

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS PATÓGENOS DE CULTIVOS DE  
GULUPA (*Passiflora edulis* Sims) EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ (CUNDINAMARCA)**

VIVIANA MARCELA CAMELO GARCÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Bogotá D.C.

2010

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS PATÓGENOS DE CULTIVOS DE  
GULUPA (*Passiflora edulis Sims*) EN LA REGIÓN DEL SUMAPAZ (CUNDINAMARCA)**

VIVIANA MARCELA CAMELO GARCÍA

Código: 790635

Trabajo de grado presentado para optar al título de M. Sc. en Fitopatología

Dirigido por:

ÓSCAR ARTURO OLIVEROS GARAY

M.Sc. Ph.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Bogotá D.C.

2010

*Este es otro paso en mi camino como investigadora. A mi familia, amigos y a cada una de las personas que me apoyaron y estuvieron a mi lado, muchas gracias.*

*Viviana*

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1. Enfermedades causadas por virus en pasifloras	6
3.1. Principales virus que infectan especies del género <i>Passiflora</i>	9
3.1.1. <i>Potyvirus</i>	9
3.1.2. <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	12
3.1.3. <i>Passiflora latent virus</i> (PLV)	13
3.1.4. <i>Passion fruit yellow mosaic virus</i> (PFYMV)	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Muestreo y recolección de material vegetal	16
5.2. Extracción de RNA	16
5.3. Diseño de primers	17
5.4. Retrotranscripción (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
5.5. Clonación y secuenciación	20

5.6. Análisis de secuencias	20
5.7. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	21
5.8. Inoculación mecánica en plántulas	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1. Síntomas asociados a infección viral en gulupa	23
6.2. Extracción de RNA	25
6.3. Detección de virus de gulupa mediante RT-PCR	27
6.4. Análisis de secuencias	30
6.5. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	38
6.6. Inoculación mecánica en plántulas	40
7. CONCLUSIONES	43
8. AGRADECIMIENTOS	44
9. LITERATURA CITADA	45
10. ANEXOS	51

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Virus reportados que infectan especies del género *Passiflora*.

**Tabla 2.** Primers evaluados para la identificación de virus en gulupa.

**Tabla 3.** Detección mediante RT-PCR de virus que infectan gulupa.

**Tabla 4.** Detección mediante RT-PCR de infecciones mixtas por *Soybean mosaic virus* y *Cucumber mosaic virus* en plantas de gulupa.

**Tabla 5.** Descripción de los aislamientos evaluados mediante RT-PCR usando los primers CI y CP para *Soybean mosaic virus*.

**Tabla 6.** Distancias genéticas del gen CI en aislamientos de *Soybean mosaic virus*.

**Tabla 7.** Comparación de procedimientos de detección de *Cucumber mosaic virus*.

**Tabla 8.** Comparación de procedimientos de detección de *Potyvirus*, *Soybean mosaic virus* y *Cowpea aphid-borne mosaic virus*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Diagrama de la organización del genoma de los virus del género *Potyvirus*.

**Figura 2.** Diagrama de la organización del genoma de *Cucumber mosaic virus*.

**Figura 3.** Diagrama de la organización del genoma de los virus del género *Carlavirus*.

**Figura 4.** Síntomas asociados a infección viral en frutos de gulupa. (a) Manchas verdes en frutos inmaduros. (b) Manchas anulares en frutos maduros.

**Figura 5.** Síntomas asociados a infección viral en área foliar de gulupa. (a) Deformación en las puntas terminales de las ramas. (b) Deformación foliar. (c) Mosaicos foliares y clorosis.

**Figura 6.** Patrones electroforéticos de RNA de plantas de gulupa que exhiben síntomas sugestivos de infección viral, obtenidos mediante dos procedimientos de extracción de RNA.

**Figura 7.** Análisis RT-PCR empleando primers degenerados para *Potyvirus* en extractos RNA obtenidos por dos procedimientos de extracción.

**Figura 8.** Detección de *Cucumber mosaic virus* en plantas de gulupa mediante RT-PCR usando primers específicos.

**Figura 9.** Detección de *Potyvirus* mediante RT-PCR usando primers degenerados.

**Figura 10.** Análisis PCR empleando primers degenerados de *Potyvirus* para verificar la presencia del inserto (producto PCR *Potyvirus*) en los clones seleccionados.

