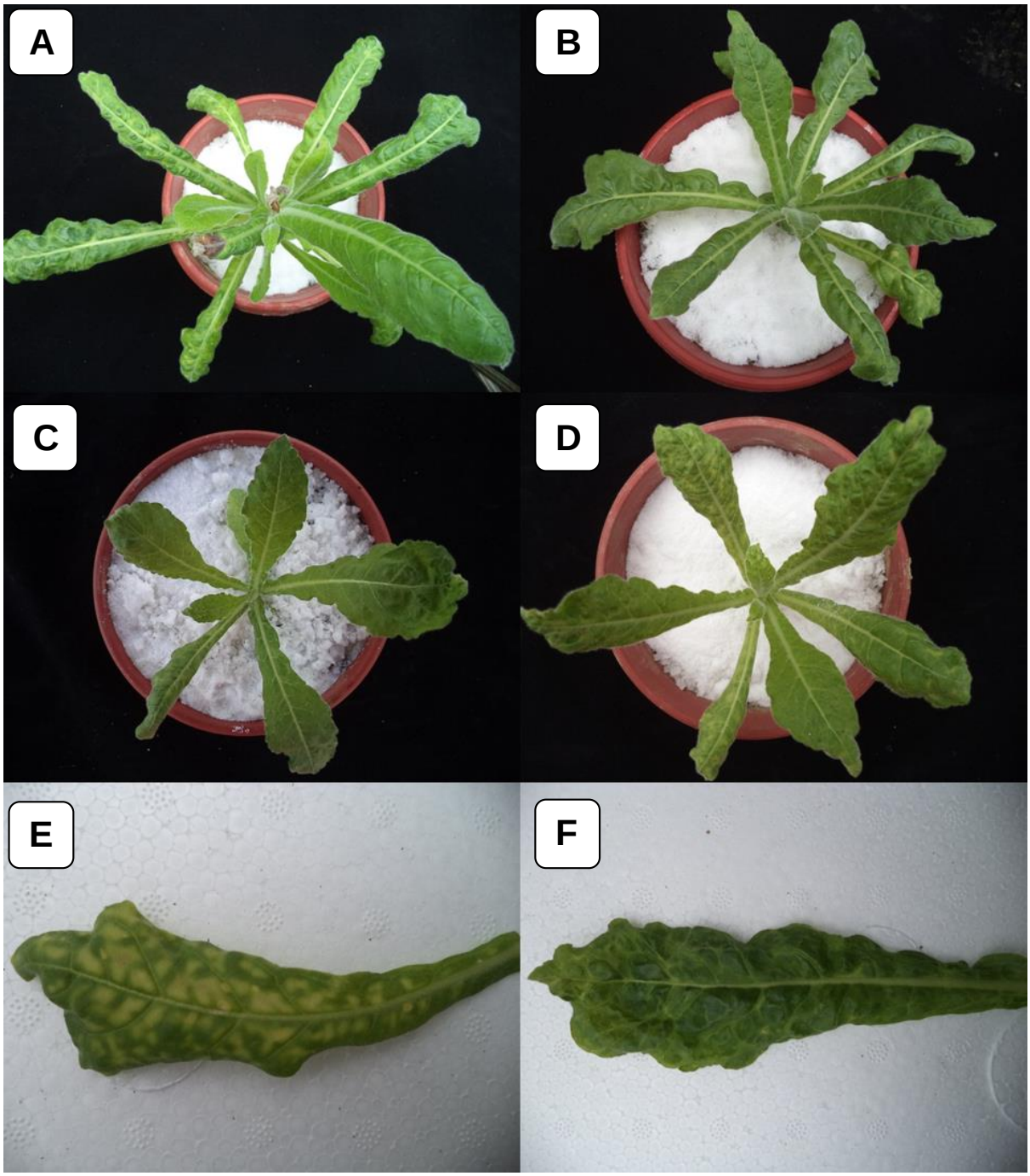

Figura 1. ***N occidentalis*. A)** Mosaico suave, ampolladuras y Lesiones necróticas en la parte apical con los aislamientos Co-C2-M2, Ev-C1-M3. **B)** Mosaico suave, hojas filiformes, ampolladuras y deformación de las mismas con los aislamientos Co-C2-M2, Co-C3-M1, Co-C3-M3, Ev-C1-M3, Lo-C2-M2**. C y D)** mosaico suave, ampollas y encrespamiento de hojas Co-C3-M1, Lo-C2-M2 **E)** Mosaico moderado, lesiones cloróticas pajizas con los aislamientos Cr-C1-M2, Cr-C1-M3 **F)** Encrespamiento de la hoja con los aislamientos Co-C3-M3, Co-C3-M4.

