

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA MOLECULAR PARA EL
DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VIRUS QUE ESTÁN INFECTANDO EL TOMATE
EN COLOMBIA**

PAULA TATIANA URIBE ECHEVERRY

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACION GENERAL DE POSGRADOS
PALMIRA**

2012

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA MOLECULAR PARA EL
DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VIRUS QUE ESTÁN INFECTANDO EL TOMATE
EN COLOMBIA**

PAULA TATIANA URIBE ECHEVERRY

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en CIENCIAS BIOLÓGICAS
Línea de investigación BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

DIRIGIDO POR:

JUAN CARLOS VACA VACA, Msc- PhD

KARINA LÓPEZ LÓPEZ, PhD

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACION GENERAL DE POSGRADOS
PALMIRA**

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

En Palmira a los 06 días del mes de Junio de 2012, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores CARLOS ARTURO OLIVEROS GARAY y CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA

Para calificar la Tesis de Grado de:

PAULA TATIANA URIBE ECHEVERRY

Titulada:

“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VIRUS QUE ESTÁN INFECTANDO EL TOMATE EN COLOMBIA” bajo la dirección de Juan Carlos Vaca Vaca PhD y Karina López López PhD.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes CARLOS ARTURO OLIVEROS GARAY y CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA

CARLOS ARTURO OLIVEROS GARAY

CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA

DEDICATORIA

A DIOS, POR SER MI GUÍA Y EL CENTRO DE MI VIDA

A MI AMADO ESPOSO

A MI PEQUEÑO JUAN MARTIN

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto y la beca otorgada para la realización de la maestría.

A las directivas de la Universidad de Manizales por la comisión de estudios otorgada.

A mi esposo por su amor, apoyo incondicional y por las enseñanzas en el trabajo de laboratorio.

A mi pequeño hijo por su amor y paciencia.

A mis padres, mi hermano y cuñada por su amor y apoyo incondicional.

A mis directores de tesis Juan Carlos Vaca Vaca y Karina López López por sus enseñanzas.

A Diana Milena, Mónica y Dorian por su amistad, compañía e incondicional ayuda

A todas las personas que me brindaron su valiosa amistad.

**La Facultad y los jurados de tesis
No se harán responsables de las ideas emitidas por el autor.
Artículo 24, resolución 04 de 1974**

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1. EL CULTIVO DE TOMATE.	19
4.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE TOMATE.	19
4.2.1 Enfermedades causadas por virus.	19
4.2.2 Virus emergentes en cultivos de tomate.	20
4.2.3 Enfermedades virales en cultivos de tomate en Colombia.	21
4.3 Familias de virus que afectan el cultivo de tomate	21
4.3.1 Familia <i>Geminiviridae</i> .	21
4.3.2 Familia <i>Virgaviridae</i> .	23
4.3.3 Familia <i>Bromoviridae</i>	25
4.3.4 Familia <i>Potyviridae</i>	26
4.3.5 Familia <i>Bunyaviridae</i>	27
4.3.6 Familia <i>Closteroviridae</i>	28
4.4 HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES	29
4.4.1 Microscopia de transmisión electrónica	29
4.4.2 Diagnóstico por método serológico	30
Técnica Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
Técnica PCR en tiempo real	31
Técnica Hibridación de ácidos nucleicos	31

5. METODOLOGÍA	32
5.1 LOCALIZACIÓN	32
5.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	32
5.3 EXTRACCION DE ADN	32
5.4 EXTRACCION DE ARN	33
5.5 SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)	33
5.6 ENSAYOS DE PCR Y RT-PCR	33
5.7 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN	33
5.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	36
5.10 PCR-RFLP	37
5.11 HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TIPO DOT BLOT	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 ¿Existen <i>Begomovirus</i> monopartitas pertenecientes a la familia <i>Geminiviridae</i> afectando el cultivo de tomate en Colombia?	40
6.2 Identificación de <i>Begomovirus</i> bipartitas en cultivos de tomate en los departamentos de Caldas y Risaralda	44
6.3 Detección de virus ARN que están afectando cultivos de tomate en Colombia de los géneros <i>Cucumovirus</i>, <i>Crinivirus</i>, <i>Potexvirus</i>, <i>Potyvirus</i>, <i>Tobamovirus</i>, <i>Tospovirus</i> y <i>Torradovirus</i>.	46
6.3.1 Detección e identificación molecular de <i>Tobamovirus</i> (<i>Tomato mosaic virus</i> -ToMV) en tomate cherry	47
6.3.2 Análisis filogenético para <i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	48
6.3.3 Detección e identificación molecular de <i>Cucumovirus</i> (<i>Cucumber mosaic virus</i> -CMV) en tomate	50

6.3.4 Análisis Filogenético <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	51
6.3.5 Detección de <i>Potyvirus</i> en tomate	53
6.3.6 Detección de <i>Tospovirus</i> en tomate	54
6.3.7 Evaluación de virus emergentes asociados al cultivo de tomate: <i>Crinivirus</i>, <i>Potexvirus</i> y <i>Torradovirus</i>.	55
6.4 Evidencia de infecciones mixtas de virus ADN y ARN en cultivos de tomate en el Valle del Cauca	56
6.5 Hibridación de ácidos nucleicos tipo dot blot.	57
6.5.1 Estandarización de las condiciones para realizar ensayos de hibridación de ácidos nucleicos tipo dot blot para virus ADN.	58
6.5.2 Estandarización de las condiciones para realizar ensayos de hibridación de ácidos nucleicos tipo dot blot para virus ARN.	59
7. CONCLUSIONES	62
8. RECOMENDACIONES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma de un <i>Begomovirus</i> bipartita.	22
Figura 2. Genoma de un <i>Begomovirus</i> monopartita: <i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus</i> -TYLCV.	23
Figura 3. Genoma del género <i>Tobamovirus</i>	24
Figura 4. Genoma del género <i>Cucumovirus</i>	26
Figura 5. Genoma del género <i>Potyvirus</i>	27
Figura 6. Genoma del género <i>Tospovirus</i>	28
Figura 7. Genoma del género <i>Crinivirus</i>	29
Figura 8. Plantas de tomate con sintomatología viral observada en las muestras recolectadas en campo.	41
Figura 9. Hibridación tipo dot blot para 74 muestras de tomate comercial recolectadas en zonas productoras de tomate con un sonda para TYLCV. ..	41
Figura 10. Identificación de TYLCV con los iniciadores TY1F y TY1R reportados por Lapidot (2002).	43
Figura 11. Identificación de TYLCV con los primers facilitados por el Doctor Gerardo Rafael Argüello Astorga de IPICYT (México).	44
Figura 12. Identificación de <i>Begomovirus</i> bipartitas con primers reportados por Rojas <i>et al.</i> (1993). A. Amplificación componente A; B. Amplificación componente B.	45
Figura 13. Hibridación tipo dot-blot en muestras de Risaralda y Caldas utilizando como sonda a PYMV.	46
Figura 14. ARN extraído con TRIZOL [®] Reagent (Invitrogen [™])	47
Figura 15. Identificación de <i>Tobamovirus</i> por PCR.	48
Figura 16. Arbol filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de un fragmento aproximado de 500 pb del gen CP de ToMV reportadas en diferentes países.	49

Figura 17. Identificación de <i>Cucumovirus</i> por PCR.	51
Figura 18. Árbol filogenético construido con base en la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 586nt aproximadamente del extremo 5' del gen CP de <i>Cucumber Mosaic virus</i> reportadas en diferentes países y el aislamiento obtenido en el Valle del Cauca (<i>CMV</i> Colombia-Valle).....	52
Figura 19. Identificación de <i>Potyvirus</i> por PCR.	54
Figura 20. Hibridación de ácidos nucleicos con la sonda PYMV.	59
Figura 21. A. Hibridación sonda CMV con ARN total B. Hibridación sonda CMV con cADN.	600

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i>	21
Tabla 2. Iniciadores empleados para la identificación de virus que infectan tomate.	34
Tabla 3. Origen y número de accesión en GenBank de secuencias de nucleótidos de aislamientos de ToMV usados en los análisis filogenéticos .	36
Tabla 4. Origen y número de accesión en GenBank de secuencias de nucleótidos de aislamientos de CMV usados en análisis filogenéticos	37
Tabla 5. Virus ARN analizados.....	47
Tabla 6. Matriz de identidad en la que se compara un fragmento de 500 nt aproximadamente del extremo 5' del gen CP del tobamovirus ToMV identificado en Colombia Valle del Cauca (ToMV_Col) con diferentes ToMV reportados en la base de datos del NCBI.	50
Tabla 7. Matriz de identidad en la que se compara un fragmento de 586 nt aproximadamente del extremo 5' del gen CP del cucumovirus CMV identificado en Colombia- Valle del Cauca (CMV_Col) con diferentes CMV reportados en la base de datos del NCBI.	52

RESUMEN

Las enfermedades virales se han constituido en una de las principales causas de pérdidas económicas en los cultivos de tomate a nivel mundial. Los objetivos de este trabajo fueron identificar virus ARN pertenecientes a los géneros *Crinivirus*, *Potexvirus*, *Tospovirus*, *Torradovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus* y *Tobamovirus*, y virus ADN del género *Begomovirus* en cultivos de tomate, con el fin de diseñar sondas para emplearlas como herramientas de diagnóstico viral basado en la hibridación de ácidos nucleicos. Para cumplir este objetivo, en el periodo 2008-2009 en Cundinamarca, Santander, Valle del Cauca, Antioquia y Boyaca; y en el periodo 2011 en Risaralda y Caldas se colectaron muestras de tomate con sintomatología viral. Se realizó extracción de ADN y ARN total del tejido vegetal y mediante ensayos de PCR y RT-PCR con iniciadores específicos se detectaron los diferentes virus ARN y ADN. Finalmente, para conocer la identidad molecular de los virus detectados, estos fueron clonados, secuenciados y analizados con herramientas bioinformáticas. Los resultados de nuestros análisis mostraron que en las muestras recolectadas no se evidenció la presencia de virus de los géneros *Begomovirus* monopartita, *Crinivirus*, *Potexvirus*, *Tospovirus*, *Torradovirus* y *Potyvirus*.

Durante el análisis se identificó la presencia de los virus *Cucumber mosaic virus* (*Cucumovirus*) en cultivos de tomate chonto y *Tomato mosaic virus* (*Tobamovirus*) en tomate cherry en muestras recolectadas en el departamento del Valle del Cauca, donde ambos mostraron identidades mayores de 98% con aislamientos virales similares de otras latitudes. De acuerdo a lo reportado a la fecha este es el primer trabajo donde se reporta la presencia del *Tomato mosaic virus* en cultivos de tomate cherry en Colombia. Además se identificó la presencia del begomovirus bipartita *Potato yellow mosaic virus* (*PYMV*) en muestras recolectadas en los departamentos de Risaralda y Caldas cuya identidad molecular se determinó por hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot. En este estudio se pudo evidenciar la mezcla de infecciones entre *CMV- PYMV* y *ToMV-PYMV*. Finalmente, se estandarizaron las condiciones de PCR y dot blot para detectar los virus *Tobamovirus*, *Cucomovirus* y *Begomovirus*, los cuáles actualmente están afectando el cultivo de tomate.

Palabras Claves: *Solanum Lycopersicum*, *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, *Potato yellow mosaic virus*, diagnóstico molecular de virus

SUMMARY

Viral diseases have become a major cause of economic loss in tomato crops worldwide. The aim of this research was to identify if RNA virus belonging to the genera *Crinivirus*, *Potexvirus*, *Tospovirus*, *Torradovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus* and DNA virus to the genera *begomovirus*, in order to design probes to employed to viral diagnosis based on nucleic acid hybridization.

In order to get this goal, during 2008-2009 in Cundinamarca, Santander, Valle del Cauca, Antioquia, Boyacá and in the period 2011 in Risaralda and Caldas samples of tomato leaves with viral symptoms were collected. DNA and total RNA extraction were done, then PCR and RT-PCR assays were performed using specific primers for each virus RNA and DNA, and finally these were cloned, sequenced and analyzed with bioinformatics tools in order to determine its molecular identity. In the samples analyzed there was no presence of viruses belonging to the genera *Begomovirus* (monopartite), *Crinivirus*, *Potexvirus*, *Tospovirus*, *Torradovirus* and *Potyvirus*.

By the other hand this our analysis could identified the presence of the virus *Cucumber mosaic virus* (*Cucumovirus*) in “chonto” tomato and *Tomato mosaic virus* (*Tobamovirus*) in cherry tomato which both of them showed 98% identity with other viral isolates affecting tomato crops previously identified in other regions of the world. To our knowledge this is the first study reported the presence of *Tomato mosaic virus* in cherry tomato crops in Colombia. Addition identified the bipartite begomoviruses *Potato yellow mosaic virus* (PYMV) in samples collected in Caldas and Risaralda whose molecular identity was determined by nucleic acid hybridization (dot-blot). In this study could evidence mixed infections between *CMV-PYMV* and *ToMV-PYMV*. Finally, conditions were standardized PCR and Dot-blot to identify the virus *Tobamovirus*, *Cucumovirus* and *Begomovirus*, wich are currently affecting the tomato crop.

Keywords: *Solanum Lycopersicum*, *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, potato yellow mosaic virus, molecular diagnosis of viruses.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum L*) es la hortaliza cultivada más importante a nivel mundial, constituyendo el 72% de la producción de vegetales frescos (FAOSTAT 2007). De acuerdo a los datos reportados por la FAO (Food and Agricultural Organization), los principales países productores de tomate son: China, Estados Unidos, Turquía, Italia, Egipto e India y en Sudamérica los países de mayor producción son Brasil, Chile, Argentina y Colombia (FAOSTAT, 2007).

En los últimos años, se ha reportado una disminución en la producción de tomate a nivel mundial y local, debido en parte al aumento de enfermedades virales, las cuales pueden estar relacionadas con el aumento en el comercio de semillas, plántulas, esquejes y frutos, que potencian el riesgo de introducir nuevos patógenos (virus) y sus vectores en áreas de producción; las prácticas culturales, la producción continuada de los cultivos puede favorecer la supervivencia de los virus y sus vectores durante todo el año, lo que aumenta el potencial de los virus emergentes de llegar a ser endémicos; el cambio climático también puede favorecer la propagación de los virus o sus vectores en áreas donde anteriormente eran desfavorables para los mismos y finalmente, la elevada tasa de replicación y mutación de los virus lo cual les proporciona una gran capacidad de evolución y adaptación a las presiones de selección (Hanssen *et al.*, 2010).

Se han descrito aproximadamente 136 especies virales con genoma ADN y ARN que afectan el cultivo de tomate (Hanssen *et al.*, 2010); en su mayoría pertenecientes a las familias *Bunyaviridae* (género *Tospovirus*), *Potiviridae* (género *Potyvirus*), *Bromoviridae* (género *Cucumovirus*), *Geminiviridae* (género *Begomovirus*) y *Virgaviridae* (género *Tobamovirus*) (Adams *et al.*, 2009 ; Arnaud *et al.*, 2007).

En Colombia, las investigaciones sobre enfermedades virales asociadas al cultivo de tomate han reportado virus pertenecientes a los géneros *Begomovirus* (*Tomato yellow mosaic virus -ToYMV*, actualmente denominado *Potato yellow mosaic virus -PYMV*), *Tobamovirus* (*Tobacco mosaic virus -TMV* y/o *Tomato mosaic virus -ToMV*), *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus -CMV*), *Tospovirus* (*Tomato spotted wilt virus -TSWV*, *Impatiens necrotic spot virus -INSV*), *Crinivirus* (*Potato yellow vein virus -PYVV*), *Potyvirus* (*Pepper deforming mosaic virus -PepDMV*) y *Nepovirus*, (*Tobacco ringspot virus -TRSV*) (Morales *et al.*, 2009; Tamayo y Jaramillo, 2006; Tamayo *et al.*, 2005; Vaca-Vaca *et al.* 2011) por medio de técnicas microscópicas, serológicas y/o moleculares .

Teniendo en cuenta las pérdidas económicas que revisten las enfermedades virales en los cultivos de tomate para los agricultores, el propósito principal de este trabajo de investigación fue desarrollar una estrategia molecular de diagnóstico rápido fundamentada en la hibridación de ácidos nucleicos (dot blot) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que pueda ser utilizada para la identificación de virus. Para dar cumplimiento al propósito de esta investigación se planteó una metodología que permitiera identificar a nivel molecular virus pertenecientes a los géneros *Begomovirus* (monopartitas y bipartitas), *Cucumovirus*, *Crinivirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus* y *Torradovirus* con la finalidad de diseñar sondas específicas que favorezcan la detección y diagnóstico rápido de entidades virales en cultivos de tomate. Adicionalmente se evidenció la presencia de infecciones mixtas entre virus ADN y ARN.

Esta investigación hace parte del proyecto: DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE MANEJO DE VIRUS TRANSMITIDOS POR MOSCA BLANCA *Bemisia tabaci* QUE AFECTAN CULTIVOS DE TOMATE *Solanum Lycopersicum* EN LA REGION ANDINA DE COLOMBIA, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, liderado por Juan Carlos Vaca Vaca Msc-PhD. (Código del proyecto: 2008N6396-3460).

2. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) es afectado por un número considerable de patógenos, tales como hongos, bacterias y virus que causan enfermedades en diferentes estadios de desarrollo del cultivo; dentro de éstos, los virus son considerados el segundo grupo de patógenos respecto al número de enfermedades que desencadenan (alrededor del 30%) y a su importancia económica.

En la actualidad no existe un método que permita la eliminación del virus una vez que este ha infectado una planta, sino que se emplean estrategias de control orientadas a prevenir o disminuir la infección o la propagación del virus o su insecto vector. Un elemento clave en el control de las enfermedades virales es la disponibilidad de métodos de diagnóstico específicos y confiables, así como el conocimiento de la epidemiología del virus en cada zona geográfica y de su variabilidad genética y biológica.