**Figura 11.** Detección de *Soybean mosaic virus* mediante RT-PCR usando primers específicos del gen CI.

**Figura 12.** Detección de *Soybean mosaic virus* mediante RT-PCR usando primers específicos del gen CP.

**Figura 13.** Análisis PCR empleando primers del gen CI de *Soybean mosaic virus* para verificar la presencia del inserto (producto PCR SMV) en los clones seleccionados.

**Figura 14.** Árboles de máxima parsimonia de relaciones filogenéticas en el gen CI de *Soybean mosaic virus*. Los árboles fueron construidos con bootstrap de 1000 réplicas. (a) Árbol sin raíz de las secuencias de SMV. (b) Árbol filogenético incluyendo como grupo externo un aislamiento de *Cowpea aphid-borne mosaic virus*.

**Figura 15.** Detección de *Soybean mosaic virus* mediante RT-PCR en muestras de plántulas de gulupa provenientes de diferentes viveros de propagación.

**Figura 16.** Síntomas asociados a infección viral en plántulas de gulupa. (a) Mosaicos foliares. (b) Deformación foliar (plegamientos de lámina foliar). (c) Plantas control no inoculadas.



## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Origen geográfico del material vegetal recolectado y resultados de la evaluación mediante RT-PCR para detección de virus en gulupa.

**Anexo 2.** Protocolo de extracción de RNA protocolo modificado de Chang *et al.*, 1993.

**Anexo 3.** Protocolo de retrotranscripción (RT).

**Anexo 4.** Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Anexo 5.** Protocolo de electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

## 1. RESUMEN

El cultivo de gulupa en Colombia representa un nuevo e importante reglón de exportación del sector frutícola. La información y prácticas agronómicas para el sistema de gulupa son extrapoladas de otros cultivos de pasifloras, por lo cual es prioritario investigar sobre los problemas fitosanitarios en esta especie. El objetivo del presente trabajo fue detectar virus que infectan gulupa mediante procedimientos serológicos y moleculares, y definir su identidad mediante secuenciación. El muestreo se realizó en cultivos ubicados en la región del Sumapaz (Cundinamarca). Las plantas evaluadas exhibían síntomas asociados a infección viral, tales como manchas verdes en frutos inmaduros, manchas anulares en frutos maduros, deformación en puntas terminales de ramas, deformación y mosaicos foliares. Se evaluaron tres métodos de extracción de RNA a partir de tejido foliar: Cromatografía en columna de celulosa CF-11 (Whatman), TRIzol y protocolo de extracción para pino. La detección mediante RT-PCR se realizó empleando primers específicos para *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y *Soybean mosaic virus* (SMV); adicionalmente, se evaluaron primers degenerados para los géneros *Potyvirus* y *Carlavirus*. La presencia de CMV y *Potyvirus* fue detectada mediante RT-PCR, la evaluación con los otros primers no permitió la detección de los otros virus. La identidad nucleotídica de los productos de PCR obtenidos con primers *Potyvirus* correspondió a SMV. El análisis serológico mediante ELISA permitió la detección de CMV, SMV, CABMV y *Potyvirus*. Este trabajo es el primer reporte de infección por SMV y CMV en gulupa.

**Palabras claves:** Extracción RNA, RT-PCR, ELISA, secuenciación, *Soybean mosaic virus*.

## ABSTRACT

The crop of gulupa in Colombia represents a significant new export screeed in the fruit sector. Information and agronomic practices for gulupa system are extrapolated from other pasiflora crops; hence research on plant protection of this specie has been constituted in a priority. The aim of this study was to detect viruses infecting gulupa by serological and molecular procedures, and to define their identity by sequencing. Sampling was performed in crops located in the region of Sumapaz (Cundinamarca). The tested plants exhibited symptoms associated with viral infection, such as green spots on immature fruits, ring spots on mature fruits, deformation on endpoints of branches, leaf deformation and mosaic. We evaluated three methods for RNA extraction from leaf tissue: CF-11 cellulose (Whatman) column chromatography, TRIzol and extraction protocol from pine. The RT-PCR detection was performed using specific primers for *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) and *Soybean mosaic virus* (SMV). Additionally, degenerate primers were evaluated for the genera *Potyvirus* and *Carlavirus*. CMV and *Potyvirus* infections were detected by RT-PCR, the evaluation with the other primers did not allow the detection of other viruses. The nucleotide identity of PCR *Potyvirus* products revealed to SMV. The serological analysis by ELISA allowed the detection of CMV, SMV, CABMV and *Potyvirus*. This work is the first report of SMV and CMV infection in gulupa.