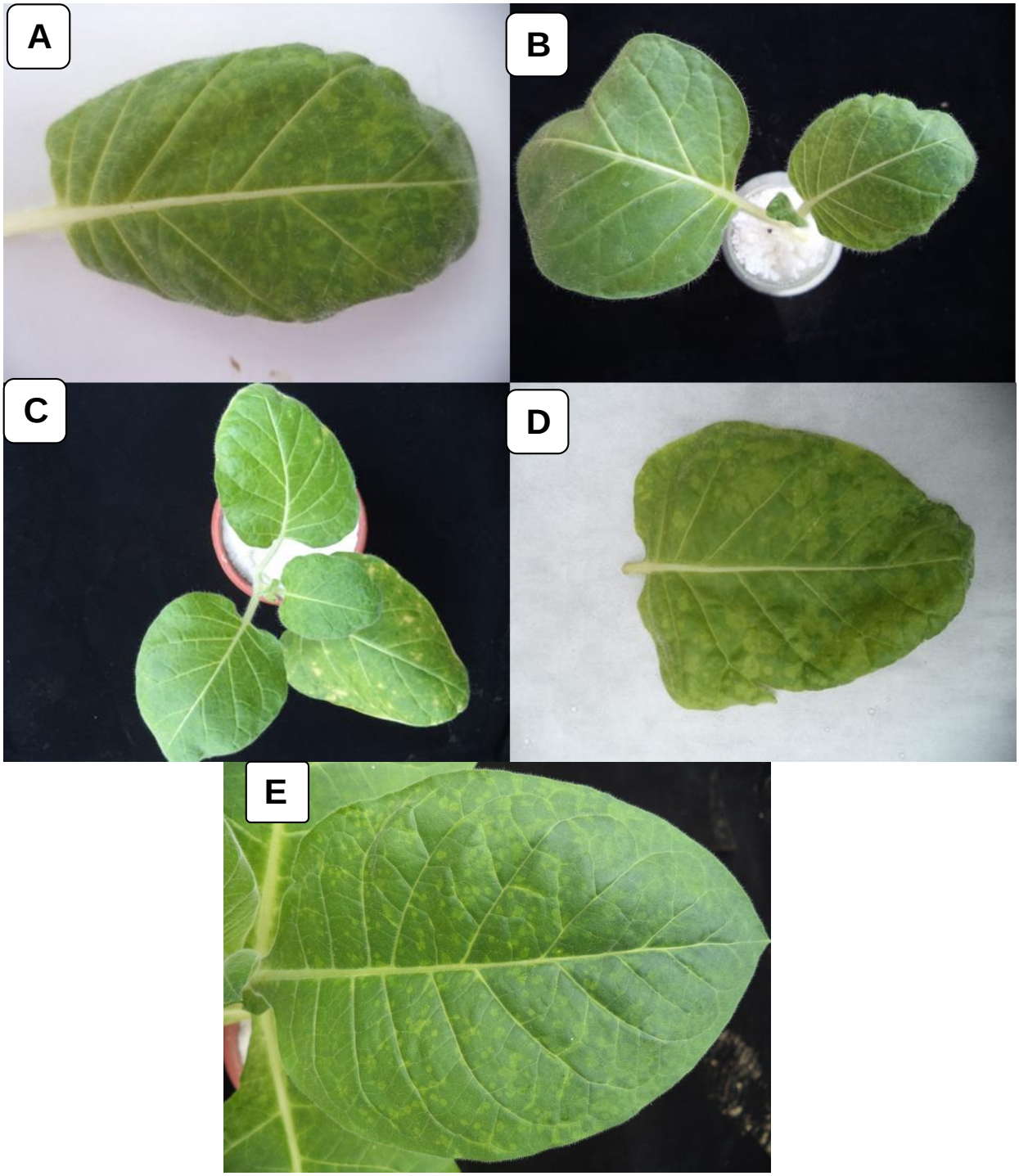

Figura 2. ***N. rustica.*** **A)** mosaico moderado y anillos cloróticos, encrespamiento de hoja Cr-C1-M2, Cr-C1-M3, Ev-C1-M2, **B)** Mosaico suave, pequeñas ampollas y encrespamiento de hojas Ev-C1-M3, **C)** Mosaico suaves, anillos necróticos con centro amarillentos pajizos Co-C3-M3, **D)** Mosaico suave, Anillos cloróticos y encrespamiento de hoja Co-C3-M1, Ev-C1-M2, ***N. tabaco*** **cv. White burley. E)** Lesiones pajizas y puntuaciones cloróticas, mosaico suave en Co-C2-M1, Co-C3-M1, Co-C3-M3, Co-C3-M4, Cr-C1-M2, Ev-C1-M2.

8.3. Caracterización serológica

La prueba de caracterización serológica que se utilizó fue la de los conjugados enzimáticos DAS-ELISA, obteniendo como resultado la reacción negativa para los 9 antisueros. **(Anexo 11 y Cuadro 2).**

Cuadro 2: Caracterización serológica de 11 aislamientos mediante DAS-ELISA

Aislamientos	TEV	TRSV	PTV	CMV	APMV	PVY	PepMv	AMV	PVX
Cr-C1-M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr-C1-M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ev-C1-M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co-C3-M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co-C3-M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co-C2-M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co-C3-M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co-C2-M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co-C3-M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lo-C2-M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ev-C1-M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-= Reacción negativa, +=Reacción positiva

8.4. Determinación de la validación de la resistencia de los híbridos comerciales Pietro y Miramar