Dada la importancia que representan las entidades virales por las pérdidas económicas causadas a los agricultores se hace necesario realizar estudios orientados a la prevención y disminución de las infecciones virales en los cultivos, tales como aquellos basados en la identificación molecular de virus que permitan el diseño de herramientas moleculares que sirvan en un futuro para implementar estrategias de diagnóstico rápido de virus en zonas productoras de tomate en Colombia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar estrategias moleculares de diagnóstico rápido fundamentadas en las propiedades del ADN y ARN que puedan ser utilizadas para la identificación de virus o familias de virus que afectan el tomate en Colombia

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de *Begomovirus* monopartitas pertenecientes a la familia *Geminiviridae* que están afectando cultivos de tomate en Colombia.
- Identificar *Begomovirus* bipartitas en cultivos de tomate en los departamentos de Caldas y Risaralda
- Detectar virus ARN que están afectando cultivos de tomate en Colombia relacionados con los géneros *Cucumovirus*, *Crinivirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus* y *Torradovirus*.
- Conocer la identidad molecular de los virus ARN/ADN detectados
- Diseñar sondas específicas para cada virus identificado con el fin de emplearlas como herramienta de diagnóstico rápido basado en la hibridación de ácidos nucleicos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. EL CULTIVO DE TOMATE.

El tomate (*Solanum lycopersicum L*) es la hortaliza cultivada más importante a nivel mundial y constituye el 72% de la producción de vegetales frescos (FAOSTAT 2007). De acuerdo a los datos reportados por la FAO (Food and Agricultural Organization), los principales países productores de tomate son: China, Estados Unidos, Turquía, Italia, Egipto e India y en Sudamérica los países de mayor producción son Brasil, Chile, Argentina y Colombia (FAOSTAT, 2007). En Colombia, a pesar de presentarse una expansión en la producción de esta hortaliza en varios departamentos, las áreas sembradas han disminuido en los últimos años y las tendencias de producción son variables. Durante el periodo comprendido entre 1990 y 2007, la producción colombiana de tomate pasó de 505.005 toneladas (23.400 ha Cultivadas) a 390.000 toneladas (15.000 ha cultivadas), con una reducción de 115.005 toneladas (FAOSTAT, 2007).

La disminución en la producción de tomate a nivel mundial y local, puede estar relacionada con el aumento en el comercio de semillas, plántulas, esquejes y frutos que potencian el riesgo de introducir nuevos patógenos (virus) y sus vectores en las áreas de producción. Además el cambio climático también puede favorecer la propagación de los virus o sus vectores en áreas donde anteriormente eran desfavorables para los mismos (*Hanssen et al., 2010*)

4.2. ENFERMEDADES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE TOMATE.

El cultivo de tomate es afectado por un número considerable de patógenos tales como bacterias, hongos y virus que causan enfermedades en diferentes estadios de desarrollo del cultivo. Las enfermedades de origen viral son difíciles de controlar y causan pérdidas económicas para los productores convirtiéndose en una limitante en la producción de esta hortaliza a nivel mundial (Jones, *et al.*, 1991).

4.2.1 Enfermedades causadas por virus.

Los virus son parásitos intracelulares obligados debido a que dependen de la maquinaria celular del hospedero para su supervivencia y multiplicación. Estos poseen genomas pequeños y compactos, constituidos por proteínas y ácidos

nucleicos que pueden ser ácido ribonucleico (ARN) o ácido deoxirribonucleico (ADN) de cadena doble o sencilla (Agrios, 2004; Jeger, 2009).

Los virus ingresan a las plantas por medio de heridas mecánicas o vectores biológicos como insectos, ácaros, nemátodos, también pueden ingresar a la planta por medio de algunos hongos provenientes del suelo (Jones y Jiménez, 2001), causando una interrupción sustancial en los patrones normales de crecimiento y desarrollo de las mismas (Levy, Fraenkel-Conrat, Owens, 1994). Se ha encontrado que un solo virus puede infectar varias especies de plantas a la vez, y que algunas especies vegetales pueden ser atacadas por varios virus generando sinergismos (Agrios, 2004; Hull, 2002).

Las enfermedades virales en las plantas se manifiestan por la aparición de síntomas tales como mosaicos, amarillamientos, marchitamiento, clorosis, deformación en las hojas, necrosis, anomalías en flores y deformación de frutos, los cuales dependen del tipo de virus, el hospedero y estado de desarrollo de la planta, entre otros (Agrios, 2004; Jones, 1991).

Se han descrito aproximadamente 136 especies virales en el cultivo de tomate a nivel mundial (Hanssen, *et al.*, 2010) en su mayoría pertenecientes a las familias *Bunyaviridae* (género *Tospovirus*), *Potiviridae* (género *Potyvirus*), *Bromoviridae* (género *Cucumovirus*), *Geminiviridae* (género *Begomovirus*) y *Virgaviridae* (género *Tobamovirus*) (Arnaud *et al.*, 2007).

4.2.2 Virus emergentes en cultivos de tomate.

De acuerdo a la organización mundial de la salud, un virus emergente es aquel que aparece por primera vez o reaparece, incrementando su incidencia y área geográfica (Hanssen *et al.*, 2010; Ka-Wai Hui, 2006). La emergencia de virus existentes con mayor virulencia y la aparición de nuevos virus pueden estar relacionados con el cambio climático, prácticas culturales, plantas hospederas, insectos vectores y la elevada tasa de replicación y mutación, lo cual les proporciona una gran capacidad de evolución y adaptación a las presiones de selección (Hanssen *et al.*, 2010).

Se consideran virus emergentes en tomate, el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Tomato torrado virus* (ToTV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) y *Tomato chlorosis virus* (ToCV), entre otros mientras que, el *Tomato mosaic virus* (ToMV) y *Tobacco mosaic virus* (TMV) son virus reemergentes que están afectando la producción mundial de tomate (Hanssen *et al.*, 2010).

4.2.3 Enfermedades virales en cultivos de tomate en Colombia.

En Colombia, las investigaciones sobre enfermedades virales que afectan el cultivo de tomate realizadas a la fecha por medio de técnicas microscópicas, serológicas y/o moleculares han determinado la presencia de virus pertenecientes a los géneros *Begomovirus* (*Tomato yellow mosaic virus -ToYMV*, actualmente denominada *Potato Yellow Mosaic Virus -PYMV*), *Tobamovirus* (*Tobacco mosaic virus -TMV* y/o *Tomato mosaic virus -ToMV*), *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus -CMV*), *Tospovirus* (*Tomato spotted wilt virus -TSWV*, *Impatiens necrotic spot virus -INSV*), *Crinivirus* (*Potato yellow vein virus -PYVV*), *Potyvirus* (*Pepper deforming mosaic virus -PepDMV*), *Nepovirus*, (*Tobacco ringspot virus -TRSV*) (Morales *et al.*, 2009; Tamayo y Jaramillo, 2006; Tamayo *et al.*, 2005; Vaca-Vaca *et al.*, 2011)

4.3 Familias de virus que afectan el cultivo de tomate

4.3.1 Familia *Geminiviridae*.

La familia *Geminiviridae* es un grupo de virus de ADN que se distribuye a nivel mundial, infectan tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas y los insectos vectores que los transmiten son la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn), sicaelidos y membrácidos (Gutierrez, 2004; Rojas *et al.*, 2005); la familia *Geminiviridae* se dividen en cuatro géneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*, clasificados de acuerdo a tres criterios: rango de hospedero, insecto vector y organización genómica (Tabla 1) (Fauquet *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2005).

Tabla 1. Clasificación de la familia *Geminiviridae*

Género	Rango hospedero	Insecto vector	Organización genómica
<i>Mastrevirus</i>	Monocotiledóneas	Sicaelidos	Monopartita
<i>Curtovirus</i>	Dicotiledóneas	Sicaelidos	Monopartita
<i>Begomovirus</i>	Dicotiledóneas	Mosca blanca	Monopartita y bipartita
<i>Topocuvirus</i>	Dicotiledóneas	Membrácidos	Monopartita

Los viriones de los Geminivirus son geminados (de ahí su nombre) que consisten en dos icosaedros fusionados por una de sus caras, poseen un genoma de una (monopartita) o dos (bipartita) moléculas circulares de ADN cadena sencilla (ADNss) con una longitud aproximada 2.5-3.0 Kb (Rojas *et al.*, 2005; Ascencio-

Ibañez *et al.*, 1999). El género *Begomovirus* contiene la mayoría de especies pertenecientes a la familia *Geminiviridae*.

En los *Begomovirus* bipartitas, los dos componentes del genoma se denominan ADN-A y ADN-B, respectivamente (Figura 1). En el ADN-A, se localizan cuatro marcos de lectura abiertos (MLA) relacionados con replicación (gen AC1), transactivación (gen AC2), potenciación de la replicación (gen AC3) y encapsidación (gen AV1); el ADN-B, posee dos MLA relacionados con funciones para movimiento célula-célula (gen BV1) y larga distancia (gen BC1). Cada componente contiene unidades de transcripción divergentes separadas por una región intergénica con una longitud aproximada de 300 pb, al interior de la región intergénica se encuentra la región común con aproximadamente 200 nt (Rojas *et al.*, 2005; Ascencio- Ibañez *et al.*, 1999).

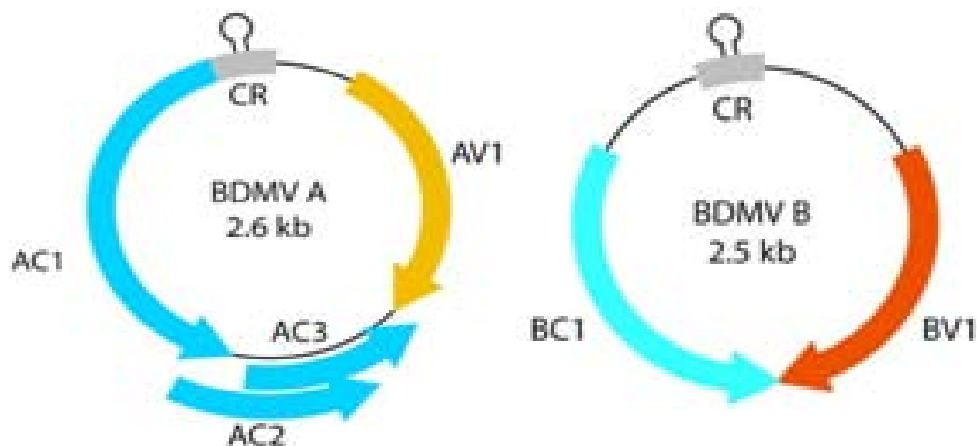


Figura 1. Genoma de un *Begomovirus* bipartita. Tomado de Gilbertson R. *et al.*, *Plant Cell*. 2003; 15 (11):2578-2591.

El virus del enrollamiento de la hoja de tomate (TYLCV- *Tomato yellow leaf curl virus*) es un *Begomovirus* monopartita (Figura 2) (Fauquet *et al.*, 2008) con un genoma de 2.7-2.8 Kb aproximadamente, el cual contiene seis marcos de lectura abiertos (MLA) sobrelapados bidireccionales y distribuidos en dos unidades transcripcionales divergentes que se encuentran separadas por una región intergénica de aproximadamente 300 pb (Rojas *et al.*, 2005; Font *et al.*, 2007); su material genético es aproximadamente homólogo al componente A de los *Begomovirus* bipartitas típicos donde los MLA correspondientes a los genes C1, C2 y C3 están involucrados con las funciones de replicación, transactivación y potenciador de la replicación, respectivamente. El MLA del gen de la precápside (V1) actúa como determinante de la patogenicidad mientras que el MLA correspondiente al gen V2 codifica para la proteína de la cápside, a la vez que posibilita al virus para causar infección sistémica en tomate, hecho que redonda

en un aumento significativo en el daño que este patógeno genera en este cultivo a nivel mundial (García-Andrés *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2005, Abou-Jawdah, 1999; Navot, 1991). TYLCV fue identificado por primera vez en Israel a finales de los años 1930 y desde entonces ha sido reportado infectando solanáceas en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo (Ueda *et al.*, 2004; Moriones y Navas-Castillo, 2000).

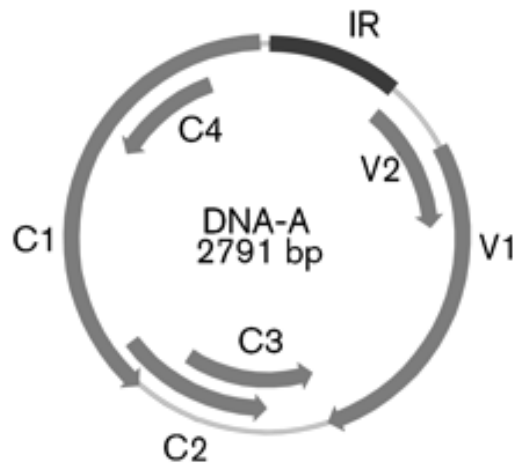


Figura 2. Genoma de un *Begomovirus* monopartita: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* - TYLCV. Tomado de Sinisterra *et al.*, *J. Gen. Vir.* 2005; 86: 1525-1532.

4.3.2 Familia *Virgaviridae*.

Esta familia viral, recientemente creada por el Comité Internacional de Taxonomía Viral, está constituida por los géneros *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* y *Tobravirus* (Adams *et al.*, 2009).

Los viriones de los *Tobamovirus* se caracterizan por ser cilindros rígidos alargados, de aproximadamente 18 nm de diámetro y 300-310 nm de longitud, con un orificio en la parte central y de simetría helicoidal; poseen un genoma de ARN de cadena sencilla (ARNss) y polaridad positiva (son su propio ARNm) con una longitud de 6.3 - 6.6 Kb, el cual codifica para cuatro proteínas: una metiltransferasa/helicasa y una replicasa (Rep), con un peso molecular de 130 y 180 KDa, respectivamente; una proteína de la cápside (CP) que posee dos unidades proteicas con un peso de 17,5 KDa y 30KDa, respectivamente; esta última está relacionada con el movimiento célula-célula (MP) (Figura 3) (Fujisaki e Ishikawa, 2008; Van Regenmortel, 2000).

Los *Tobamovirus* se clasifican en dos subgrupos: subgrupo 1, al cual pertenecen los virus *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepper mild*

mottle virus (PMMV) y *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) que infectan principalmente solanáceas; subgrupo 2, este contiene las especies *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) y *Sunn-hemp mosaic virus* (SHMV) que infectan cucurbitáceas y legumbres, respectivamente (Letschert *et al.*, 2002). Estos virus se distribuyen a nivel mundial, usualmente poseen un rango de hospederos muy reducido y la transmisión se presenta principalmente por inoculación mecánica en el género *Tobamovirus*, mientras que para otros miembros de esta familia la transmisión se puede presentar a través de las semillas o por el polen (Adams *et al.*, 2009; Van Regenmortel, 2000).

Inicialmente la diferenciación de los virus pertenecientes al género *Tobamovirus* se basó en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside (CP), posteriormente los métodos serológicos permitieron establecer una correlación entre la diferenciación serológica y la composición aminoacídica de CP para la diferenciación de géneros. Sin embargo, las reacciones heterólogas generadas por los anticuerpos policlonales dificultaban la diferenciación de las especies dentro de un mismo subgrupo y por lo tanto se requería una selección adecuada de los antiseros convirtiéndose así, en una técnica muy laboriosa. Con el desarrollo de técnicas moleculares como la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) y los marcadores moleculares tipo RFLP (restricción de fragmentos de longitud polimórfica) se pudo identificar las diversas especies que pertenecían a un mismo género, dando lugar a la claridad taxonómica del género y la identificación de los patógenos (Letscher, 2002).

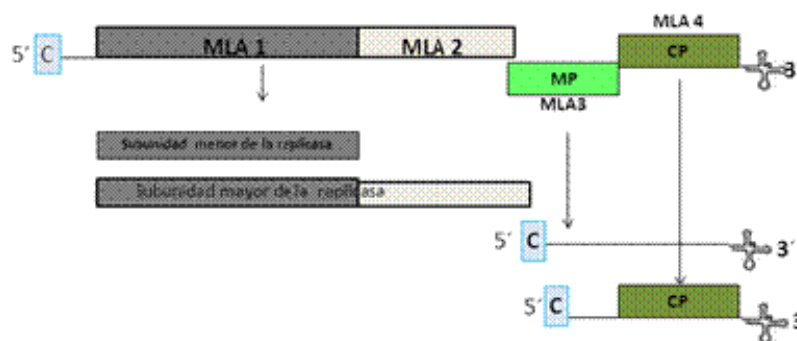


Figura 3. Genoma del género *Tobamovirus*. Tomado y modificado de Viral Zone. Disponible en http://education.expsy.org/images/Tobamovirus_genome.jpg

4.3.3 Familia *Bromoviridae*

Esta familia esta constituida por los géneros *Alfavirus*, *Ilarvirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* y *Oleavirus*. El *virus del mosaico del pepino* (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV) se considera la especie representativa de los *Cucumovirus*, infectando más de 1200 especies de plantas, constituyéndose en el virus de ARN con más amplio rango de hospederos (Ali y Kobayashi, 2010). CMV es transmitido de una manera no persistente por 80 especies de áfidos aproximadamente. En tomate el vector mas eficiente y más estudiado en transmitir el virus es el áfido *Myzus persicae* (Pervaiz *et al.*, 2010).