**Key words:** RNA extraction, RT-PCR, ELISA, sequencing, *Soybean mosaic virus*.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cultivo de las pasifloras en Colombia representa un importante renglón en el sector frutícola. Dentro de la familia *Passifloraceae* existe una gran diversidad de especies de importancia agrícola (maracuyá, granadilla, gulupa y curuba), lo que permite brindar una amplia gama de potenciales productos al mercado nacional e internacional (Jiménez, 2006). En 1991, la superficie sembrada con especies de *Passiflora* spp. fue superior a las 5.000 hectáreas (Guyot, 1991). En 2003, el área total sembrada con maracuyá fue de 5.089 hectáreas y con granadilla fue de 1.821 hectáreas. En 2004 el área sembrada a nivel nacional con maracuyá disminuyó a 1.890 hectáreas y el área total con granadilla aumentó a 2.661 hectáreas (Asohofrucol y DANE, 2004).

El incremento del área cultivada con pasifloras no ha sido tan acelerado como se proyectaba en 1991, principalmente debido a enfermedades virales y a la falta de asistencia técnica, unido a factores de comercialización y mercadeo. Las enfermedades virales en el cultivo de maracuyá se presentan como uno de los factores más limitantes de su producción, ya que afectan el crecimiento del cultivo causando caída prematura de hojas (más del 50%) y hacen que el cultivo sea improductivo antes de 15 meses de edad (Varón *et al.*, 1991; Fischer & Rezende, 2008). También en maracuyá se ha reportado que el incremento en las áreas cultivadas favorece el aumento en la incidencia de virus, especialmente del género *Potyvirus* (Benschler *et al.*, 1996; Hodson, 2005).

La gulupa (*Passiflora edulis* Sims) es una fruta de reciente consumo en el mercado nacional, mientras que su demanda en Europa va en aumento. La exportación de gulupa hacia ese mercado ocupa el tercer renglón de frutas, después del banano y la uchuva (Jiménez, 2006). En Colombia

los cultivos de gulupa se encuentran ubicados entre 1.800 y 2.400 msnm. El 80% del área sembrada con gulupa se encuentra en Cundinamarca y el 20% restante se encuentra dispersa entre los departamentos de Boyacá, Quindío y Tolima. Por otro lado, las entidades de asistencia a los agricultores (UMATAS) de los municipios de la región del Sumapaz reportan un área total sembrada con gulupa de 595 hectáreas y una producción de 6.620 toneladas. En Cundinamarca los principales cultivos de gulupa se encuentran ubicados en la región del Sumapaz, en los municipios de San Bernardo, Venecia, Silvania, Granada y Cabrera. Recientemente se han establecido cultivos en el municipio de Tibacuy y en la región del Tequendama en los municipios de Anolaima y La Mesa.

Así como en otras especies del género *Passiflora*, entre los factores que limitan la producción de la gulupa se encuentran plagas y enfermedades, principalmente las ocasionadas por virus y hongos (Hodson, 2005). Productores de las zonas de Cundinamarca reportan pérdidas en el cultivo de gulupa por problemas fitosanitarios entre el 10% y 30% de la producción para exportación. Aunque la gulupa es un frutal promisorio por sus características organolépticas de sabor y aroma, son muy pocas las investigaciones sobre los aspectos relevantes del sistema de producción (Jiménez, 2006). En consecuencia, la mayoría de las prácticas realizadas son tomadas y adaptadas de otros cultivos de *Passiflora* spp., tales como maracuyá y granadilla. Un acercamiento al conocimiento de los virus presentes en el cultivo de gulupa resulta prioritario, con el fin de lograr hacer un manejo efectivo del cultivo, y evitar la disminución del área sembrada y su productividad como sucedió en el cultivo de maracuyá.