En esta etapa se realizó el mismo procedimiento utilizado en la caracterización biológica, utilizando tres plantas de cada híbrido por aislamiento. Los resultados obtenidos muestran que los 11 aislamientos no indujeron síntomas en ninguno de los dos cultivares: Pietro y Miramar **(Anexo 12).**

Por lo anterior, se llevó a cabo retroinoculaciones (back test) en *N. occidentalis*, donde se encontró que 8 aislamientos: Co-C3-M5; Co-C2-M2; Cr-C1-M3; Co-C3-M1; Co-C3-M3; Co-C2-M1: Cr-C1-M2 y Ev-C1-M2, infectaron en forma sistémica asintomática el híbrido

Miramar y 5 aislamientos: Ev-C1-M2; Ev-C1-M3; Cr-C1-M3; Co-C3-M1; Co-C2-M1, infectaron en forma sistémica asintomática el híbrido Pietro.

8.5. Implementación y dotación de materiales para el laboratorio de Fitopatología.

La implementación y adecuación del laboratorio de Fitopatología es indispensable para el desarrollo académico y científico de los estudiantes, Lo cual servirá para las investigaciones futuras y adelantos científicos para nuestra provincia y nuestro país. Se realizó la compra de 6 vasos de precipitación de 100 ml, 6 matraz Erlenmeyer de 1000 ml, 500 unidades de tubos Eppendorf de 2 ml, caja de 100 guantes de latex talla M, caja de 100 guantes de nitrillo talla M, micropipeta de variable de 20 a 200 ul, de 0.5 a 10 ul y de 10 a 100 ul BOECO, soporte para micropipetas carrusel de 6 puestos, paquete racks con 100 puntas azules. Se efectuaron adecuaciones en el laboratorio como la reconstrucción de un mesón para la cámara de flujo laminar y área de siembra, la fabricación de taburetes de madera, una vitrina y la instalación y compra de un extractor de aire **(Anexo 13).**

Cuadro 3: Costos de implementación y dotación de materiales de laboratorio de Fitopatología.