El genoma de CMV se caracteriza porque sus viriones carecen de envoltura, con un diámetro entre 26- 35 nm de simetría icosaédrica. El genoma es monomérico, segmentado y tripartita, constituido por ARNs lineales de polaridad positiva (denominados ARN 1, ARN 2 y ARN 3) y una partícula subgenómica (denominada ARN 4) derivada de ARN3 (Figura 4). Los segmentos se encuentran distribuidos en tres tipos de partículas de diferente tamaño: ARN 1 y ARN 2 se encapsidan en partículas diferentes; ARN3 y ARN 4 son encapsidados juntos. El tamaño del genoma oscila entre 7900- 8910 nucleótidos. ARN1 y ARN2 codifican para proteínas que se encuentran relacionadas con replicación, ARN 2 también codifica para una proteína supresora del silenciamiento génico post-transcripcional y además se relaciona con múltiples funciones que incluyen movimiento a larga distancia y rango de hospedero, ARN3 codifica para la proteína de movimiento y ARN 4 codifica la proteína de la cápside (James *et al.*, 2005).

Varios autores entre los años 1983-1998 reportaron la división de las diferentes cepas de CMV en dos subgrupos denominados I y II, mediante resultados obtenidos por métodos serológicos, mapeo peptídico de CP, similitud en secuencias de nucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y combinación de las técnicas moleculares RT-PCR y RFLP (Eiras *et al.*, 2004). En el año 1999, el alineamiento de las regiones 5'UTR (regiones no traducidas) de ARN 3 de 26 cepas de CMV, condujo a la subdivisión del subgrupo I en IA y IB, llegándose a la conclusión que el subgrupo IB y II se encuentran muy relacionados y por lo tanto podrían tener un ancestro común, además se expuso la posibilidad que el subgrupo IA evolucionó a partir del subgrupo IB (Roossinck *et al.*, 1999). El cultivo de tomate puede ser afectado por los tres subgrupos de CMV (Pervaiz *et al.*, 2010)

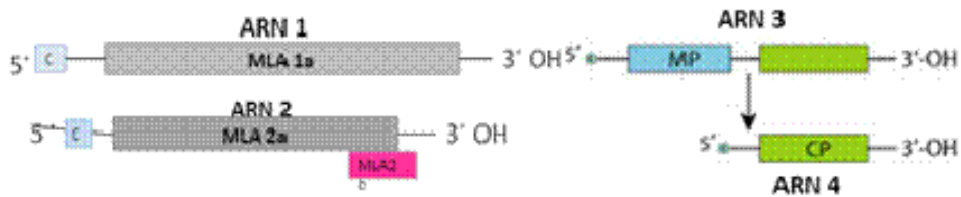


Figura 4. Genoma del género *Cucumovirus*. Tomado y modificado de Viral Zone. Disponible en: http://education.expasy.org/images/bromoviiridae_genome.jpg

4.3.4 Familia *Potyviridae*

Los virus pertenecientes a la familia *Potyviridae* poseen genomas ARNs poliadenilados, encapsidados en partículas filamentosas. Los viriones presentan forma alargada, flexible, sin envoltura, con un diámetro de 11-15 nm (Chen *et al.*, 2001).

Los géneros que constituyen esta familia son *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Brambyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus* y *Bymovirus* (Chen *et al.*, 2001). Algunos miembros de esta familia viral tienen un rango de hospedero muy limitado, otros infectan un número intermedio de plantas; con relación a sus vectores son muy diversos encontrándose áfidos, hongos y mosca blanca, entre otros. (Dombrovsky, 2005).

Los *Potyvirus* poseen en su genoma un MLA que produce una poliproteína que es escindida por proteinasas propias del virus para dar origen a las proteínas involucradas en el proceso de infección y movimiento (Figura 5). El virión posee una proteína unida al genoma denominada VPg en el extremo 5' y en el extremo 3' una cola poliA; las funciones relacionadas con movimiento se encuentran en el extremo amino y las funciones de replicación se encuentran en el extremo carboxilo de la poliproteína (Adams *et al.*, 2005; Urcuqui-Inchima, 2001).

Todos los miembros de esta familia generan inclusiones citoplasmáticas (CI) durante la infección con actividad de helicasa y ATPasa, además poseen otras proteínas como NIa (inclusión nuclear pequeña) con dominio VPg y actividad proteínasa, NIb relacionada con procesos de replicación, HC-Pro es el componente ayudador relacionado con movimiento sistemático, P3 participa en replicación, CP posee varias funciones tales como encapsidamiento del ARN viral, transmisión por áfidos, movimiento sistemático y célula –célula y regulación de la amplificación del ARN viral. (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009).

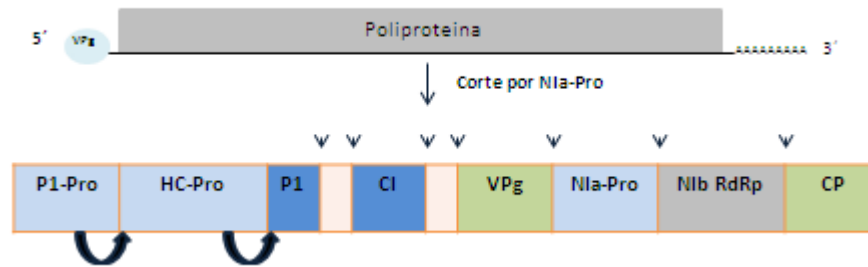


Figura 5. Genoma del género *Potyvirus*. Tomado y modificado de Viral Zone. Disponible en: http://education.expasy.org/images/potyviridae_genome.jpg

4.3.5 Familia *Bunyviridae*

Esta familia está constituida por los géneros *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus*, de los cuales sólo los últimos infectan plantas (Haan, 1992).

Los *Tospovirus* presentan viriones esféricos o pleomórficos, con un diámetro de 80-120 nm y simetría helicoidal; presentan envoltura con glucoproteínas orientadas hacia la superficie, la cual se deriva de membranas del complejo de Golgi o en ocasiones de membranas de la superficie celular; poseen un genoma con tres moléculas de ARN cadena sencilla (ARNss) con polaridad negativa (no son su propio ARNm), denominados L (Largo), M (medio) y S (pequeño) y estos segmentos pueden circularizarse gracias a la presencia de segmentos complementarios (Figura 6). Codifican dos marcos de lectura abiertos (MLA) para cuatro proteínas: dos proteínas internas, la proteína L (ARN polimerasa) codificada por el segmento L, la proteína de la nucleocápside codificada por el segmento S y las dos glucoproteínas de superficie (G1 y G2) codificadas por el segmento M (Pappu *et al.*, 2009).

Los *Tospovirus* infectan un amplio rango de cultivos que son de importancia económica así como algunas plantas nativas en diferentes partes del mundo, son transmitidos por trips de forma circulativa propagativa. El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) fue el primer *Tospovirus* identificado convirtiéndolo en la especie representativa de este género, *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) fue el segundo *Tospovirus* identificado, seguido por la descripción de otros miembros de este género en todo el mundo. TSWV e INSV se han identificado en algunos países de Centro y Suramérica así como en el Caribe. En Brasil y Argentina se ha reportado a TSWV como una de las enfermedades virales que causan pérdidas en cultivos

de tomate y pimentón mientras que en Chile se ha reportado un incremento de la infección en cultivos de lechuga (Pappu *et al.*, 2009).

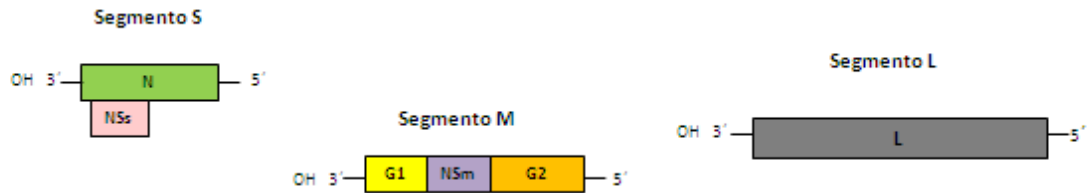


Figura 6. Genoma del género *Tospovirus*. Tomado y modificado de Viral Zone. Disponible en: http://education.expasy.org/images/Bunyaviridae_genomes.jpg

4.3.6 Familia Closteroviridae

Es una familia de virus constituido por ARN largos y complejos que infectan plantas superiores; se dividen en tres géneros *Closterovirus*, *Crinivirus* y *Ampelovirus*.

Los virones son filamentos flexibles, con un diámetro de 12nm y una simetría helicoidal donde por cada vuelta de la hélice poseen cerca de 10 subunidades proteicas y una longitud variable de acuerdo al género y/o especies individuales. Los genomas pueden ser mono o bipartitas, constituidos por una molécula lineal de ARNs con polaridad positiva, en el extremo 5' presenta una guanina metilada pero carece de un extremo 3' poliadenilado (Figura 7). El tamaño del genoma se encuentra relacionado con la longitud de la partícula, al igual que la organización, número y posiciones de los marcos de lectura abiertos (MLA). El genoma de los crinivirus posee dos MLA; MLA 1a (ORF1a) que codifica una poliproteína que es escindida para dar origen a los productos funcionales tales como la proteína de la cápside (CP), el homólogo de la proteína de choque térmico (Hsp70), entre otros, y el MLA 1b (ORF 1b) que codifica la expresión de la replicasa. (Tatineni *et al.*, 2008).

Los virus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) pertenecientes al género *Crinivirus*, transmitidos por el insecto-vector mosca blanca de forma semi-persistente, son considerados especies emergentes que están expandiéndose rápidamente e infectan entre otros, cultivos de tomate a nivel mundial (Wintermantel *et al.*, 2006).

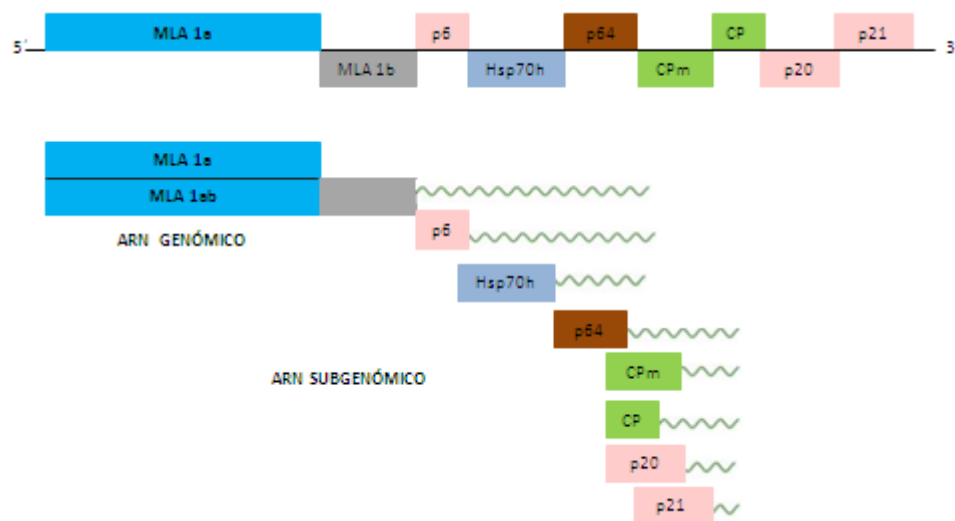


Figura 7. Genoma del género *Crinivirus*. Tomado y modificado de Viral Zone. Disponible en: http://education.expsasy.org/images/Closteroviridae_genome.jpg

4.4 HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES VIRALES

El desarrollo de métodos de diagnóstico empleados para la detección de patógenos en plantas tales como la microscopia de transmisión electrónica, pruebas serológicas como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) y anticuerpos monoclonales se direccionaron a la detección de enfermedades virales y fueron por mucho tiempo las únicas técnicas empleadas para detectar y diagnosticar este tipo de enfermedades en plantas. Con el advenimiento de las técnicas fundamentadas en la biología molecular tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación de ácidos nucleicos se ha incrementado la posibilidad de detectar patógenos en plantas a pesar de encontrarse en bajas concentraciones; así mismo las técnicas moleculares han permitido la identificación exacta de los virus y el establecimiento de las posibles relaciones filogenéticas entre ellos (Martin, 2000).

4.4.1 Microscopia de transmisión electrónica

La microscopía de transmisión electrónica (TEM) se emplea como una herramienta de detección e identificación que permite observar partículas virales así como alteraciones ultraestructurales causadas por los virus durante la infección en la planta, es por tanto una estrategia confiable en el momento de determinar características específicas de algunos grupos de virus dependiendo para su identificación de la abundancia de las partículas virales en la muestra

analizada (Zechmann-Zellnig, 2009; Putnam, 1995). La TEM se convierte en una técnica muy laboriosa y costosa en aquellos casos donde los cambios ultraestructurales inducidos por virus son importantes para la identificación de la enfermedad como aquellos generados por infecciones mixtas con virus semejantes, síntomas similares a los desarrollados por otros virus, poca cantidad de virus en la muestra y variación en el tamaño de los virus entre otros (Zechmann-Zellnig, 2009).

4.4.2 Diagnóstico por método serológico

El diagnóstico y la detección de virus que infectan plantas por medios serológicos se ha venido desarrollando desde 1960 (Martin, 2000); en el año de 1971, Engvall y Perlmann desarrollaron la técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), la cual fue empleada inicialmente para la detección de enfermedades infecciosas en animales y humanos, y posteriormente modificada para la detección de virus en plantas (Salazar, 1995). La técnica se basa en la producción de un conjugado anticuerpo-enzima en donde ambas moléculas retienen sus propiedades individuales, el principio básico de esta técnica es la unión del antígeno al anticuerpo, a la vez que la enzima detecta y amplifica la reacción (Crowther, 2001; Salazar 1995). Este método rutinario de diagnóstico para virus vegetales, presenta varias ventajas tales como: análisis de gran número de muestras con gran fiabilidad y bajo costo económico, análisis de las muestras con poca cantidad de antisuero, obtención de resultados de forma cuantitativa y realización de las pruebas sin importar la morfología. La principal desventaja de la técnica es que se evidencian reacciones cruzadas con otros virus, a la vez que se necesitan concentraciones altas del virus para lograr una detección eficiente (Agrios, 2004; Roncato, 2002).

4.4.3 Diagnóstico Molecular

Técnica Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés) fue desarrollada por Kary Mullis en 1985; esta técnica permite la síntesis específica y exponencial de una región determinada de ADN mediante el uso de primers o iniciadores (secuencias específicas de nucleótidos) que hibridan con la secuencia blanco dejando un extremo 3'OH libre requerido para que la ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa) inicie la síntesis de la cadena de ADN complementaria en dirección 5' → 3'. La PCR es un proceso cíclico donde la muestra de ADN inicialmente es desnaturizada para obtener cadenas sencillas, esto se consigue por calentamiento generalmente a una temperatura de 94°C por un lapso de 30 segundos a 5 minutos; la hibridación de los iniciadores se realiza

reduciendo la temperatura entre 40°C y 65°C (dependiendo de la longitud de la región a amplificar) y después del primer paso de hibridación la temperatura se aumenta a 72°C para favorecer la acción de la ADN polimerasa, repitiéndose el ciclo un determinado número de veces. El proceso permite que cada amplificado sirva como molde para las subsecuentes rondas de amplificación (Pelt-Verkuil, *et al.*, 2008). La PCR es altamente sensible, específica, eficiente y reproducible permitiendo la identificación y caracterización de especies mediante el diseño adecuado de iniciadores específicos (Rampersad, 2003; Rojas, 2000; Li, 2004).

Técnica PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que permite cuantificar el ADN amplificado, el cual es proporcional a la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación. Esta técnica ha sido desarrollada para estudios de expresión génica y/o regulación, detección de ácidos nucleicos específicos presentes en diferentes tipos de muestras, así como para el diagnóstico e identificación de virus en el momento inicial del proceso de desencapsidación. La alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de la técnica son las principales características que justifican su aplicación en la detección y comparación de patógenos (Ruiz-Ruiz, *et al.*, 2007).

Técnica Hibridación de ácidos nucleicos

La hibridación de ácidos nucleicos fue desarrollada por Spiegelman en 1964; se basa en las propiedades de desnaturalización y renaturalización del ADN (Mason *et al.*, 2008; Salazar, 1995). La técnica consiste en el apareamiento específico que ocurre entre cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias, por medio de sondas, las cuales son pequeños fragmentos de ADN o ARN sintetizados *in vitro*, que se marcan con sustancias radiactivas o no radioactivas con el fin de posibilitar su detección y así identificar de forma estricta una secuencia de ácido nucleico de interés, ya que las sondas son especie específica (Mason *et al.*, 2008; Quiñónez, 2003). Esta técnica es útil para la detección de virus cuando se necesita procesar un gran número de muestras, además es eficiente para la detección viral en el vector biológico (Mason, 2008); las ventajas de este método sobre el diagnóstico serológico es la posibilidad de emplear el genoma completo o solo algunas regiones específicas del virus para producir una sonda con especificidad predeterminada, mientras que los métodos serológicos detectan epítopes en la cubierta proteica que corresponde a una pequeña porción del genoma (Salazar, 1995).

5. METODOLOGÍA

5.1 LOCALIZACIÓN

Esta investigación se desarrolló en los laboratorios de Fitopatología y Biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

5.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

La recolección de las muestras se realizó tanto en cultivos a cielo abierto como en invernaderos en 29 municipios de zonas productoras de tomate de la región andina Colombiana distribuidos así: Valle del Cauca (9), Boyacá (2), Cundinamarca (3), Antioquía (3), Santander (7), Risaralda (2) y Caldas (3) donde se cultivan diversas variedades de tomate (Vaca-Vaca *et al.*, 2011).

Las muestras de hojas jóvenes recolectadas presentaban síntomas tales como: clorosis, epinastias, deformación en hojas, mosaicos y enanismos (Figura 8).