A nivel mundial se encuentra un gran listado de enfermedades virales reportadas para especies del género *Passiflora* (Brunt *et al.*, 1996; Liberato & Murilo, 2003), reflejando la gran diversidad

de agentes virales y síntomas que se pueden presentar en los sistemas productivos de pasifloras. En Colombia, específicamente para el cultivo de gulupa no se han identificado los posibles agentes virales, y para otras especies del género *Passiflora* (maracuyá y granadilla) han sido reportados *Soybean mosaic virus* (SMV) (Benschler *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2001) y *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) (Morales *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2002).

Las estrategias para el control de las enfermedades de plantas causadas por virus involucran erradicación o disminución del patógeno en una región geográfica, y/o cuando es factible incorporando resistencia en la planta económicamente importante. Un primer paso crítico en el control de estos patógenos es la implementación de procedimientos para su detección e identificación (Hadidi *et al.*, 1998). Un diagnóstico preciso de las enfermedades virales combinado con una sensible, rápida y temprana detección del virus en la planta es crítico para un manejo efectivo del sistema productivo. Así mismo, el procedimiento apropiado para el control puede ser efectivamente aplicado únicamente si la enfermedad es correctamente identificada y su distribución en un área es conocida (Hadidi *et al.*, 1998).

La propuesta presentada en este trabajo está dirigida a detectar e identificar algunos de los virus que infectan los cultivos de gulupa, lo cual constituye el primer acercamiento para definir un correcto diagnóstico y plantear estrategias para el manejo de las enfermedades virales en este cultivo.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Enfermedades causadas por virus en pasifloras

El género *Passiflora* incluye más de 450 especies (Vanderplank, 1996), las cuales en su mayoría son nativas de las regiones tropicales y subtropicales de Suramérica, siendo Brasil el centro de diversidad de la familia *Passifloraceae* (Fisch, 1975; Morton, 1987; Aguiar-Menezes *et al.*, 2002). De las 60 especies de pasifloras que producen frutos comestibles, las más importantes son: *P. edulis* (gulupa), *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracuyá), *P. ligularis* (granadilla), *P. mollissima* (curuba), *P. quadrangularis* (badea), *P. alata* (pasionaria dulce), *P. caerulea* (pasionaria azul) y *P. laurifolia* (pasionaria de limón) (Aguiar-Menezes *et al.*, 2002; Manicom *et al.*, 2003; Naqvi, 2004).

*P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa* y *P. alata* son las especies más cultivadas en el mundo. Los principales productores de pasifloras se encuentran en Suramérica, principalmente en Brasil, Colombia, Perú y Ecuador. También se encuentran cultivos comerciales en Australia, Hawai, Estados Unidos, India, Nueva Guinea, Kenia, Sudáfrica, Sri Lanka y Costa Rica (Manicom *et al.*, 2003). En Colombia, el cultivo de pasifloras fue introducido a mediados de 1950, principalmente en el Valle del Cauca (Morton, 1987).

El conocimiento de los agentes causales de las enfermedades en gulupa es limitado a nivel internacional, por lo cual su estudio se orienta a partir de los hallazgos en enfermedades de otras especies del género *Passiflora*, tales como maracuyá y granadilla. Con respecto a las enfermedades virales han sido descritos un amplio rango de virus que infectan pasifloras, los cuales se encuentran listados en la Tabla 1 (Brunt *et al.*, 1996; Liberato & Murilo, 2003).

La enfermedad viral causada por *Passionfruit woodiness virus* (PWV) es la más importante en los cultivos de maracuyá a nivel mundial (Nascimento *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Virus que infectan especies del género *Passiflora*.

GÉNERO	ESPECIES
<i>Potyvirus</i>	<i>Passionfruit woodiness virus</i> (PWV)
	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV)
	<i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)
	<i>Passion fruit crinkle virus</i> (PCV)
	<i>Passionfruit mottle virus</i> (PaMV)
	<i>Passiflora ringspot virus</i> (PFRSV)
	<i>East Asian passiflora virus</i> (EAPV)
	<i>Sri Lankan passion fruit mottle virus</i> (SLPMoV)
<i>Rhabdovirus</i>	<i>Passion fruit green spot virus</i> (PGSV)
	<i>Passion fruit vein clearing virus</i> (PVCV)
<i>Tobamovirus</i>	<i>Maracuja mosaic virus</i> (MarMV)
	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)
<i>Tymovirus</i>	<i>Passion fruit yellow mosaic virus</i> (PFYMV)
<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
<i>Carlavirus</i>	<i>Passiflora latent virus</i> (PLV)
<i>Nepovirus</i>	<i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV)
<i>Begomovirus</i>	<i>Passion flower little leaf mosaic virus</i> (PLLMV)
	<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i> (PSLDV)