Actividades	Costo en US $
1.Materiales de laboratorio:	
Vasos de precipitación, tubos Eppendorf, Erlenmeyer, caja de 100 guantes de latex talla M, caja de 100 guantes de nitrillo talla M, micropipeta de variable de 20 a 200 ul, de 0.5 a 10 ul y de 10 a 100 ul BOECO, soporte para micropipetas carrusel de 6 puestos, paquete racks con 100 puntas azules, vasos 200cc print, tapa vasos gelatineros, plástico.	1193.62
2.Adecuación del laboratorio de Fitopatología:	
Construcción de un mesón para la cámara de flujo laminar y área de siembra y fabricación de taburetes de madera.	875,00
Construcción de un mesón de 2x1 m., fabricación de una vitrina de aluminio y vidrio, compra e instalación de un extractor de aire.	830,00
Total	**2898,62**

IX. DISCUSIÓN

25 muestras recolectadas en campo de tomate con síntomas típicos inducidos por virus, fueron inoculadas preliminarmente sobre plantas de *Nicotiana glutinosa; N. occidentalis; N. rustica; N. tabacum cv.* Samsum*; N. tabacum cv.* White Burley*; Datura stramonium; Solanum lycopersicum cv.* Marglobe*; Petunia hibrida; Chenopodium quinua; N. benthamiana; N. bigelovii; Vigna unguiculata* subp. Black, de donde se obtuvieron 11 aislamientos. Para el estudio de los aislamientos, en la caracterización biológica se utilizaron 8 especies de plantas indicadoras sobre las cuales mostraron síntomas de: mosaicos, clorosis, necrosis apical, anillos cloróticos en *N. occidentalis, N. rustica y N. tabacum* cv. White Burley, infecciones sistémicas asintomáticas fueron encontradas en *Solanum lycopersicum* y *N. tabacum* cv. Samsum, mientras que, *Nicotiana glutinosa, V. unguiculata* subp Black y *Datura stramonium* no fueron infectadas.

Los resultados anteriores no coinciden con los obtenidos por Figueroa (1982), quién encontró PVX, PVY, TRSV, TMV, en este trabajo, los anteriores virus son descartados esto debido a que:

PVX induce en *N. tabacum* y otras especies *de Nicotiana,* manchas anulares necróticas en las primeras hojas inoculadas y en *D. stramonium,* anillos cloróticos y necrosis apical (Koenig y Lesemann 1989), mientras que en esta investigación presentó en *N. occidentalis* mosaico suave y lesiones cloróticas y no infecto *D. stramonium.*

PVY en *N. occidentalis,* induce lesiones cloróticas locales, moteado y en *N. tabacum* distorsión de hojas y patrones necróticos (Kerlan 2006), en este trabajo *N. occidentalis* presentó mosaico suave, lesiones cloróticas y en *N. tabacum* cv. White burley lesiones necróticas pajizas y mosaico.

TRSV induce en *N. tabacum* lesiones necróticas locales y manchas anulares, en *V. unguiculata* lesiones necrótica y necrosis apical (Stace-Smith 1985), en este estudio *N. tabacum* cv. White burley presentó lesiones necróticas pajizas, mosaico y en *V. unguiculata* no hubo infección.

TMV induce en *N. glutinosa, N. tabacum* cv. Samsum lesiones necróticas (Zaitlin 2000), en el presente trabajo la especie no hubo infección y en *N. tabacum* cv. Samsum presento infección sistémica asintomática.