Tanto los cultivos como el material recolectado fue fotografiado y georeferenciado con el GPS Garmin®, posteriormente las muestras se depositaron en papel aluminio y se almacenaron en bolsas plásticas con cierre hermético (Ziploc®). Cada muestra recolectada se etiquetó con los siguientes datos: lugar de recolección (Departamento, municipio, Vereda, Finca, datos de GPS, fecha de recolección, descripción de síntomas y edad de la planta recolectada); las muestras fueron llevadas al laboratorio en nevera a 4°C, el material recolectado fue macerado con nitrógeno líquido (N₂) y almacenado en tubos falcon de 15 ml (debidamente etiquetados) a – 80°C para su preservación y posterior análisis.

5.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN se tomó 100 mg de tejido macerado y se empleó el kit ADNasy Plant Mini Kit (QIAGEN®) siguiendo la metodología descrita por el fabricante. Para determinar la calidad y concentración del ADN extraído se tomó como referencia ADN del bacteriófago Lambda a una concentración de 30, 60 y 90 ng/μl, con el cual se estableció un patrón comparativo con las muestras de ADN total en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador (BioRad) y fotografiados empleando el software Quantity One – 4.6.5 provisto por el fabricante del equipo. Una vez cuantificado el material genético se almacenó a -20°C.

5.4 EXTRACCION DE ARN

La extracción del ARN se realizó a partir de 100 mg de tejido fresco ó 30 mg de material liofilizado empleando TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen[™]) y siguiendo la metodología descrita por el fabricante. La calidad del ARN extraído fue verificada en un corrido electroforético en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador de BioRad y fotografiados empleando el software Quantity One – 4.6.5 provisto por el fabricante del equipo; el ARN fue almacenado a – 20°C.

5.5 SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Para la síntesis del ADNc a partir del ARN total extraído se emplearon dos kit: *Reverse Transcription System* (Promega, Madison, Wi) y el *First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas Inc.). El ADNc se sintetizó empleando tanto los iniciadores oligo-dT, como los iniciadores al azar, en ambos casos se desarrollo el protocolo siguiendo las indicaciones descritas por los fabricantes y se emplearon para los ensayos de RT-PCR.

5.6 ENSAYOS DE PCR Y RT-PCR

Una vez realizada la extracción de ADN y la síntesis de ADNc se procedió con la estandarización de las condiciones de PCR para la identificación de los diferentes virus que afectan tomate haciendo uso de pares de iniciadores específicos para cada uno de los géneros estudiados (Tabla 2). Para los ensayos de PCR y RT-PCR se preparó una mezcla de reacción de 25 µl, la cual contenía Buffer 10X, MgCl₂ 2.0 mM, dNTP 2.5 mM, Iniciadores 2.5 mM, Taq polimerasa 0,5 U, 100 ng de ADN o cADN. La reacción de amplificación se realizó en los termocicladores iCycler y C1000 (Biorad) empleando condiciones específicas para cada género viral según lo reportado en la literatura (Tabla 2). Los productos de PCR amplificados fueron observados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) visualizado en un transiluminador de BioRad y fotografiado empleando el software Quantity One– 4.6.5 provisto por el fabricante del equipo.

5.7 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Los productos de PCR que amplificaron el fragmento esperado fueron purificados empleando el Kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Madison, Wi), clonados en el vector comercial p-GEM T-easy (Promega, Madison, Wi) y

transformados en células de *E. Coli* one-shot (Invitrogen®) empleando el electroporador 2510 de Eppendorf® y siguiendo la metodología descrita por Sambrook y Rusell (2001).

Las colonias positivas se pusieron a crecer durante toda la noche a 37°C y con agitación constante en medio LB que contenía ampicilina (100µg/ml). Los plásmidos se extrajeron empleando la metodología descrita por Birnboim y Doly (1979) y purificados con el kit QIAprep®Spin Miniprep (QIAGEN®). Una vez extraído el plásmido se verificó la presencia del inserto realizando digestión con la enzima *EcoRI* y visualizando por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% (P/V) teñidos con bromuro de etidio.

Los fragmentos clonados se enviaron a secuenciar a Macrogen (Korea) y a la unidad de secuenciación de CINVESTAV (México) empleando los iniciadores SP6 y T7.

Tabla 2. Iniciadores empleados para la identificación de virus que infectan tomate.

Virus	Región amplificada	Nombre del iniciador	Fragmento amplificado	Tm*	Referencia
<i>Begomovirus monopartitas</i>	Región 5' del gen Rep y Gen CP	Rep/DGR Cpc70-Rev	1100 pb	62°C	Secuencia facilitada por el doctor Gerardo Arguello-Astorga (IPICYT) Mexico
		Rep/WAR Cpc 70-Rev	1400 pb		
	Región media del gen Rep.	TYC1F TYC1R	856 pb	55°C	Lapidot, 2002
	Gen Rep	OTYA3 OTYA6	649 pb	55°C	Morilla <i>et al</i> , 2005
	TYLCV-Mld	TYV1R TYMM2	1237 pb	50°C	Polston <i>et al</i> . 2006

Begomovirus bipartitas	Componente A	PAL1v1978 PAR1c496	1100 pb	55°C	Rojas et al, 1993
	Componente B	PBL1v2040 PCRC1	600 pb	55°C	
ToMV	Gen CP	ToMV-R ToMV-F	500 pb	50°C	Jan et al., 2009
TSWV	Gen NP	TSWV-R TSWV-F	800 pb	50°C	Jain et al., 1998
CMV	Gen CP	CMV-R CMV-F	586 pb	50°C	Herrera- Vásquez, 2009
Potyvirus	Gen CP	PVY1 PVY2	900 pb	47°C	Cardin et al , 2008
	Gen NIb	S y M4	1700 pb	47°C	Chen et al, 2001
	Gen CP y gen NIb	POT1 POT2	1300- 450pb	47°C	Colinet et al, 1993
PepMV	Gen RdRp	PepMV-R PepMV-F	312 pb	55°C	French et al., 2001
ToCV	Gen p22	ToCVp22-R ToCVp22-F	650 pb	50°C	Castro et al., 2009
	Gen Hsp70	ToCVHsp70 -R ToCVHsp70 -F	420 pb	50°C	
	Gen CP	ToCVCPm- R y ToCVCPm- F	449 pb	50°C	
ToTV	ARN1	TR1-R TR1-F	573 pb	50°C	Pospieszny et al., 2007
	ARN2	TR2-R TR2-F	892 pb	47°C	

*Temperatura de alineamiento.

5.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

La secuencia de nucleótidos obtenida en cada caso se editó empleando el programa Vector-Screen (www.ncbi.nlm.nih.gov) y la identidad de los virus se

confirmó mediante comparación con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) empleando el algoritmo Blast-n (www.ncbi.nlm.nih.gov). Una vez conocida la identidad molecular de los virus se seleccionaron secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (GenBank) y se realizó un alineamiento múltiple con la región 5' del gen de la proteína de la cápside con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997).

Las filogenias para los virus identificados se realizaron con secuencias reportadas para cada uno de estos virus en la base de datos del NCBI, estos análisis bioinformáticos se realizaron con el programa MEGA 5.01® (Tamura *et al.*, 2011). La similitud genética se calculó con el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (Nei, 1978) y el método estadístico máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) para secuencias de nucleótidos y por último se realizó una matriz de identidad con el programa BioEdit® (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)

5.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las filogenias para los virus identificados se realizaron con secuencias reportadas para cada uno de estos virus en la base de datos del NCBI (Tabla 4 y 5), éstos análisis bioinformáticos se realizaron con el programa MEGA 5.01® (Tamura *et al.*, 2011). La similitud genética se calculó con el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (Nei, 1978) y el método estadístico máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) para secuencias de nucleótidos y por último se realizó una matriz de identidad (Tabla 4 y 5) con el programa BioEdit® (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)

Tabla 3. Origen y número de accesoión en GenBank de secuencias de nucleótidos de aislamientos de ToMV usados en los análisis filogenéticos

Aislamiento ToMV	Número de Accesoión	Origen	Código filogenia
China	AJ011934	China	ToMV-China S1
DSMZPV-472	AJ429086	Alemania	ToMV-Ale
S25	JF810439	España	ToMV-Esp
Potato 1	AF260730	Korea	ToMV-Kor
Hibiscus Rosa-sinensis	AY313136	China	ToMV-China
Sao Paulo	AF411922	Brasil	ToMV-Br
Lisianthus	AY383730	Taiwan	ToMV-Lis
Camellia	AJ417701	China	ToMV-Cam
T15	JN381943	España	ToMV- T15
T16	HQ593626	Irán	ToMV-T16

Tabla 4. Origen y número de accesión en GenBank de secuencias de nucleótidos de aislamientos de CMV usados en análisis filogenéticos

Aislamiento CMV	Subgrupo	Número de Accesión	Origen	Código filogenia
NT9	IB	D28780	Taiwan	CMV_NT9
Nueva_Delhi	IB	GU111229	India	CMV_Nueva_Delhi
Mf	IA	AJ276481	Korea	CMV_Mf
FNY	IA	D10538	USA	CMV_FNY
NY	IA	U22821	Australia	CMV_NY
C	IA	D00462	USA	CMV_C
Musa	IA	U32859	Colombia	CMV_Musa
IX	IB	U20219	Filipinas	CMV_IX
Phys	IB	X89652	India	CMV_Phys
PAN2	IA	EU934036	Panamá	CMV_PAN2
M2	II	AB006813	Japón	CMV_M2
Sn	II	U22822	Australia	CMV_Sn
WL	II	D00463	USA	CMV_WL
BKD	II	AJ131621	Noruega	CMV_BKD
S	II	AJ131620	Sudáfrica	CMV_S

5.10 PCR-RFLP

La técnica PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) se empleó para conocer la identidad del componente A de Begomovirus bipartitas amplificado en muestras de tomate chonto y tomate cherry recolectadas en el municipio de Palmira (Valle del Cauca) durante el año 2010. El fragmento de 1100 pb amplificado del componente A se digirió con la enzima de restricción PstI cuya mezcla de reacción se realizó siguiendo la metodología descrita por el fabricante (Invitrogen®). Esta misma enzima de restricción fue empleada por Vaca-Vaca *et al.* (Artículo aceptado para publicación en la revista colombiana de biotecnología, 2012) en muestras recolectadas en el Valle del Cauca durante el periodo 2008-2009 para análisis de diversidad genética de begomovirus. Los fragmentos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador de BioRad y fotografiados empleando el software Quantity One – 4.6.5 provisto por el fabricante del equipo.

5.11 HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TIPO DOT BLOT

Con el objetivo de conocer la reproducibilidad, especificidad y sensibilidad de la hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot y con el fin de emplearla a futuro

como una herramienta de diagnóstico rápido de virus en cultivos de tomate. Se emplearon como sondas los fragmentos virales clonados en el vector p-GEM T-easy (Promega, Madison, Wi), secuenciados y analizados con herramientas bioinformáticas.

Para el marcaje de las sondas se evaluaron dos kit: Biotin DecaLabel™ ADN Labeling (Fermentas Inc.) y Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). El marcaje se realizó siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Para determinar la concentración mínima de detección de la sonda, se realizó 10 diluciones de 1/10 del producto de PCR de donde se obtuvo la sonda. Una vez realizadas las diluciones se depositó 1 ul de cada una de ellas sobre una membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech), el ADN se fijó durante 2 horas a 80°C, el protocolo de detección de la señal de hibridación se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por los fabricantes de los kit Biotin DecaLabel™ ADN Labeling (Fermentas Inc.) y Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Una vez realizado el marcaje de las sondas se procedió con los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot, empleando muestras de ADN, ARN y ADNc.

La hibridación para muestras de ADN y ADNc se realizó sobre una membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) sobre la cual se depositó 5 ul del material genético a una concentración de 50ng/ul y se fijó a 80°C durante dos horas, posteriormente se realizó el proceso de prehibridación, hibridación y detección de la señal de acuerdo a la metodología descrita por los fabricantes de los kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas Inc) y Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La detección de la señal con el kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas Inc) se realizó al observar una coloración violeta en aquellas muestras donde se presentó hibridación con la sonda, mientras que con el kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) la detección de la señal por fluorescencia se realizó con luz U.V. empleando un transiluminador de BioRad.

Para la hibridación de muestras ARN, sobre una membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) se depositaron 5 ul de ARN total extraído de muestras recolectadas en los departamentos de Santander y Valle del Cauca (Vaca-Vaca *et al.*, 2011) incluyendo aquella donde se detectó la presencia del virus. La fijación del ARN a la membrana se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sambrock y Rusell (2001) para evitar su degradación; la fijación se realizó a 80°C durante 2 horas, posteriormente se realizó el proceso de prehibridación, hibridación y detección de la señal de acuerdo a la metodología

descrita por el fabricante del kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ¿Existen *Begomovirus* monopartitas pertenecientes a la familia *Geminiviridae* afectando el cultivo de tomate en Colombia?

El begomovirus monopartita *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) es un complejo viral transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*, biotipo *B*) que causa una de las enfermedades virales emergentes más devastadoras que afectan cultivos de tomate. El virus fue reportado por primera vez en Israel a finales de los años 1930 y desde entonces ha sido reportado en regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial. En América el virus ha sido reportado en Estados Unidos, México, Islas del Caribe (Cuba, República Dominicana y Jamaica), Venezuela y Brasil (Beth *et al.*, 2011; Zambrano *et al.*, 2007; Moriones-Navas Castillo, 2000). Las pérdidas económicas ocasionadas por TYLCV y la propagación mundial del virus ha generado muchas investigaciones en los últimos treinta años que conllevan al entendimiento de la biología molecular, la relación planta-virus-vector y epidemiología de la enfermedad viral con el objetivo de desarrollar estrategias que permitan controlar la propagación del virus (Beth *et al.*, 2011).

Por lo anterior, uno de los objetivos propuestos para el desarrollo del presente trabajo fue la detección e identificación del begomovirus monopartita *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en zonas productoras de tomate en Colombia. Para dar cumplimiento a este objetivo inicialmente se tomaron las muestras con sintomatología viral (Figura 8) recolectadas por Vaca-Vaca *et al.* (2011) y se realizó una hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot con el kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La sonda empleada para la detección de TYLCV presentaba una longitud de 1500 pb aprox. y consistía de un segmento parcial del gen Rep., la región intergénica y el gen CP. Esta sonda fue facilitada por el Doctor Gerardo Rafael Argüello-Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) en México.

Una vez realizada la detección por fluorescencia se observó hibridación en muestras provenientes de los departamentos de Valle del Cauca, Santander y Cundinamarca. (Figura 9). Estos resultados de hibridación permitieron seleccionar 22 muestras que presentaron una emisión fuerte de señal fluorescente con el fin de realizar ensayos de amplificación por PCR para clonar, secuenciar y analizar por métodos bioinformáticos los fragmentos virales obtenidos.

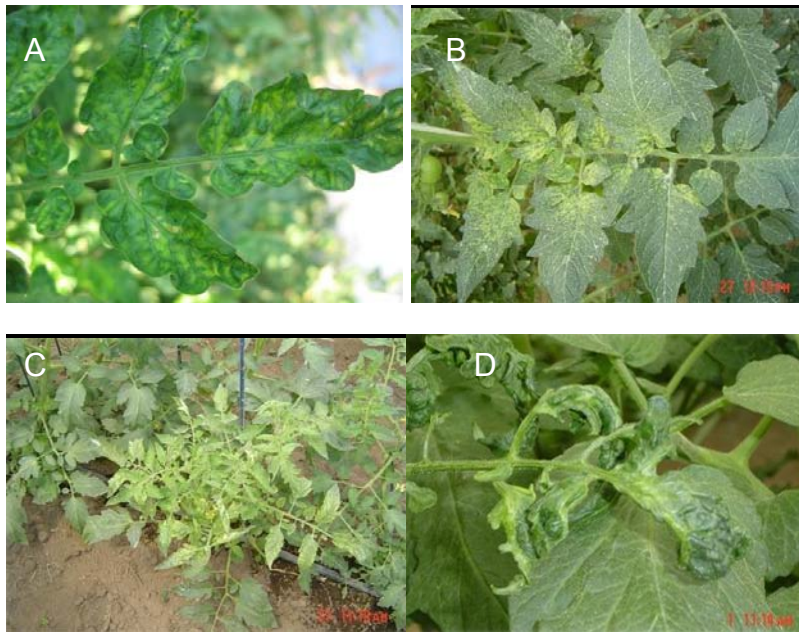


Figura 8. Plantas de tomate con sintomatología viral observada en las muestras recolectadas en campo. a) Clorosis b) Mosaico c) Enanismo d) Deformación en hojas.