Los síntomas foliares asociados a enfermedades virales en pasifloras son arrugamientos, puntos cloróticos, moteados, mosaicos y aclaramiento de nervaduras (Liberato & Murilo, 2003), en frutos se presentan deformaciones, endurecimiento (“woodiness”) y manchas. En cultivos de maracuyá y granadilla, las infecciones por *Soybean mosaic virus* (SMV) se caracterizan por producir acortamiento de entrenudos, mosaicos, defoliación y manchas anilladas en los frutos (Benschler *et al.*, 1996). *Passionfruit woodiness virus* (PWV) produce mosaicos amarillos, deformaciones foliares y endurecimiento de los frutos (Jan & Yeh, 1995; Naqvi, 2004; Rigden & Newett, 2005; Nascimento *et al.*, 2006). *Passion fruit green spot virus* (PGSV) produce puntos verdes con amarillo en los frutos, lesiones necróticas en los tallos y parches verdes en hojas senescentes (Kitajima *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2006).

Los principales mecanismos de transmisión de virus en pasifloras son la transmisión por insectos vectores y por lesiones mecánica. Especies de áfidos han sido reportadas como vectores de CMV, PLV y virus del género *Potyvirus* (Shukla *et al.*, 1998; Gioria *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2006; Spiegel *et al.*, 2007; Ha *et al.*, 2008). El coleóptero *Diabrotica speciosa* transmitió experimentalmente con baja eficiencia el aislamiento brasilero de PFYMV en condiciones experimentales (Crestani *et al.*, 1986). Las moscas blancas (*Bemisia tabaci*) se encuentran asociadas con la transmisión de virus del género *Begomovirus* como PLLMV y PSLDV (Novaes *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2010). Así mismo, los ácaros (*Brevipalpus phoenecis*) transmiten PGSV (Kitajima *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2006).

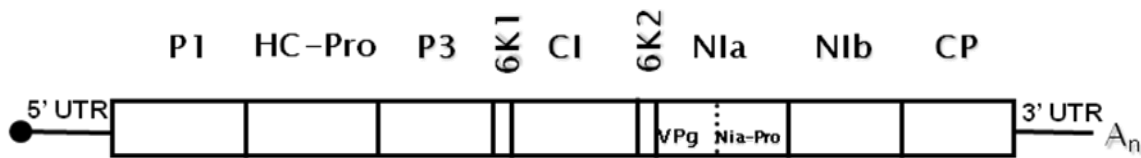
Dos especies virales han sido reportadas en Colombia como agentes causales de enfermedad en el género *Passiflora*, particularmente en maracuyá y/o granadilla: *Soybean mosaic virus* (SMV) (Benschler *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2001) y *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV)

(Morales *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2002). El estudio de enfermedades virales en Colombia no ha sido enfocado sobre virus que infectan gulupa. Por lo anterior, se considera que los virus que infectan maracuyá y granadilla probablemente infectan gulupa. Un primer acercamiento hacia el diagnóstico de enfermedades virales en gulupa ha sido realizado en la clínica de plantas y el laboratorio de biotecnología vegetal de la Facultad de Agronomía (Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá), en el cual muestras de plantas de gulupa provenientes de Venecia (Cundinamarca) con síntomas asociados a infección viral revelaron la presencia de fragmentos de dsRNA empleando el método de extracción por cromatografía en columna de celulosa Whatman CF-11, lo cual sugirió la presencia de virus no identificados en este cultivo.

### **3.2. Principales virus que infectan especies del género *Passiflora***

#### **3.2.1. *Potyvirus***

La familia *Potyviridae* es la familia más numerosa de virus de plantas con RNA de cadena sencilla con sentido positivo (ssRNA). A partir de las características genómicas y los vectores de transmisión, los miembros de la familia son clasificados en siete géneros: *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Brambyvirus*, *Macluvirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus* y *Rymovirus*, de los cuales el género más grande es *Potyvirus* (Shukla *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 2008; Carstens, 2010). Los miembros del género *Potyvirus* tienen partículas largas flexuosas de 650 a 950 nm de longitud y 11 a 15 nm de ancho, su genoma es monoportatita ssRNA con sentido positivo de ~10 Kb y codifica una poliproteína de ~350 kDa (Jan & Yeh, 1995; Benscher *et al.*, 1996; Brunt *et al.*, 1996; Fischer & Rezende, 2008).