En este trabajo, no se consiguió reproducir los mimos síntomas observados en el campo, esto pudo deberse a posibles infecciones mixtas, según Nuez (2001) actualmente la mezcla de virus en una misma planta es muy común y que esto genera variabilidad en los síntomas que no se parecen a ningún síntoma especifico de un solo virus, lo que explica la variación de síntomas en la caracterización biológica.

En las inoculaciones realizadas sobre los híbridos Pietro y Miramar, presentaron síntomas para los 11 aislamientos, por lo que se llevó acabo retroinoculaciones (back test) dando como resultado infecciones sistémicas asintomáticas en 8 aislamientos del hibrido Miramar y 5 del hibrido Pietro, formándose tres grupos: los aislamientos que infectaron únicamente al híbrido Miramar (Co-C3-M5; Co-C2-M2; Co-C3-M1; Co-C3-M3; Cr-C1-M2), los aislamientos que infectaron al híbrido Pietro (Ev-C1-M3; Co-C3-M1) y los aislamientos que infectaron ambos híbridos (Ev-C1-M2, Cr-C1-M3 y Co-C2-M1).

Existe la hipótesis de que los aislamientos estudiados pueden tratarse de aislamientos nuevos no reportados anteriormente, esto basado en los resultados obtenidos en este trabajo sobre todo en la caracterización biológica y en la validación de la resistencia de los cultivares comerciales, esto último, a pesar de que biológicamente los aislamientos, los mismos que no coinciden con lo reportado para otros virus que infectan tomate.

X. CONCLUSIONES

En la caracterización biológica de este estudio, los 11 aislamientos obtenidos en las zonas de Crucita, Colon, Lodana y Estancia vieja, mostraron sintomatología sistémicas variables las que difieren de síntomas producidos en investigaciones anteriores.

En los resultados de la prueba serológica (DAS ELISA) no hubo reacción positiva para ninguno de los antisueros utilizados.

La validación de resistencia los híbrido comercial Miramar y Pietro no mostraron síntomas con ningunos de los 11 aislamientos inoculados, al realizar el back test el híbrido Miramar dio como resultado la infección sistémica asintomática a 8 aislamientos, y el híbrido Pietro a 5 aislamientos.

La dotación de materiales y adecuación del laboratorio de Fitopatología es fundamental para el adecuado trabajo y funcionamiento de investigaciones científicas futuras a realizarse referente a problemas virales.

XI. RECOMENDACIONES

Con los conocimientos adquiridos durante esta investigación se puede recomendar seguir efectuando investigaciones relacionadas con las enfermedades virales en solanáceas, principalmente en tomate por su alta demanda.

Es de importancia seguir llevando la secuencia de esta investigación y así obtener más datos confiables que aporten al desarrollo agrícola y poder llegar a la resistencia genética, sería un gran adelanto en la investigación científica en la agronomía y serviría para mejorar nuestra calidad de productos en la provincia y el país.

Para realizar ensayos de este tipo se debe contar con todos los materiales, equipos, compuestos químicos y los ambientes adecuados dentro del laboratorio.

XII. CRONOGRAMA

Cuadro 4: Actividades generales

Actividades	Nov.	Dic.	Ene.	Feb.	Mar.
Producción de plantas indicadoras	X				
Recolección de muestras	X	X	X		
Inoculación de plantas indicadoras	X	X	X		
Evaluación de plantas indicadoras		X	X	X	
Pruebas serológicas				X	
Inoculación en cultivares comerciales				X	
Evaluación de cultivares comerciales					X
Tabulación de datos					X