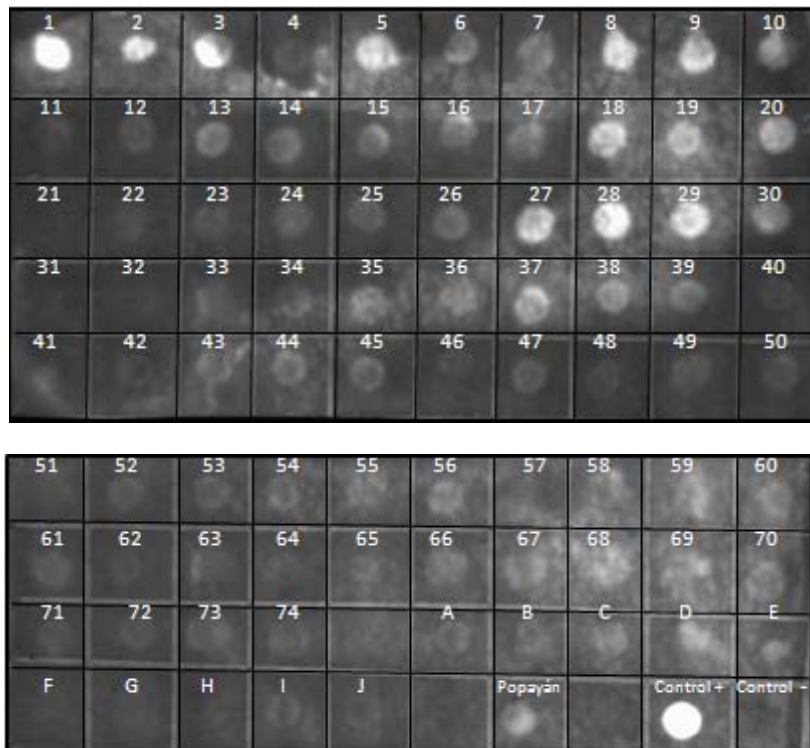


Figura 9. Hibridación tipo dot blot para 74 muestras de tomate comercial recolectadas en zonas productoras de tomate con un sonda para TYLCV. 1-8 muestra Valle del Cauca. 9-13. Muestras Boyacá. 14 y 15. Muestras Valle del Cauca. 16-

31 Muestras Cundinamarca. 32-49 Muestras Antioquia. 50-74 Muestras Santander. A-J Malezas.

Con el antecedente de los resultados de hibridación, los ensayos de amplificación se iniciaron con dos juegos de iniciadores que permitirían dar un acercamiento al tipo de cepa que posiblemente se encontraba en Colombia. Inicialmente se usaron los iniciadores OTYA3 y OTYA6 que permiten identificar cepas suaves de TYLCV (Morilla *et al.*, 2005) y amplifican un fragmento de 649 pb de gen Rep. Sin embargo, las muestras evaluadas dieron un resultado negativo (no amplificaron el fragmento esperado) a pesar de repetirse el ensayo en diversas ocasiones (datos no mostrados). Por lo tanto se realizó el ensayo con los iniciadores TYV1R y TYMM2 que amplifican un fragmento de 1237 pb de la cepa severa de TYLCV (Polston *et al.*, 2006) a las mismas muestras a las cuales se les hizo el análisis con los iniciadores OTYA3 y OTYA6. En este caso tampoco se obtuvo amplificado (datos no mostrados).

Los resultados negativos con los iniciadores para cepas suaves y severas condujeron a realizar ensayos con otro tipo de iniciadores específicos para TYLCV. Los iniciadores TY1F y TY1R reportados por Lapidot (2002) amplifican un fragmento de 856 pb correspondientes a la región media del gen de la proteína Rep. Para la amplificación se emplearon las veintidós muestras seleccionadas previamente de acuerdo a los resultados obtenidos por hibridación. De las veintidós muestras se observó un amplificado de 856 pb en una muestra de Cundinamarca y dos muestras de Santander (Figura 10). Los fragmentos amplificados fueron clonados y se enviaron a secuenciar. Al comparar los fragmentos de 860 nt secuenciados con la base de datos del GenBank empleando el algoritmo Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se encontró una identidad del 94% con el begomovirus bipartita *Potato yellow mosaic virus* (PYMV) aislamiento Martinica (número de accesoión AY126610.1).

Potato yellow mosaic virus (PYMV) solo se ha reportado infectando cultivos en la región del caribe y posiblemente este virus tiene homología la región media del gen Rep con TYLCV, razón por la cual los procesos de amplificación con este juego de iniciadores (TY1F yTY1R) para identificar TYLCV en regiones donde halla sido identificado PYMV puede conducir a falsos positivos y por lo tanto no se recomienda su uso. Estos iniciadores han sido ampliamente empleados para la identificación de TYLCV en el viejo mundo (donde se originó el virus), ya que allí no hay presencia de begomovirus bipartitas y por lo tanto los resultados de amplificación corresponden a TYLCV (Gal-on *et al.*, 2009; Lapidot, *et al.*, 2001),

Los resultados de secuenciación obtenidos con este juego de iniciadores pueden explicar la ausencia de amplificación que se presentó para cepas suaves y severas de TYLCV.

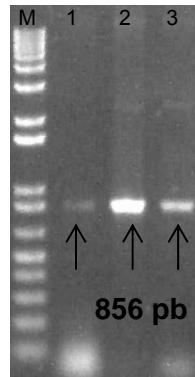


Figura 10. Identificación de TYLCV con los iniciadores TY1F y TY1R reportados por Lapidot (2002). Gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio. M. Marcador de peso molecular 1 Kb plus ladder de Invitrogen. 1. Muestra Cundinamarca 2 y 3. Muestras Santander

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos con los iniciadores TY1F y TY1R, a continuación se utilizaron los iniciadores Rep/DGR, Rep/WAR y Cpc 70 rev, cuya secuencia fue facilitada por el Doctor Gerardo Rafael Argúello Astorga de IPICYT (México), y que amplifican un TYLCV identificado en México (datos por publicar). Los iniciadores se combinaron de la siguiente manera: Rep/DGR y Cpc 70 rev; Rep/WAR y CpC 70 Rev para originar fragmentos de 1100 pb y 1400 pb respectivamente, correspondientes a la región 5' del gen Rep. y la región 200 del gen CP. Se evaluaron dos muestras (una muestra de Cundinamarca, una muestra de Santander) las cuales amplificaron con los iniciadores TY1F y TY1R. Los fragmentos amplificados presentaban un tamaño de 1000 pb para la combinación de iniciadores Rep/DGR- Cpc 70 y 1200 pb para la combinación de iniciadores Rep/War-Cpc 70 (Figura 11). Los fragmentos amplificados fueron clonados y enviados a secuenciar. Al comparar los fragmentos secuenciados con la base de datos del GenBank empleando el algoritmo Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se encontró una identidad del 90% con el begomovirus bipartita *Potato yellow mosaica virus* (PYMV) Clon An 5 reportado en las islas del Caribe (número de accesoión GU320572.1). Tanto los análisis bioinformáticos realizados a los fragmentos amplificados con los iniciadores TY1R y TY1F reportados por Lapidot (2002) como los análisis hechos a los fragmentos amplificados con los iniciadores Rep/DGR, Rep/War, Cpc70 corresponden a PYMV lo cual nos lleva a concluir que en las muestras recolectadas en el periodo 2008-2009 por Vaca-Vaca *et al* (2011) no se evidenció la presencia de TYLCV infectando cultivos de tomate en Colombia.

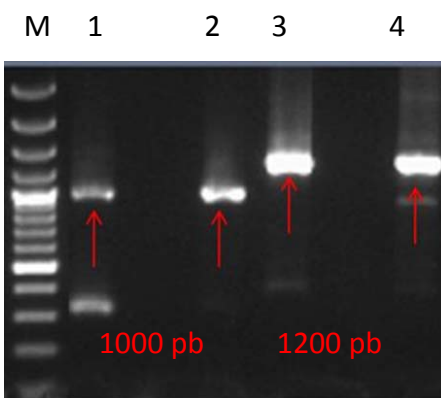


Figura 11. Identificación de TYLCV con los primers facilitados por el Doctor Gerardo Rafael Argúello Astorga de IPICYT (México). Gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio. M. marcador de peso molecular Hyperladder II 100 lanes Bioline. 1. Muestra Cundinamarca 2. Muestra Santander. Los fragmentos amplificados presentaban un tamaño de 1000 pb para la combinación de iniciadores Rep/DGR- Cpc 70 y 1200 pb para la combinación de iniciadores Rep/War-Cpc 70

6.2 Identificación de *Begomovirus bipartitas* en cultivos de tomate en los departamentos de Caldas y Risaralda

Durante el periodo 2008-2009 se recolectaron muestras de hojas jóvenes con sintomatología viral asociada a begomovirus en zonas productoras de tomate en los departamentos de Antioquía, Boyacá, Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca (Vaca-Vaca *et al.*, 2011) donde se identificó y caracterizó el begomovirus bipartita *Potato yellow mosaic virus-Colombia* (PYMV) y algunas de sus variantes (Betancur-Pérez, Tesis Doctoral, documento en elaboración). En el año 2011 se colectaron muestras con y sin sintomatología viral asociada a begomovirus en las localidades de Chinchiná y Palestina en el departamento de Caldas y en las localidades de Cerritos y Santa Rosa de Cabal en el departamento de Risaralda con el fin de identificar la presencia de begomovirus bipartita en esta región. La identificación por PCR se realizó empleando los iniciadores PAL1v1978 y PAR1c496 para el componente A (1100 pb) y los iniciadores PBL1v2040 y PCRC1 para el componente B (600 pb) reportados por Rojas *et al.* (1993).

De las muestras analizadas se observó amplificación de 1100 pb para el componente A en dos muestras de Caldas (recolectadas en las localidades de Chinchiná y Palestina) las cuales no presentaban sintomatología viral y una muestra de Risaralda (recolectada en la localidad de Cerritos) (Figura 12a). El componente B amplificó solo para una muestra recolectada en el departamento de Risaralda (localidad de Cerritos) (Figura 12b).

La amplificación por PCR de begomovirus bipartitas tanto en muestras sintomáticas como en muestras asintomáticas pone de manifiesto la importancia de un diagnóstico viral basado no solo basado en observación de sintomatología sino en la implementación de herramientas moleculares que permitan detectar de forma rápida y eficiente la presencia de infecciones virales en los cultivos. Además la identificación de este género viral en altitudes superiores a los 1300 m.s.n.m. en los departamentos de Caldas y Risaralda esta relacionada con las observaciones realizadas por Vaca-Vaca, *et al* (2011) de una posible adaptación del vector mosca blanca (*Bemisia tabaci* biotipo B) a nuevos nichos ecológicos lo cual favorece la rápida propagación de los begomovirus en aquellas zonas donde anteriormente no se encontraban, infectando así tanto cultivos de tomate como otros cultivos presentes en estas áreas.

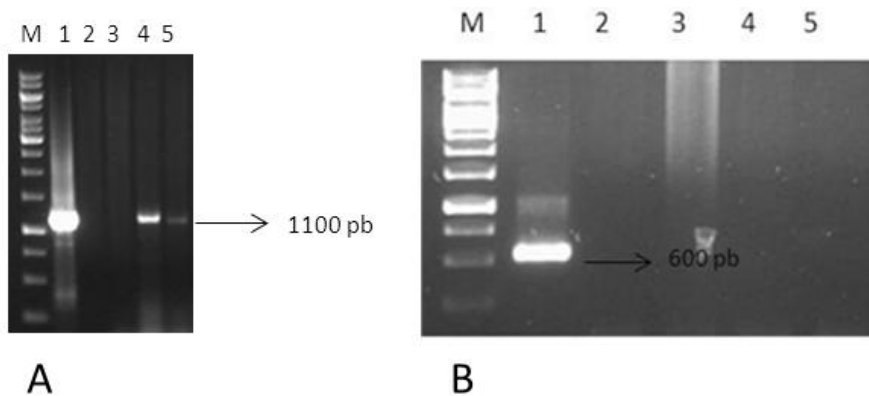


Figura 12. Identificación de Begomovirus bipartitas con iniciadores reportados por Rojas *et al.* (1993). A. Amplificación componente A; B. Amplificación componente B. Gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio. M. Marcador de peso molecular 1Kb de Fermentas. 1-2. Muestra Risaralda 3-5. Muestra Caldas.

Finalmente, para conocer la identidad molecular del begomovirus bipartita amplificado por PCR se realizó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot haciendo uso del kit Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La sonda empleada correspondía a un fragmento del componente A obtenido en una muestra recolectada en el municipio de Tuluá (Valle del Cauca) y previamente identificado como *Potato yellow mosaic virus* [Colombia], Número de accesión en GenBank JQ045705 (Betancur-Pérez, Tesis Doctoral, documento en elaboración). Sobre la membrana de nylon (Hybond N+) se depositaron 5 ul de ADN de todas las muestras recolectadas en los departamentos de Caldas y Risaralda. El protocolo de hibridación se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones. Al analizar la intensidad de la señal se observó que todas

las muestras recolectadas fueron positivas y por lo tanto se puede concluir que las muestras de Risaralda y Caldas se encuentran infectadas con *begomovirus* pertenecientes a la familia Geminiviridae relacionados con el virus PYMV (Figura 13). Además se confirma la importancia y sensibilidad de la hibridación de ácidos nucleicos en el diagnóstico cualitativo y cuantitativo de los virus en las plantas ya que puede detectar la presencia de estos virus en muestras que no amplificaron por PCR.

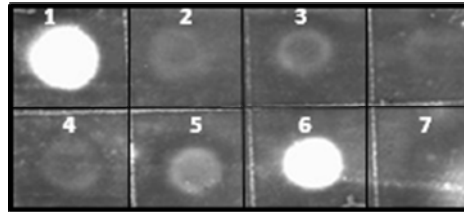


Figura 13. Hibridación tipo dot-blot en muestras de Risaralda y Caldas utilizando como sonda a PYMV. 1-2 Muestras Risaralda. 3-5 Muestras Caldas 6. Control positivo planta inoculada con PYMV 7. Control Negativo.

6.3 Detección de virus ARN que están afectando cultivos de tomate en Colombia de los géneros *Cucumovirus*, *Crinivirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus* y *Torradovirus*.

El cultivo de tomate es susceptible a la infección por un amplio número de virus ADN y ARN que causan pérdidas económicas significativas. Los virus ARN más relevantes que infectan tomate a nivel mundial incluyen entre otros: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Potato Y virus* (PVY) (Aparicio *et al.*, 2009).

De acuerdo a lo anterior este trabajo tuvo como objetivo realizar un análisis molecular de siete géneros de virus ARN (*Crinivirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Torradovirus*, *Cucumovirus* y *Tobamovirus*) (Tabla 5). Para desarrollar este objetivo se seleccionaron muestras recolectadas durante 2008-2009 (Vaca-Vaca *et al.* 2011). Además se incluyó muestras recolectadas en el año 2010 en el municipio de Palmira (Valle del Cauca); las muestras fueron seleccionadas por presentar sintomatología relacionada con virus ARN (datos no mostrados). Posteriormente se realizó extracción de ARN con TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen[™]) obteniéndose ARN de buena calidad en las muestras de Santander y Valle del Cauca (Figura 14). Mientras que de las muestras de Antioquia, Boyacá y Cundinamarca no fue posible obtener ARN de buena calidad y por lo tanto no se incluyeron en el análisis.

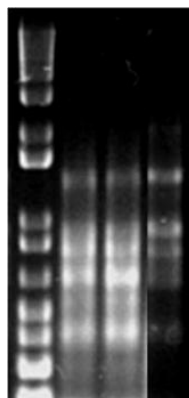


Figura 14. ARN extraído con TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen[™]) para muestras del Valle del Cauca

Tabla 5. Virus ARN analizados

Departamento	TSWV	ToCV	ToTV	PepMV	CMV	ToMV	Potyvirus
Antioquia	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Boyacá	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cundinamarca	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Santander	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Valle del Cauca	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

N.D.No Determinado

6.3.1 Detección e identificación molecular de *Tobamovirus (Tomato mosaic virus -ToMV)* en tomate cherry

En 2009, Morales y colaboradores reportaron la identificación por pruebas serológicas y por microscopía electrónica de la presencia del *tobamovirus* (TMV y/o ToMV) en cultivos de tomate chonto en los departamentos de César, Norte de Santander, Risaralda, Valle del Cauca, Antioquia y Nariño.

A partir del ARN purificado de muestras de tomate cherry recolectadas durante este estudio en el municipio de Palmira (Valle del Cauca) se sintetizó ADNc y por la técnica molecular RT-PCR se identificó el *Tobamovirus (Tomato Mosaic virus – ToMV)* al observarse un fragmento amplificado de 500 pb (Figura 15) correspondiente al gen de la proteína de la cápside. Este mismo tamaño de fragmento amplificado fue reportado por Jan *et al.*, (2009) en la planta ornamental

Lisianthus Eustoma russellianum (Don.). El fragmento amplificado fue clonado, secuenciado y depositado en la base de datos del Genbank. Al comparar el fragmento secuenciado de 508 nt en la base de datos Genbank empleando el algoritmo *Blast-n* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se encontró una identidad del 98% con la cepa T15 del gen de la proteína de la cápside de ToMV reportada en España (Número de accesión JN381943).

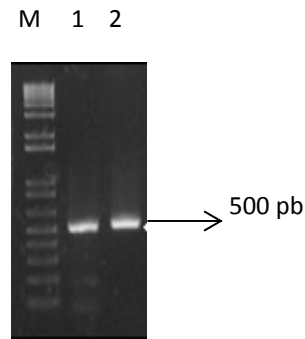


Figura 15. Identificación de *Tobamovirus* por PCR. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. 1, Marcador de peso molecular 1 Kb Plus ADN Ladder (Invitrogen); 2, 3, muestras de tomate cherry.

Con la identificación molecular de ToMV en tomate cherry (también llamado tomate tipo cereza, por su forma redondeada y tamaño) en el departamento del Valle del Cauca, se ve la necesidad de implementar estrategias que conlleven a mejorar las condiciones asépticas en los cultivos, lo cual permitirá reducir la incidencia del virus; más aún si se tiene en cuenta que: el virus puede ser transmitido de forma mecánica, la variedad cherry carece de resistencia a este patógeno y que la comercialización de esta variedad ha ido en aumento debido a la alta calidad organoléptica, desarrollada a partir del color, firmeza de fruto, sabor, grados Brix y contenido de antioxidantes derivados de la vitamina A tales como el licopeno y β - caroteno; los cuales ejercen un efecto positivo en la salud humana al neutralizar la acción de los radicales libres en el organismo. (Hanssen *et al.*, 2010; Soler *et al.*, 2010; Válcárcel, 2009; Macua *et al.*, 2008)

6.3.2 Análisis filogenético para *Tomato mosaic virus* (ToMV)

El análisis filogenético realizado con el programa MEGA 5.01® para ToMV basado en la proteína de la cápside (CP) de las secuencias seleccionadas de la base de datos del NCBI (Tabla 2) permitió observar la conformación de un grupo (Clado 1) de ToMV identificados en China, Korea, Alemania, Irán y España (Figura 16)

mientras que ToMV de Brasil se encuentra muy separado de los otros virus incluidos en el análisis filogenético.