XIII. PRESUPUESTO DE LA INVESTIGACIÓN

Cuadro 5: Actividades y costo de la investigación

Actividades	Costo en US $
1.Construcción del ambiente controlado	
Caña y madera	739,20
Toldo gigante de malla antiáfidos	35,00
Malla antiáfidos	103, 95
Plástico negro	33,60
	911,75
2.Caracterización biológica	
Materiales para caracterización biológica, .Paquete de paletas	219,23
Desinfectantes, detergentes, baldes, esponjas, manguera, sacos, hieleras, estropajos, pistola de metal, tela sombra, macetas, tacho y aviso de personal autorizado, macetas	217,43
Bomba mochila	50,00
Agroquímicos	48,30
	534.96
3.Caracterización serológica	
Fosfatasa alcalina	1034,72
	1034,72
4. Validación de resistencia de cultivares comerciales	
Hibrido Miramar	83,80
Hibrido Pietro	89,00
	172,80
6.Materiales de laboratorio	
Vasos de precipitación, tubos Eppendorf, Erlenmeyer, caja de 100 guantes de latex talla M, caja de 100 guantes de nitrillo talla M, micropipeta de variable de 20 a 200 ul, de 0.5 a 10 ul y de 10 a 100 ul BOECO, soporte para micropipetas carrusel de 6 puestos, paquete racks con 100 puntas azules, vasos 200cc print, tapa vasos gelatineros, plástico.	1193.62
	1193.62
7.Adecuación del laboratorio de Fitopatología	

Construcción de un mesón para la cámara de flujo laminar y área de siembra y taburetes de madera.	875,00
Construcción de un mesón de 2x1 m., fabricación de una vitrina de aluminio y vidrio, compra e instalación de un extractor de aire.	830,00
	2898,62
8.Gastos varios	
Boletos de avión	671,57
Comida, transporte, fletes, impresiones, internet, copias.	458,74
	730,31
Total	**6683,16**

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. Agrios G (2005). *Introducción a la Fitopatología*. 2da edición. Consultado el 23 de mayo del 2016 (en línea). Disponible en: https://es.scribd.com/doc/19829825/Fitopatologia-Agrios
2. Ball E, Hampton, R, De Boer S, Schoad N. Polyclonal antibodies. In: Hampton, R; Ball, E, De Boer, S. eds (1990). *Serological Methods for Detectioan and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens; A Laboratory Manual*. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA. 34-35 pp.
3. Bandyopadhyay R and Frederiksen R (1999). *Contemporary Global Movement of Emerging Plant Diseases*. Ann. N.Y. Acad. Consultado el 17 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://docplayer.es/9711864-Manejo-de-enfermedades-emergentes-de-las-plantas-casos-de-estudio-en-la-citricultura-cubana.html
4. Blancard D (2011). *Enfermedades del tomate: identificar, conocer, controlar.* Madrid-España. Mundi-Prensa.13-34 pp.
5. Chala V (1978). *Determinación de los virus que atacan el pimiento (Capsicum annuum L.) en el litoral ecuatoriano y evaluación de resistencia varietal*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Manabí.
6. Clark M and Adams A (1977). *Characteristics of the Microplate Methods of Enzime-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Virus*. Journal of General Virology. 34. 475-483 pp.
7. Cohen E (2000). *Guantes de protección contra productos químicos. centro nacional de medios de protección*. Consultado el 17 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/701a750/ntp_748.pdf
8. Eppendorf (2013). *Eppendorf Tube 5.0 ml*. Consultado el 17 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.eppendorf.com/Digiflip/Suplemento_2013/Suplemento_Lista%20precios_2013.pdf

9. Flaño A (2013). *Situación del tomate para consumo fresco*. Consultado el 20 de mayo del 2016 (en línea). Disponible en: http://www.odepa. odepaweb cl/ /publicaciones/doc/11729.pdf.

10. FAOSTAT- Agriculture (2013). *Estadísticas sobre cosechas, ganadería, riegos, utilización de la tierra, fertilizantes, consumo de plaguicidas y maquinaria agrícola*. Consultado el 16 de abril del 2016 (en línea). Disponible en: http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S
11. Figueroa A (1982). *Identificación y caracterización de las principales enfermedades del tomate (Lycopersicon esculentum Mill) causadas por virus en la zona de Pimampiro-Imbabura.* Tesis de grado. Consultado el 25 de abril del 2016 (en línea). Disponible en: http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/240/1/iniapsctF475i.pdf
12. Fribourg C (2007). *Virus, Viroides y Mollicutes de las plantas cultivadas en el Perú*. Lima- Perú. 37-40 pp.
13. Imporalaska (2015). *Características del híbrido Pietro*. Consultado el 11 de julio del 2016 (en línea). Disponible en: http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/21745/1/Tesis-127%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20394.pdf
14. INAMHI (2014). *Estación Agro Meteorológica Lodana, Santa Ana, Manabí, Ecuador*. Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC), Estadística Agropecuaria (ESAG), 2014. Consultado el 9 de marzo de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014/Resultados_2014/FORMULRIO%20MML%20FINAL.pdf
15. Jones J (2001). *Plagas y enfermedades del Tomate*. Madrid: Mundi Prensa.74p.
16. Kerlan C (2006). *"Potato Virus X".* Description of Plant Virus, No 414. INRA-Agrocampus Rennes, UMR BiO3P, Domaine de La Motte, F-35653 Le Rheu, Francia.
17. Koenig R y Lesemann D (1989). *"Potato Virus X"*. Description of Plant Virus, No 354. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Viruskrankheiten der Pflanzen, Messeweg 11, D-3300 Braunschweig, Alemania

18. Mackenzie D (1990). *Preparation of antibody-enzyme conjugates. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens; a Laboratory Manual.* Minnesota- USA. De Boer. 389 pp.
19. MAGAP (2011). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Consultado el 17 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://sinagap.agricultura.gob.ec/productos/censos-y-encuestas
20. Medeiros R, Resende R, Carvalho R, Dianese E, Costa C, Sgro J (2015). *Virología vegetal; Conceitos, fundamentos, classificacao e controle. Brasilia.* Brasil. Universidad de Brasilia. 20-22 pp.
21. Mena J (2010). Virus Fitopatógenos, departamento de protección vegetal rama de fitopatología. Consultado el 26 de mayo de 2016 (en línea). Disponible en: http://es.slideshare.net/themena1/manual-de-virus-virus-fitopatgenos-5039306
22. Melgarejo T (2010). *Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution.* Ecuador.
23. Monardes M, Escalona C, Alvarado V, Urbina Z, Martin B (2009). *Manual de cultivo de tomate* (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Chile.5 p.
24. Murphy J (2006). *Applied Aspects of Induced Resistance to Plant Virus Infection. In: Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Loebenstein, G, y J Peter. 1-3 pp.
25. Nuez F (2001). *El cultivo del tomate*. Madrid-España. Mundi-Prensa reimpresión. 471-514 pp.
26. Pérez M y Rico J (2004). *Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato*. Consultado el 26 de mayo de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000300008
27. Q.S.P (2000). *Catálogo de productos Quality Scientific Plastics*. Consultado el 22 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.qsptips.com/documents/08-0191ctqsp_qsp_catalog_spanish.pdf
28. Ramos M (2006). *Servicios de prevención de riesgos laborales: utilización de equipos de protección individual.* Consultado el 22 de junio de 2016 (en línea). Disponible en:

http://www.ffis.es/ups/prl/folleto_guia__guantes.pdf

29. Rebolledo E (2010). *Memoria de prácticas: técnicas básicas de biología*. Consultado el 22 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.usc.es/export/sites/default/gl/centros/bioloxia/descargas/Memoria_Txcnicas_Bxsicas.pdf
30. Romero C (2009). *Material de laboratorio. reconocimiento y manejo del mismo normas de seguridad algunas operaciones sencillas*. Consultado el 22 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/CUADERNOS%20DE%20CATEDRA/cesar%20Romero/MATERIAL%20DE%20%20LABORATORIO%20II%202009-04.pdf
31. SEMINIS (2011). *Catálogo de híbridos*. Consultado el 11 de julio de 2016 (en línea). Disponible en: http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/480/1/T-UTEQ-0028.pdf
32. Scholthof K (2000). *Tobacco mosaic virus*. Texas A & M University. Consultado el 17 de junio de 2016 (en línea). Disponible en: http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TobaccoMosaic.aspx
33. Stace-Smith R (1985). *"Tobacco Ringspot Virus"*. Description of Plant Virus, No 290. Estación de Investigación de Agricultura de Canadá, 6660 NW Marine Drive, Vancouver, BC, Canadá V6T 1X2.
34. Vallejo F (1999). *Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia.* Consultado el 6 de junio del 2016 (en línea). Disponible en: http://www.uneditorial.net/uflip/Mejoramiento-genetico-y-produccion-de-tomate-en-Colombia/pubData/source/Mejoramiento-genetico-y-produccion-de-tomate-en-Colombia.pdf
35. Zaitlin M (2000). *"Tobacco Mosaic Virus"*. Description of Plant Virus, No 360. Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York 14853, EE.UU.

ANEXOS

Anexo 1.- Muestras de *Solanum lycopersicum*, recolectadas en las zonas productoras del Valle del Río Portoviejo.

Muestra	Procedencia	Hospedante	Variedad
Lo-C1-M1	Lodana(Santa Ana)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Lo-C1-M2	Lodana(Santa Ana)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Lo-C2-M1	Lodana(Santa Ana)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Lo-C2-M2	Lodana(Santa Ana)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Lo-C2-M3	Lodana(Santa Ana)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Ev-C1-M1	Estancia Vieja (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Desconocida
Ev-C1-M2	Estancia Vieja (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Desconocida
Ev-C1-M3	Estancia Vieja (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Desconocida
Ev-C2-M1	Estancia Vieja (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Desconocida
Ev-C2-M2	Estancia Vieja (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Desconocida
Ev-C2-M3	Estancia Vieja (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Desconocida
Ev-C2-M4	Estancia Vieja (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Desconocida
Co-C1-M1	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Co-C1-M2	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Co-C1-M3	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Heatwave
Co-C2-M1	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Miramar
Co-C2-M2	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Miramar
Co-C3-M1	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Miramar
Co-C3-M2	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Miramar
Co-C3-M3	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Miramar
Co-C3-M4	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Miramar
Co-C3-M5	Colón (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Miramar
Cr-C1-M1	Crucita (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Pietro
Cr-C1-M2	Crucita (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Pietro
Cr-C1-M3	Crucita (Portoviejo)	*S. lycopersicum*	Pietro

Lo-C1-M1= Lodana- Campo 1-Muestra 1; **Ev-C1-M1=** Estancia vieja-Campo 1-Muestra 1**; Co-C1-M1=** Colon-campo 1-Muestra 1; **Cr-C1-M1=** Crucita- Campo 1-Muestra 1.

Anexo 2.- Mapa de las zonas productoras de Portoviejo donde fueron recolectadas las muestras.

Anexo 3.- Adecuación del ambiente controlado.

Anexo 4.- Preparación del sustrato para trasplante de especies indicadoras.

Anexo 5.- Esterilización del sustrato para el transplante.

Anexo 6.- Preparación de semilleros para las especies indicadoras.

Anexo 7.- Trasplante de las plantas indicadoras.

Anexo 8.- Recolección de muestras en los diferentes campos de cultivos de tomate.

Anexo 9.- Inoculación de muestras en las plantas indicadoras.

Anexo 10.- Obtención y mantenimiento de aislamientos.

Anexo 11.- Caracterización serológica y lectura de placas.

Anexo 12.- Inoculación de cultivares comerciales Miramar y Pietro.

Anexo 13.- Implementación y dotación de materiales para el laboratorio de Fitopatología.