Mediante el análisis filogenético también se pudo determinar la estrecha relación entre el clado 1 y ToMV identificado en el Valle del Cauca especialmente con el aislamiento ToMV T15 reportado en España con el cual presentó una identidad del 97% (Tabla 6), además ToMV Colombia muestra una relación más estrecha con ToMV Brasil que los virus pertenecientes al clado 1, sin embargo, al observar el árbol filogenético se puede deducir que ToMV Colombia proviene de Europa y no de Brasil, dado que la identidad con el aislamiento ToMV Brasil es del 84,3% (Tabla 6). Los resultados obtenidos con este estudio se encuentran muy relacionados con los análisis de evolución de CP de ToMV realizado por Rangel *et al.*, (2011), quienes analizaron 75 aislamientos de ToMV procedentes de España, Groenlandia, Irán, Kazakhanstan, China, Korea, Taiwan, Malasia, Estados Unidos y Brasil donde observaron una alta divergencia en los aislamientos procedentes de Brasil y una baja divergencia entre el resto de aislamientos analizados sugiriendo que Brasil o Suramérica pudo ser el origen de ToMV y que un genotipo se propagó por el resto del mundo (Rangel *et al.*, 2011).

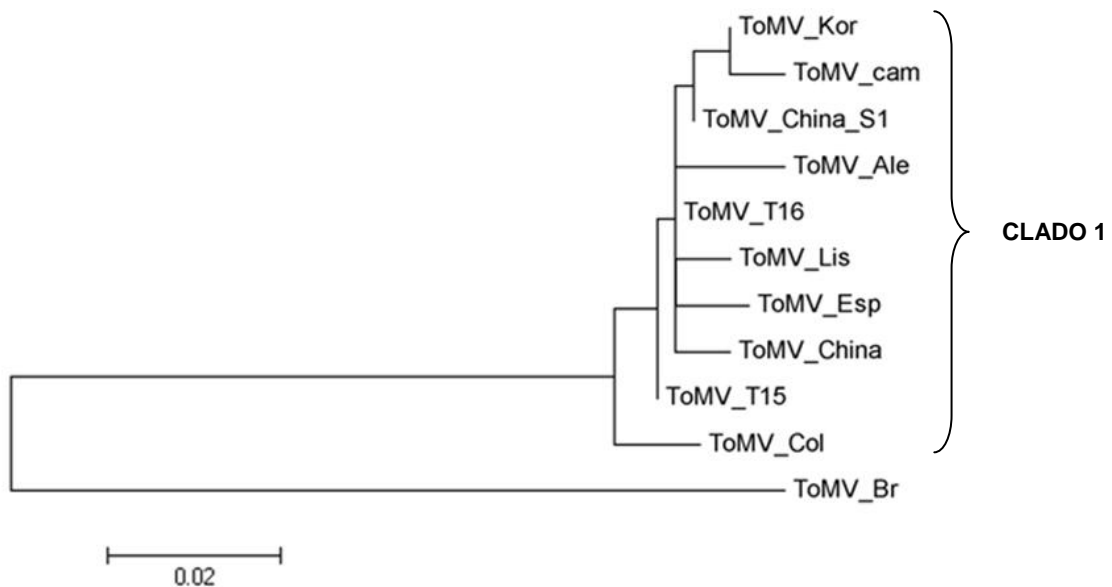


Figura 16. Arbol filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de un fragmento aproximado de 500 pb del gen CP de ToMV reportadas en diferentes países. El número de accesión del GenBank y los códigos empleados para la construcción del árbol filogenético están descritos en la tabla 1.

Tabla 6. Matriz de identidad en la que se compara un fragmento de 500 nt aproximadamente del extremo 5' del gen CP del tobamovirus ToMV identificado en Colombia Valle del Cauca (ToMV_Col) con diferentes ToMV reportados en la base de datos del NCBI, los valores de identidad se disponen de mayor a menor.

Aislamiento	Identidad con ToMV Colombia
ToMV isolate T15	0,971
ToMV_T16	0,969
ToMV-China_isolate_S1	0,967
ToMV-China	0,967
ToMV Lis	0,967
ToMV Kor	0,962
ToMV Esp	0,96
ToMV Cam	0,956
ToMV_Ale	0,956
ToMV_Br	0,843

6.3.3 Detección e identificación molecular de *Cucumovirus (Cucumber mosaic virus -CMV)* en tomate

De acuerdo al reporte realizado por Morales *et al.*, (2009) sobre enfermedades virales en los cultivos de tomate en Colombia, el virus *Cucumber mosaic virus (CMV)* fue identificado en cultivos de tomate chonto en los departamentos de Caldas y Risaralda empleando las técnicas de microscopía electrónica y ELISA con antisueros específicos para este virus.

La identificación del virus perteneciente al género *cucumovirus (Cucumber mosaic virus -CMV)* empleando la técnica molecular RT-PCR permitió obtener un fragmento de 586 pb (Figura 17) correspondiente al gen de la proteína de la cápside en muestras de tomate comercial tipo chonto, obtenidas en cultivos a cielo abierto en el municipio de Palmira (Valle del Cauca). Esto coincide con lo reportado por Herrera-Vásquez *et al.* en el año 2009 en Panamá en cultivos de tomate los cuales presentaban mezcla de infección entre CMV y *Virus del torrado (ToTV)*. El material genético amplificado fue clonado, secuenciado y depositado en la base de datos del Genbank. Cuando se realizó la comparación del fragmento de 597nt secuenciado con la base de datos del Genbank empleando el algoritmo *Blast-n* se encontró una identidad del 98% con el aislamiento del mismo virus reportado en Nueva Delhi reportado por Koundal *et al.*, Número de accesión GU111229.

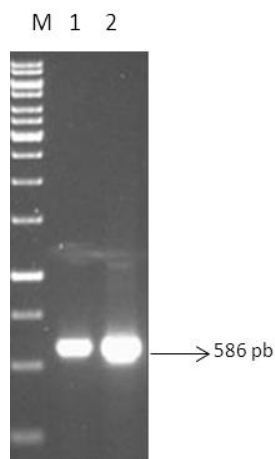


Figura 17. Identificación de *Cucumovirus* por PCR. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus ADN Ladder (Invitrogen) 1-2. Muestras Valle del Cauca

6.3.4 Análisis Filogenético *Cucumber mosaic virus* (CMV)

La selección de secuencias reportadas en la base de datos del NCBI para el establecimiento de la filogenia empleando el programa MEGA 5.01®, se realizó con base en la clasificación por subgrupos para *Cucumber mosaic virus* (Tabla 3). Varios autores entre los años 1983-1998 reportaron la división de las diferentes cepas de CMV en dos subgrupos denominados I y II, mediante resultados obtenidos por métodos serológicos, mapeo peptídico de CP, similitud en secuencias de nucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y la combinación de las técnicas moleculares RT-PCR con RFLP (Eiras *et al.*, 2004). En el año 1999, el alineamiento de las regiones 5'UTR (regiones no traducidas) de ARN 3 de 26 cepas de CMV, condujo a la subdivisión del subgrupo I en IA y IB, también se llegó a la conclusión que el subgrupo IB y II se encuentran muy relacionados y por lo tanto podrían tener un ancestro común, además expusieron la posibilidad que el subgrupo IA evolucionó a partir del subgrupo IB (Roossinck *et al.*, 1999).

El análisis filogenético mostró que el aislamiento obtenido en el Valle del Cauca presenta una estrecha relación con la cepa de Nueva Delhi y NT9 clasificándose así en el subgrupo IB, estos resultados concuerdan con los obtenidos en la matriz de identidad (Tabla 7) y permiten hipotetizar que CMV que infecta cultivos de tomate proviene de Asia ya que todas las cepas de CMV pertenecientes al subgrupo IB son originarias de este continente (Roossinck *et al.*, 1999). En este análisis se pudo observar que la cepa CMV-Musa reportada en Colombia perteneciente al subgrupo IA se encuentra muy distante de CMV-Valle identificado en tomate en este estudio este resultado permite concluir que en Colombia se encuentran cepas de CMV provenientes de diferentes partes del mundo.

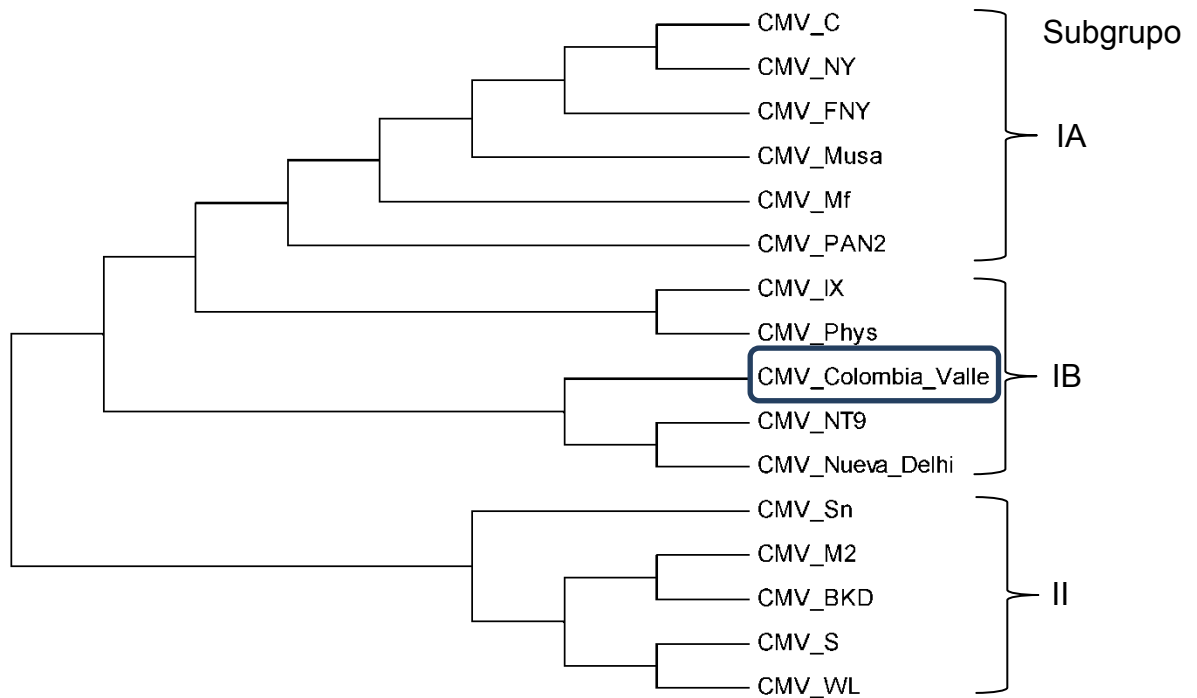


Figura 18. Árbol filogenético construido con base en la secuencia de nucleótidos de un fragmento de 586nt aproximadamente del extremo 5' del gen CP de *Cucumber Mosaic virus* reportadas en diferentes países y el aislamiento obtenido en el Valle del Cauca (CMV Colombia-Valle)

Tabla 7. Matriz de identidad en la que se compara un fragmento de 586 nt aproximadamente del extremo 5' del gen CP del cucumovirus CMV identificado en Colombia- Valle del Cauca (CMV_Col) con diferentes CMV reportados en la base de datos del NCBI, los valores de identidad se disponen de mayor a menor.

Secuencia	Identidad con CMV Colombia
CMV_NT9	0,981
CMV_Nueva_Delhi	0,981
CMV_Mf	0,944
CMV_FNY	0,941
CMV_NY	0,941
CMV_C	0,937

CMV_Musa	0,934
CMV_IX	0,921
CMV_Phys	0,911
CMV_PAN2	0,849
CMV_M2	0,775
CMV_Sn	0,774
CMV_WL	0,772
CMV_BKD	0,77
CMV_S	0,762

6.3.5 Detección de *Potyvirus* en tomate

Para la detección de *Potyvirus* se emplearon 4 juegos de iniciadores para evaluar muestras de ADNc sintetizadas con oligodT y con iniciadores al azar provenientes de los departamentos de Santander y Valle del Cauca. Inicialmente se evaluaron los iniciadores universales M4 y S que amplifican un fragmento de 1,7Kb correspondiente al gen NIb reportados por Chen *et al.*, (2001). Para analizar los resultados en este caso particular se sintetizó ADNc con tres iniciadores diferentes: oligodT, iniciadores al azar y M4T (Chen *et al.*, 2001). Los resultados de RT-PCR generaron en todos los casos fragmentos inespecíficos de 400 pb (datos no mostrados) por lo tanto se decidió no seguir utilizándolos.

Los iniciadores PVY-1 y PVY-2 que amplifican un fragmento de 900 pb del gen de la proteína de la cápside reportados por Cardin y Moury (2008) para *Potato virus Y*, no amplificaron en ninguna de las muestras analizadas.

Finalmente se evaluaron los iniciadores POT1 y POT2 que amplifican un fragmento de 1300 a 1450 pb correspondientes al gen de la proteína de cápside y el gen NIb originaron un resultado positivo para una muestra de tomate UNAPAL maravilla recolectada en el Centro Experimental Universidad Nacional sede Palmira (CEUNP). El fragmento amplificado presentó un peso molecular de 1300 pb (Figura 19). El fragmento amplificado fue clonado y secuenciado. Al comparar el fragmento secuenciado con la base de datos del Genbank empleando el algoritmo *Blast-n* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se observó que el fragmento no coincidía con los resultados esperados.

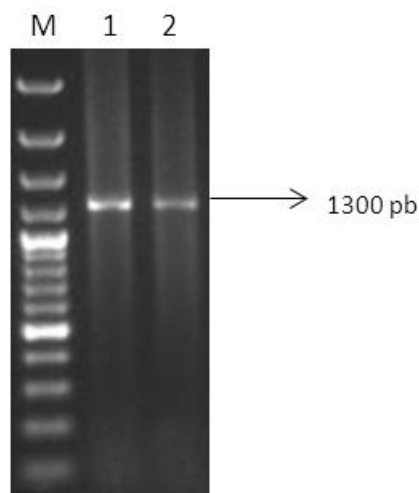


Figura 19. Identificación de *Potyvirus* por PCR. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M. Marcador de peso molecular Hyperladder II 100 lanes de Bioline. 1-2. Muestra Valle del Cauca (CEUNP)

6.3.6 Detección de *Tospovirus* en tomate

De las muestras colectadas y reportadas por Vaca-Vaca *et al.* (2011), se seleccionaron aquellas que por sintomatología podrían estar infectadas por el virus *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*, a las muestras seleccionadas se les extrajo ARN posteriormente se sintetizó ADNc al cual se le realizó ensayos de RT-PCR con un juego de iniciadores que amplifica un fragmento de 800 pb del gen NP para identificar el virus. Las condiciones de termociclaje se modificaron en diversas oportunidades pero los patrones electroforéticos mostraron ausencia de amplificado o fragmentos inespecíficos inferiores al tamaño razón por la cual no se pudo identificar molecularmente este virus, el cuál previamente había sido identificado en cultivos de tomate chonto por Morales y colaboradores (2009) en los departamentos de Antioquia, Boyacá y Cundinamarca utilizando la técnica de Inmuno Electro Microscopía Específica (ISEM).

Tomato spotted wilt virus (TSWV) fue clasificado como uno de los diez virus vegetales de mayor importancia debido a la distribución mundial, al amplio rango de hospederos, a las pérdidas económicas que desencadena y a la rápida propagación de su insecto vector (Beth *et al.*, 2011). *TSWV* es transmitido por trips de forma persistente, circulativa y propagativa. La transmisión del virus se realiza solo si éste es adquirido cuando el vector se encuentra en el primer estado larvario, razón por la cual el proceso circulativo en el insecto no se presenta cuando el virus es adquirido en una etapa avanzada de desarrollo de los trips y por lo tanto estos no resultan infectivos (Kritzman *et al.*, 2002). La eficiencia de los trips en la transmisión del virus es muy alta ya que, normalmente un periodo de

inoculación de diez minutos es suficiente para infectar una planta sana. Por lo tanto un número pequeño de trips puede infectar una gran cantidad de plantas en un periodo de tiempo muy corto.

El estado fisiológico de la planta y las condiciones medioambientales pueden estar relacionadas con la infección por TSWV, así, durante los estadios tempranos de desarrollo hay menor incidencia de la enfermedad y durante los periodos de precipitación disminuyen tanto la población como la actividad del vector, lo cual puede contribuir a disminuir la expansión del virus.

6.3.7 Evaluación de virus emergentes asociados al cultivo de tomate: *Crinivirus*, *Potexvirus* y *Torradovirus*.

Teniendo en cuenta la emergencia de virus cada vez más agresivos que están infectando el cultivo de tomate a nivel mundial, se determinó la importancia de conocer si virus tales como *Tomato torrado virus* (ToTV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Pepino mosaic virus* (PepM) se encontraban infectando el cultivo en Colombia. Para lograr este objetivo se seleccionaron muestras de los departamentos de Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca, se purificó el ARN total, se sintetizó el ADNc y se realizaron ensayos de RT-PCR con iniciadores específicos para cada virus.

Muestras recolectadas en el departamento de Santander se analizaron para determinar la presencia de ToTV, para lo cual se emplearon dos juegos de iniciadores que amplifican un fragmento de 573 pb y 892 pb correspondientes a ARN1 y ARN2 respectivamente. Los ensayos de RT-PCR mostraron un amplificado de 573 pb, este fragmento se clonó y se envió a secuenciar para verificar su identidad, sin embargo con los análisis bioinformáticos se encontró que el fragmento amplificado correspondía a una porción del genoma de la planta hospedera.

Cuando se evaluó la infección de ToCV con tres juegos de iniciadores para los genes de las proteínas HsP70, CP y p22 que amplifican 420 pb, 449 pb y 650 pb respectivamente, se observó en muestras tomadas en el Valle del Cauca, un fragmento de 449 pb correspondiente al gen de CP, el cual fue clonado y secuenciado para conocer la identidad molecular. Una vez obtenidos los resultados de secuenciación, se analizaron por bioinformática y se encontró que el fragmento correspondía a una porción del genoma *Solanum Lycopersicum*.

Para la identificación de PepMV en muestras procedentes de Santander y Valle del Cauca, se empleó un juego de iniciadores que amplifica un fragmento de 312 pb correspondiente al gen RdRp. Los ensayos de RT-PCR mostraron un amplificado de 200 pb el cual no correspondía con el tamaño esperado para lo

cual se variaron las condiciones de termociclaje en diversas ocasiones donde los patrones electroforéticos obtenidos eran los mismos y por lo tanto se decidió no continuar los ensayos.

En el muestreo realizado durante el periodo 2008-2009 (Vaca-Vaca *et al.*, 2011) no se evidenció la presencia de los virus pertenecientes a los géneros *Tospovirus* (TSWV), *Potyvirus* (PVY), *Potexvirus* (PepMV), *Crinivirus* (ToCV) y *Torradovirus* (ToTV); con las estrategias moleculares empleadas en el presente estudio. Lo cual constituye un resultado positivo porque estos virus por el momento no son una amenaza para los agricultores y por tanto los programas de protección de cultivos y mejoramiento genético pueden enfocarse en el control de propagación de vectores y mejoramiento de las prácticas culturales. Esto debido a que en este grupo de géneros virales estudiados se encuentran especies que son consideradas como virus emergentes (PepMV, ToCV, ToTV) que afectan de forma agresiva los cultivos causando en algunos casos pérdidas económicas significativas, así como una rápida expansión de los mismos relacionada con el cambio climático, prácticas culturales, plantas hospederas, insectos vectores y la elevada tasa de replicación y mutación lo cual proporciona a estos una gran capacidad de evolución y adaptación a las diferentes condiciones de selección (Hassen *et al.*, 2010).

6.4 Evidencia de infecciones mixtas de virus ADN y ARN en cultivos de tomate en el Valle del Cauca

Las mezclas de infecciones son definidas cuando una misma planta se encuentra coinfectada por dos o más cepas del mismo virus (siendo esta la más común), o por dos o más virus diferentes (Hammond *et al.*, 1999). El tipo de interacciones que se presentan en una mezcla de infecciones ya sea por virus del mismo género o virus de diferentes géneros puede desencadenar pérdida de interacción, antagonismos, sinergismos (Hammond *et al.*, 1999) e interacciones entre los genomas desencadenando eventos de recombinación o pseudorecombinación (Sackey y Francki, 1990). Los antagonismos generalmente se presentan cuando la coinfección esta dada por virus relacionados desencadenando interferencia o protección del cultivo, mientras que el sinergismo se origina cuando los virus que infectan la planta no pertenecen al mismo género y por lo tanto los síntomas son más severos que aquellos producidos por infecciones simples (Martin *et al.*, 2004).

Con el fin de establecer la presencia de infecciones virales mixtas en cultivos de tomate en el departamento del Valle del Cauca donde se evidenció presencia de virus ARN (CMV y ToMV), se realizó un análisis para begomovirus bipartitas para lo cual se empleó el juego de iniciadores reportados por Rojas *et al.*, (1993). Se observó un amplificado de 1100 pb y 600 pb correspondiente al componente A y componente B respectivamente, para confirmar la identidad del begomovirus se

empleó la técnica PCR-RFLP al componente A amplificado, el cual fue digerido con la enzima PstI, donde el patrón de restricción obtenido fue el mismo que se obtuvo para el virus PYMV (*Potato yellow mosaic virus*) identificado en el Valle del Cauca (Betancur-Pérez, Tesis Doctoral, documento en elaboración).

Por lo tanto al conocer la identidad molecular del *Begomovirus* bipartita se logró establecer la mezcla de infecciones entre los virus CMV y PYMV, ToMV y PYMV en muestras de tomate cherry y tomate chonto respectivamente, recolectadas en el municipio de Palmira (Valle del Cauca).

Varios autores han reportado la mezcla de infecciones entre *Potyvirus* y otros virus ARNss pertenecientes a los géneros *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Comovirus* y *Sobemovirus* (Martín *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2002) donde los resultados obtenidos demuestran un potenciamiento o reducción en la acumulación de los potyvirus (Wang *et al.*, 2002). Un estudio realizado en plantas de tomate inoculadas con dos cepas de TYLCV permitió observar la frecuencia de recombinación que se presenta entre este begomovirus monopartita lo cual puede explicar su emergencia y capacidad adaptativa (García-Andrés *et al.*, 2007). Además, estudios de mezclas de infecciones entre begomovirus bipartitas y cucumovirus mostraron un aumento en la concentración del begomovirus con relación al cucumovirus además de presentarse acentuación en los síntomas desarrollados en las plantas (Wege y Siegmund, 2007).

Con base en lo anterior y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio no podemos determinar si la mezcla de infecciones halladas en las muestras recolectadas en el departamento del Valle del Cauca corresponden a sinergismos o antagonismos, podemos plantear la idea de la realización de futuros trabajos orientados a determinar el tipo de interacción específica que están presentando estos virus en cultivos de tomate en el departamento del Valle del Cauca.

6.5 Hibridación de ácidos nucleicos tipo dot blot.

La hibridación de ácidos nucleicos tipo dot blot desarrollada en el año de 1983, se ha convertido en el método de hibridación molecular más empleado para diagnóstico rápido de enfermedades virales ya que permite la aplicación directa del ácido nucleico sobre una membrana y el análisis de un gran número de muestras (Pallás, *et al.*, 1998). Diversas investigaciones han confirmado que ésta es una técnica sensible y específica que no requiere de equipos muy especializados (Meng *et al.*, 2007) si se compara con otro tipo de metodologías que resultan ser más laboriosas, menos específicas y poco sensibles (Yamagishi *et al.*, 2006).

En la actualidad el uso de sondas no radiactivas ha permitido que esta técnica sea más accesible. Los métodos de marcaje no radiactivo empleados en la hibridación tipo dot-blot se dividen en directos e indirectos. Los métodos directos se caracterizan por presentar unión covalente y directa entre la sonda y los sustratos relacionadas con la emisión de la señal mientras que, los métodos indirectos requieren la modificación de la sonda por adición de una molécula que establece una unión no covalente entre la sonda y el sustrato relacionado con la emisión de la señal (Kessler, 1995).

6.5.1 Estandarización de las condiciones para realizar ensayos de hibridación de acidos nucleicos tipo dot blot para virus ADN.

El primer paso para la estandarización de las condiciones de hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot consistió en evaluar la concentración mínima de detección de la sonda, haciendo uso del kit Biotin DecaLabel™ ADN Labeling (Fermentas Inc.) cuya detección se realiza bajo parámetros cromogénicos y del kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) donde la detección de la señal se realiza por fluorescencia.

El Kit Biotin DecaLabel™ ADN Labeling (Fermentas Inc.) permite visualizar hibridación al observar una coloración violeta. La concentración mínima de detección observada fue de 1×10^{-3} ng/ul, teniendo en cuenta que la sonda presentaba una concentración de 10ng/ul aprox. (Datos no mostrados). Con el kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) se pudo determinar una concentración mínima de detección de 1×10^{-4} ng/ul, en este caso la sonda presentaba una concentración de 10 ng/ul aprox. (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta que los niveles mínimos de detección de señal obtenidos con ambos kit fueron similares, se realizó un ensayo de hibridación con el clon completo de componente A de *Potato yellow mosaic virus* –Colombia (PYMV) obtenido por Betancur J.(Tesis Doctoral, documento en elaboración) con la finalidad de definir cual de los kit empleados presentaba mayor eficiencia en el proceso de hibridación.

Una vez concluido el proceso de hibridación se observó una baja eficiencia de hibridación con kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentans Inc), ya que la intensidad de la coloración fue muy variable y se esperaba la misma intensidad puesto que se realizó hibridación sobre el clon completo del componente A del virus, razón por la cual no se continuó los ensayos de hibridación con este Kit (figura 20). Con respecto a la eficiencia de hibridación con el kit Amersham Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (Amersham

Biosciences, Piscataway, NJ) se observó una emisión fuerte de señal para todas las muestras (datos no mostrados). Con estos resultados se decide continuar los ensayos de hibridación con el kit Amersham Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

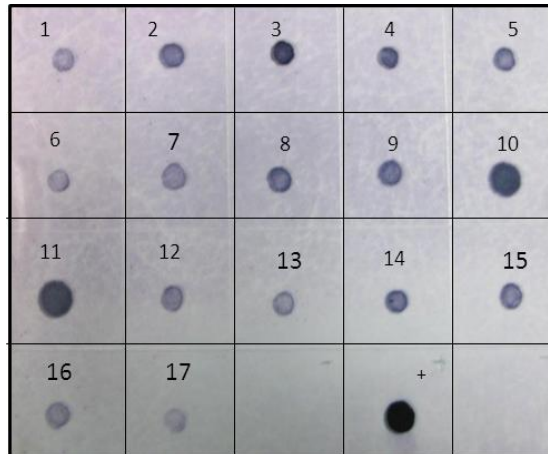


Figura 20. Hibridación de ácidos nucleicos con la sonda PYMV. 1-7 Muestras Valle Cauca; 8-9 Muestras Cundinamarca; 10-17 Muestras Santander; (-) Control negativo; (+) Control positivo

6.5.2 Estandarización de las condiciones para realizar ensayos de hibridación de ácidos nucleicos tipo dot blot para virus ARN.

Las condiciones de estandarización de hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot para virus ARN se realizó porque en este trabajo se identificó a nivel molecular los virus *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Tomato mosaic virus* (ToMV) los cuales se encuentran clonados en el vector comercial p-GEM T-easy (Promega, Madison, Wi) para ser utilizados como sondas en hibridación de ácidos nucleicos (dot-blot).

El kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentans Inc) no fue utilizado en los ensayos de estandarización con virus ARN, debido a la baja eficiencia de hibridación presentada para virus ADN presentada en este estudio. Cabe resaltar que en un estudio realizado sobre virosis de tomate de árbol en la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (Alvárez, 2010) identificaron virus ARN pertenecientes a los géneros *Potyvirus* y *Polerovirus* haciendo uso de este kit el cual demostró ser eficiente tanto para la metodología dot-blot como para tissue printing.

Para los ensayos de hibridación tipo dot-blot para virus ARN con el kit Amersham Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (Amersham

Biosciences, Piscataway, NJ.) se seleccionó el virus CMV aislado en muestras de tomate chonto en el departamento del Valle del Cauca. Las pruebas se realizaron tanto con ARN total como ADNc obtenidos de diferentes muestras incluyendo aquella donde se identificó el virus.

Cuando se realizó la hibridación con ARN ninguna de las muestras analizadas hibridó (Figura 21) mientras que la hibridación con ADNc solo hibridó aquella donde se indentificó el virus (CMV). Por lo tanto de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio la hibridación tipo dot-blot empleando el kit Amersham Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) fue más eficiente cuando se emplean muestras de ADNc que muestras de ARN.

Los ensayos de hibridación realizados con el kit Amersham Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) realizados en este trabajo permiten confirmar la sensibilidad de la técnica en la detección de virus ADN ya que las pruebas para virus ARN son más laboriosas debido al cuidado que se debe tener en el momento de manipular las muestras porque el ARN es muy susceptible de degradación.

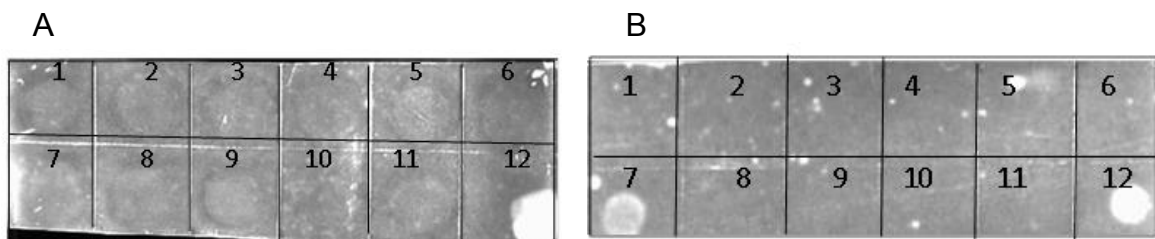


Figura 21. A. Hibridacion sonda CMV con ARN total B. Hibridación sonda CMV con cADN. 1- 6 Muestras Santander 7- Muestra Valle del Cauca donde se identifico el virus. 8-10 Muestras Valle del Cauca 11. Control Negativo 12. Control Positivo (Sonda)

7. CONCLUSIONES

- Los análisis moleculares realizados a las muestras recolectadas en el periodo 2008-2009 por Vaca-Vaca *et al.* (2011), no evidenciaron la presencia de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), en cultivos de tomate en Colombia. Actualmente este complejo viral es considerado un virus emergente que genera muchas pérdidas económicas a los agricultores y ya ha sido reportado en países fronterizos como Venezuela y Brasil.
- Los análisis moleculares permitieron determinar la presencia de *Tomato mosaic virus* (ToMV) en cultivos de tomate cherry en el departamento del Valle del Cauca con una identidad del 98% con la cepa T15 de ToMV aislada en España. **Este es el primer reporte de este virus infectando cultivos de tomate cherry en Colombia.** Los análisis filogenéticos permiten concluir que el aislamiento ToMV Colombia muestra una relación más estrecha con ToMV Brasil que con las otras cepas reportadas, sin embargo, al observar el árbol filogenético se puede deducir que ToMV Colombia proviene de Europa y no de Brasil, ya que la identidad con este aislamiento es del 84,3%.
- El uso de técnicas moleculares **permitió determinar por primera vez la presencia de *Cucumber mosaic virus* en cultivos de tomate chonto en el departamento del Valle del Cauca** con una identidad del 98% con el aislamiento reportado en Nueva Delhi, siendo este el primer reporte de este virus en el departamento del Valle del Cauca. Los análisis filogenéticos permiten sugerir que CMV pertenece al subgrupo IB por la estrecha relación que presenta con las cepas pertenecientes a este subgrupo y por lo tanto es probable que el virus haya ingresado al país proveniente del viejo mundo (Asia) donde solo se encuentra este subgrupo y no por países fronterizos con Colombia
- No se evidenció presencia de virus emergentes con material genético ARN pertenecientes a las especies *Tomato torrado virus* (ToTV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Pepino Mosaic virus* (PepM) en las muestras analizadas, lo cual en el momento es favorable ya que estos virus han sido reportados en países fronterizos como Panamá y Perú causando pérdidas hasta del 100% de los cultivos.
- En las muestras analizadas por técnicas moleculares (RT-PCR) no se evidenció la presencia del *Tospovirus* (Tomato spotted wilt virus TSWV).
- Dadas las condiciones de identidad de los virus identificados en este trabajo (ToMV y CMV) se observa la diseminación mundial de virus debido al

aumento de comercialización de vegetales así como la falta de control fitosanitario entre los países, favoreciendo la diseminación rápida de virus, que puede verse reflejada en la baja variabilidad genética encontrada en los análisis filogenéticos del *Tobamovirus* y *Cucumovirus* identificados en este estudio.

- La identificación y clonación molecular de los virus *CMV* y *ToMV* permitieron diseñar sondas que pueden ser empleadas en un futuro como una herramienta de diagnóstico rápida de diagnóstico molecular de virus fundamentada en la hibridación de ácidos nucleicos.
- La identificación molecular por PCR e hibridación de ácidos nucleicos tipo Dot-blot de *Begomovirus* bipartita Potato yellow mosaic virus-Colombia (*PYMV*) en los departamentos de Risaralda y Caldas permitió confirmar la sensibilidad de la técnica molecular hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot para el diagnóstico rápido de virus ADN.
- Se evidenció la presencia de mezclas de infecciones entre un begomovirus bipartita (*PYMV*) y virus ARN (*CMV* y *ToMV*) en cultivos de tomate chonto y tomate cherry respectivamente en el departamento del Valle del Cauca. En este estudio no se estableció si la mezcla de infecciones correspondía a un sinergismo o antagonismo, se recomienda realizar en un futuro trabajos de virología enfocados a determinar si la mezcla de estos virus ADN y ARN conducen a sinergismos o antagonismos.

8. RECOMENDACIONES

- En este trabajo no fue posible la identificación del begomovirus monopartita Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) a pesar de haberse empleado varios juegos de iniciadores específicos empleados tanto en el viejo mundo donde se reportó por primera vez como iniciadores empleados en América latina (México) ya que las secuencias obtenidas correspondían al begomovirus bipartita Potato yellow mosaic virus (PYMV) reportado por primera vez en islas del Caribe así como Venezuela y Colombia. Por lo tanto se recomienda diseñar iniciadores más específicos para la identificación de TYLCV ya que este complejo viral es considerado un virus emergente que genera muchas pérdidas económicas a los agricultores, además de haber sido reportado en países fronterizos como Venezuela y Brasil.
- No se evidenció presencia de virus emergentes de las especies Tomato torrado virus (ToTV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Pepino Mosaic virus* (PepM) en las muestras analizadas, sin embargo, se recomienda continuar con estudios moleculares que permitan monitorear la presencia de estos virus en Colombia ya que son considerados virus muy agresivos.
- En las muestras analizadas por técnicas moleculares como la RT-PCR no se evidenció la presencia del *Tospovirus* (Tomato spotted wilt virus - TSWV). a pesar de haber sido identificado por serología en un estudio previo realizado por Morales y colaboradores (2009). Se recomienda realizar más análisis que permitan su identificación molecular.
- Las sondas para virus ARN obtenidas en este estudio marcadas por métodos fluorescentes o cromogénicos no es eficiente para la hibridación de ácidos nucleicos tipo dot-blot. Por lo tanto se recomienda el marcaje con quimioluminiscencia o digoxigenina reportado en la literatura y con alta especificidad. Además también se recomienda evaluar la técnica de tissue print con las sondas obtenidas en este trabajo para así realizar un diagnóstico rápido de los virus ARN identificados en este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou- Jawdah Y, Maalouf R, Shebaro W. & Soubra K. 1999. Comparison of the reaction of tomato lines to infection by tomato yellow leaf curly begomovirus in Lebanon. *Plant Pathol.* 48:727-734.
- Adams, M.J., Antoniw, J.F. & Kreuze H. 2009. *Virgaviridae*: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch. Virol.* 154: 1967-1972.
- Adams, M.J., Antoniw J.F. & Fauquet, C.M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae* *Arch Virol* 150: 459–479
- Agrios, G. 2004. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. San Diego, California, USA. 632-635pp
- Alfenas-Zerbini, P., Maia, I.G., Fávaro, R.D., Cascardo, J.C.M, Brommonschenkel, S. H. & Zerbini, F. 2009. Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed Genes During the Early Stages of Tomato Infection by a Potyvirus. *MPMI.* 22: 352-361.
- Ali, A. & Kobayashi, M. 2010. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *J. Virol. Meth.* 163:234-237.
- Álvarez-Restrepo, J.A. 2010. Caracterización serológica y molecular de virus asociados al material de siembra de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Bosh) en Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Aparicio, F., Soler, S., Aramburu, J., Galipienso, J., Nuez, F., Pallás, V. & López, C. 2009. Simultaneous detection of six ARN plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe. *Eur J Plant Pathol.* 123:117–123.
- Arnaud, L., Santos, C., Lima, J. & Feitosa, F. 2007. Predominância de Begomovírus em Tomateiros na Região Produtora da Ibiapaba, Ceará, e sua Detecção Natural em Plantas Daninhas. *Fitopatol. Bras.* 32: 241-246.

- Ascencio-Ibáñez, J. T., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Pruna-Camacho, M. B., Díaz-Plaza, R. & Rivera-Bustamante, R. F. 1999. Los Geminivirus. Rev. Mex. Fitopat.113: 113-127
- Balme-Sinibaldi, V., Tribodet, M., Croizat, F., Lefeuvre, P., Kerlan, C. & Jacquot, E. 2006. Improvement of *Potato virus Y* (PVY) detection and quantitation using PVYN- and PVYO-specific real-time RT-PCR assays. J. Virol. Meth. 134: 261-266.
- Betancur-Pérez, J.F. 2012. Identificación y caracterización molecular de virus transmitidos por mosca blanca *bemisia tabaci* que infectan tomate en la region andina de Colombia. Tesis Doctoral documento en elaboración. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.
- Beth, K., Scholthof, G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., et al. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Mol. Plant Path. 12: 938–954.
- Birnboim H. C. & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513.
- Cardin, L & Moury, B.2008. First Report of *Potato virus Y* in *Nicotiana mutabilis* in France. Plant Dis. 98:312.
- Castro, R.M., Hernandez, E., Mora, F., Ramirez, P. & Hammond, R.W. 2009. First report of Tomato chlorosis virus in tomato in Costa Rica. Plant Dis. 93: 970
- Chen, J., Chen, J. & Adams, M.J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. Arch Virol 146: 757–766
- Chwen Hsu, Y., Yeh, T.J. & Chang, Y.T. 2005. A new combination of RT-PCR and reverse dot blot hybridization for rapid detection and identification of potyviruses. J. Virol. Meth. 128:54-60
- Colinet, D., Kummert, J., Lepoivre P. & Semal, J. 1993. Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweetpotato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. Phytopathol. 84: 65-69

- Dombrovsky A., Huet H., Chejanovsky N. & Raccah B. 2005. Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Arch Virol.* 1590:287-298
- Eiras, M., Boari, A.J., Colariccio, A., Chaves, A.L.R., Briones, M.R.S., Figueira, A.R. & Harakava, R. 2004. Characterization of isolates of the cucumovirus *cucumber mosaic virus* present in Brazil. *J. Plant Path.* 86 :61-69
- FAOSTAT. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/>
- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini. & M., Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153: 783-821
- Font, M.C., Rubio, L., Martínez-Culebras, P. & Jorda, C. 2007. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. *Virus Res.* 128:43-51
- French, C.J., Bouthillier, M., Bernardy, M., Ferguson, G., Sabourin, M., Johnson, R.C. et al. 2001. First Report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Dis.* 85: 1121
- Fujisaki, K. & Ishikawa, M. 2008. Identification of an *Arabidopsis thaliana* protein that binds to tomato mosaic virus genomic ARN and inhibits its multiplication. *Virol.* 380: 402-411
- Gal-On, A., Naglis, A., Leibman, D., Ziadna, H., Kathiravan, K., Papayiannis, L., et al., 2009. Broomrape Can Acquire Viruses from Its Hosts. *Virol.* 99: 1321-1329.
- García-Andrés, S., Tomás, D.M., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virol.* 365:210-219.
- García-Andrés, S. Tomás, D.M. Navas-Castillo, J. & Moriones, E. 2009. Resistance-driven selection of begomoviruses associated with the tomato yellow leaf curl disease. *Virus Res.* 146: 66-72

- Gibbs, A. & Mackenzie, A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Meth.*63:9-16.
- Gutiérrez, C., Ramirez, P. E., Castellano, M. M., Sanz, B. A. P., Luque, A. & Missich, R. 2004. Geminivirus ADN replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.*98: 111-119.
- Haan, P., De Avila, A., Komerlink, R., Westerbroek, A. & Jielen J. 1992. The nucleotide sequence of the S RNA of impatiens necrotic spot virus a novel tospovirus. *FEBS.* 306: 27-32.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hammond, J., Lecoq, H. & Raccah, B. 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Adv. Vir. Res.* 54: 189-314.
- Hanssen, I., Lapidot, M. & Thomma B. 2010. Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. *MPMI.* 23:539-548.
- Herrera-Vásquez, J.A., Alfaro-Fernández, A., Córdoba-Sellés, M.C., Cebrián, M.C., Font, M.I. & Jordá, C. 2009. First Report of Tomato torrado virus Infecting Tomato in Single and Mixed Infections with Cucumber mosaic virus in Panama. *Plant Dis.* 93;198
- Hull Roger. 2002. *Matthew's Plant Virology.* Cuarta Edición. Academic Press. San Diego California. 1001 p
- Jan, F.J, Chen, C.C. & Hsu, H.T. 2009. Identification of *Tomato mosaic virus* Infection in Lisianthus in Taiwan. *Plant Dis.*87: 1537
- Jain, R.k., Pappu, S.S., Pappu, H.R., Culbreath, A.K. & Todd J.W. 1998. Molecular Diagnosis of Tomato Spotted Wilt Tospovirus Infection of Peanut and Other Field and Greenhouse Crops. *Plant Dis.*82: 900-904
- James, C.K., Josefsson, C., Clark, A.J., Franz, A.W.E., & Perry, K.L. 2005. Virion stability and aphid vector transmissibility of Cucumber mosaic virus mutants. *Viol.* 332:397-405.

- Jeger, M., Madden, L. & Bosch F. 2009. The effect of transmission route on plant virus epidemic development and disease control. *J. Theor. Biol.* 258: 198-207.
- Jones, J.B., Jones, J. P., Stall, R. E. & Zitter, T. A. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*. St. Paul, MN, EUA: The American Phytopathological Society. 73p.
- Ka-Wai Hui, E. 2006. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microbes and Infection*. 8:905-916.
- Kessler, C. 1995. *Nonisotopic Probing, Blotting, and Sequencing*. Second Edition. Academic Press, 42-45 p.
- Kritzman, A., Gera, A., Raccah, B., Van Lent, J.W.M. & Peters, D. 2002. The route of tomato spotted wilt virus inside the thrips body in relation to transmission efficiency. *Arch Virol.* 147: 2143–2156.
- Lapidot, M., Friedmann, M., Pilowsky, M., Ben-Joseph, R. & Cohen, S. 2001. Effect of host plant resistance to Tomato yellow leaf curl virus on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopath* 91:1209-1213.
- Lapidot, M. 2002. Screening Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) for Resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Dis.* 86:429-432
- Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D.E., Willingmann, P. & Heinze, C. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J. Virol. Meth.* 106:1-10
- Levy, J., Fraenkel-Conrat, H. & Owens R. *Virology*. Prentice Hall (1994); 100-101p.
- Macúa, J.I., Lahoz, I., Santos, A., Zabaleta, J. & Calvillo, C.F. 2008. Tomato de industria: Variedades de tomate tipo cherry o cereza para cosecha única. En Navarra agraria. www.navarraagraria.com.
- Martin, R., Delano, J. & Levesque C. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Ann. Rev. Phytopath.* 38:207-239.

- Martin, E.M., Cho, J.D., Kim, J.S., Goeke, S.C., Kim, K.S. & Gergerich, R.C. 2004. Novel cytopathological structures induced by mixed infection of unrelated plant viruses. *Phytopath.* 94: 111–119.
- Más, P., Sanchez-Pina, A., Balsalobre, J. & Pallas V. 2000. Subcellular localization of cherry leaf roll virus coat protein and genomic RNAs in tobacco leaves. *Plant Sci.* 153: 113-124
- Mason, G., Caciagli, P., Accotto, G, P. & Noris, E. 2008. Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in Bemisia tabaci. *J. Virol. Meth.*147: 282–289.
- Meng, J., Qin-shengl,G., Shi-ming,L., Bid, P., Li-fengl, L., Yan-ping, T. & LI, L. 2006. Dot-Blot Hybridization for Detection of Five Cucurbit Viruses by Digoxigenin-Labelled cADN Probes. *Agricul. Sc. in China.* 6 :1450-1455
- Morales, F.J. Tamayo, P.J. Castaño,M. Olaya, C. Martínez, A.K. &Velasco, A.C.2009. Enfermedades virales del tomate (*Solanum Lycopersicum*) en Colombia. *Fitopat. Col.* 33:23-27
- Morilla,G., Janssen,D., García-Andrés, S., Moriones, E., Cuadrado,I.M. & Bejarano, E.R. 2005. Pepper (*Capsicum annum*) Is a Dead-End Host for *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virol.* 95:1089-1097
- Moriones, E. & Navas-Castillo, J. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71:123-134.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D. & Czosnek H. 1991. Tomato Yellow Leaf Curly: A Whitefly-Transmitted Geminivirus with a Single Genomic Component. *Virol.*185: 151-161.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Pallás, V., Más, P. & Sánchez-Navarro, J.A. 1998. Detection of plant RNA Viruses by Nonisotopic Dot Blot Hybridization. *Plant Virol.* 81:461-468.
- Pappu, H .R., Jones, R.A.C. & Jain, R.K. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* 141: 219 – 236.

- Pervaiz – Akhtar, K., Saleem, M.Y., Asghar, M., Ahmad, M. & Sarwar, N. 2010. Resistance of *Solanum* species to Cucumber mosaic virus subgroup IA and its vector *Myzus persicae*. *Eur J Plant Pathol.* 128:435–450.
- Pelt-Verkuil, E.V., Belkum A. V. & Hays, J.P. 2008. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer. 332p
- Polston, J. E., Cohen, L., Sherwood, T. A., Ben-Joseph, R. & Lapidot, M. 2006. Hosts and reservoirs of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopath* 96:447-452.
- Pospieszny H., Borodynko N., Obrępańska-Stęplowska A. & Hasiów B. 2007. The First Report of Tomato torrado virus in Poland. *Phytopatol.* 91:136
- Putnam, M.L. 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. *Crop Prot.* 14: 517-525.
- Quiñónez, M., Fonseca, D., Gómez, O., Miranda, I., Piñón, M. & Martínez, Y. 2003. Optimización y aplicación de la hibridación de ácidos nucleicos no radioactiva para el diagnóstico del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en el programa de mejoramiento genético. *Prot. Veg.* 18: 176-182.
- Rangel, E.A., Alfaro-Fernández, A., Font-San-Ambrosio, M. Arteaga, L., & Rubio, L. 2011 Genetic variability and evolutionary analyses of the coat protein gene of Tomato mosaic virus. *Virus Genes.* 43:435-438.
- Rampersad S.N. & Umaharam P. 2003. Detection of Begomoviruses in Clarified Plant Extracts: A comparison of Standard, Direct Binding, and Immunocapture Polymerase Chain Reaction Techniques. *Phytopatol.* 93: 1153- 1157
- Rigotti, S. & Gugerli, P. 2007. Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 140:90-94.
- Rojas, A., Kvarnheden, A. & Valkonen J P T. 2000. Geminiviruses infecting tomato crops in Nicaragua. *Plant Dis.* 4:843-846.

- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Ruseel, D.R., & Maxwell D.P. 1993. Use of generate oligonucleótidos in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. *Plant Dis.* 77:340-347.
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. & R.L. Gilbertson. 2005. Exploiting chinks in the plants armor: Evolution and emergence of Geminivirus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 361-394.
- Roncato, D. K. M., Gomes, L. H., Andrino, F. G., Leal, J. G. A., Bicudo, S. F. H., Rizzato, P. J. A., Brancalion, G. A. M., & Almeida, T. F. C. 2002. Identificação do Vírus do Mosaico Do Tomateiro (TOMV) tobamovirus, por meio de anticorpos monoclonais. *Scient. Agri.* 59: 107-112
- Roossinck, M.J., Zhang, L. & Hellwald, K-H. 1999. Rearrangements in the 5' Nontranslated Region and Phylogenetic Analyses of Cucumber Mosaic Virus ARN 3 Indicate Radial Evolution of Three Subgroups. *J. Virol.* 73: 6752–6758
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J. & Ambros, S. 2007. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J. Virol. Meth.* 145: 96-105.
- Sackey, S.T. & Francki, R.I.B. 1990. Interaction of cucumoviruses in plants: persistence of mixed infections of cucumber mosaic and tomato aspermy viruses. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 36:409-419.
- Sambrook, J. & Russell, D. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2344 p
- Soler, S., Prohens, J., López, C., Aramburu, C., Galipienso, L. & Nuez, F. 2010. Viruses Infecting Tomato in València, Spain: Occurrence, Distribution and Effect of Seed Origin. *J. Phytopathol.* 158: 797–805.
- Tamayo, P. J. & Jaramillo, J. E. 2006. *Enfermedades del tomate, pimentón, aji y berenjena en Colombia. Guía para su diagnóstico y Manejo.* Corpoica. 69-79 p
- Tamayo, P.J, Castaño, M. Arroyave. J.A. & Olaya, C. (2005). Virus en Cultivos de Tomate, Pimentón, Zucchini, Apio, Ajo, Cebolla de Rama y Bulbo. *Ascolfi Informa.* 31: 16-20

- Tamura, K., Peterson, P., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731–2739.
- Tatineni, S., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Bar-Joseph, M, Gowda, S. & Dawson, W.O. 2008. Three genes of Citrus tristeza virus are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Viol.* 376: 297-307.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997. The CUSTALX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 25:4876-4882.
- Ueda, S., Kimura, T., Onuki M., Hanada K. & Iwanami T, 2004. Three distinct groups of isolates of Tomato yellow leaf curl virus in Japan and construction of an infectious clone. *J. Gen. Plant. Pathol.*70: 232-238.
- Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R. H., Beachy, R. N. & Fauquet, C. M. 1998. Distribution and Diversity of Geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopath.* 88:1262-1268.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. & BeARNrdi F. 2001. Potyvirus Proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74:157-175.
- Vaca-Vaca, J.V., Betancur-Pérez, J.F. & López-López. K. 2012. Distribucion y diversidad genética de *Begomovirus* que infectan tomate (*solanum lycopersicum l*) en Colombia. Artículo aceptado por la Revista Colombiana de Biotecnología (En proceso de publicación).
- Vaca-Vaca, J. V., Betancur-Pérez, J. F. & López-López. K. 2011. Detección, identificación y localización geográfica de Begomovirus que afectan al tomate en Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13: 115-122.
- Valcárcel, G. M. 2009. Optimización del proceso de evaluación y selección de germoplasma de tomate por características de calidad organoléptica: Uso de la tecnología NIR y sensores electrónicos. Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals. Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural. Universitat Jaume I de Castellón. Tesis Doctoral. Abril de 2009

- Van Regenmortel, M., Fauquet, C., Carstens, E., Estes, M., Lemon, S. *et al.* 2000. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.* Academic Press. 604, 691, 889,943, p
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P. & Gal-On, A. 2002. Characterization of Synergy Between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in Cucurbit Hosts. *Phytophat.* 92:51-58
- Wege, C. & Siegmund, D. (2007). Synergism of a DNA and an RNA virus: Enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Viol.* 357: 10–28.
- Wells, D.R. Tanguay, R. Le, H. & Gallie, D.R. 1998. HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Dev.* 12: 3236-3251.
- Wintermantel, W.M. & Wisler, G.C. 2006. Vector Specificity, Host Range, and Genetic Diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 90: 814-819.
- Yamagishi, N., Terauchi, H., Honda, K., Kanematsu, S. & Hidaka S. 2006. Discrimination of four soybean dwarf virus strains by dot-blot hybridization with specific probes. *J. of Virol. Meth.* 133: 219–222.
- Zambrano, K., Carballo, O., Geraud, F., Chirinos, D., Fernández, C. & Marys, E. 2007. First Report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Venezuela. *Plant. Dis.* 91:768.
- Zechman, B. & Zellnig, G. 2009. Rapid diagnosis of plant virus diseases by transmission electron microscopy. *J. Virol. Meth.* 162:163-169.