**Figura 1.** Diagrama de la organización del genoma de los virus del género *Potyvirus*.

El genoma se caracteriza por una región 5' no traducida (5' NTR), una proteína ligada al genoma (VPg), un único marco abierto de lectura (ORF) y una región 3' no traducida (3' NTR) terminando en una cola poliadenilada (polyA) (Figura 1). El ORF codifica una única poliproteína de 350 kDa que es procesada en diez proteínas funcionales llamadas: primera proteína (P1), componente asistente proteasa (HC-Pro), tercera proteína (P3), 6K1, proteína de inclusión cilíndrica (CI), 6K2, pequeña proteína de inclusión nuclear (N1a; incluyendo dominios VPg y proteasa N1a-Pro), gran proteína de inclusión nuclear (N1b; replicasa) y proteína de cápside (CP) (Shukla *et al.*, 1998; Mlotshwa *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2008).

Varias enfermedades de pasifloras han sido asociadas con virus del género *Potyvirus* en diferentes lugares del mundo. Entre los virus reportados se encuentran *Passion fruit woodiness virus* (PWV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Passiflora ringspot virus* (PFRSV), *Passion fruit crinkle virus* (PCV), *Passionfruit mottle virus* (PaMV), *East Asian passiflora virus* (EAPV) y *Sri Lankan passion fruit mottle virus* (SLPMoV) (Brunt *et al.*, 1996; Liberato & Murilo, 2003). Los síntomas inducidos por estos potyvirus son variables. PWV y CABMV causan mosaicos, rugosidad y distorsión en las hojas, reducción del desarrollo de la planta, y endurecimiento y deformación de los frutos (Fischer & Rezende, 2008). La infección con SMV ha sido asociada a mosaicos, epinastia, defoliación y muerte prematura de las plantas (Benschler *et al.*, 1996). Pasifloras infectadas con PFRSV mostraron moteados en

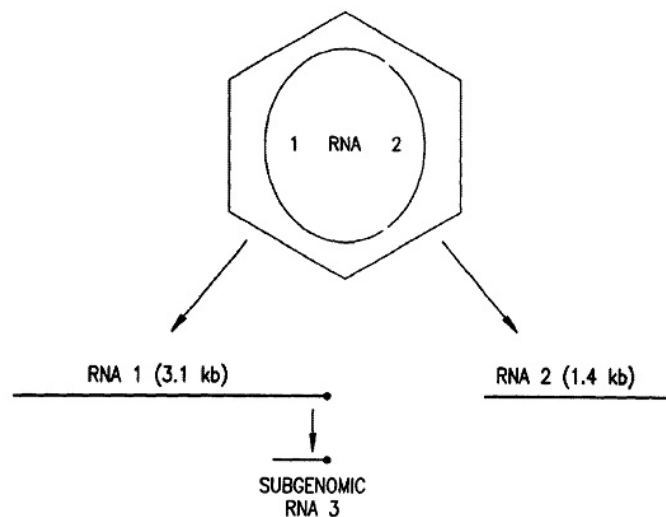
hojas y manchas anulares en hojas jóvenes (De Wijs, 1974). PaMV se encuentra asociado a mosaicos (Chang, 1992). Plantas infectadas con EAPV muestran puntos cloróticos en las hojas y moteados o decoloración en los frutos (Iwai *et al.*, 2006).

La mayoría de los potyvirus son transmitidos por varias especies de áfidos, tales como *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *Toxoptera citricidus*, en una manera no persistente y no circulativa, también son transmitidos mecánicamente y en las semillas de algunos hospederos (Shukla *et al.*, 1998; Nascimento *et al.*, 2006; Fischer & Rezende, 2008; Ha *et al.*, 2008). En cultivos de maracuyá de Sao Paulo - Brasil, se observó la transmisión mecánica de CABMV durante las prácticas de podas por cuchillos, tijeras y agujas. Así mismo, ninguno de los potyvirus reportados para *Passiflora* spp. fueron transmitidos por semilla (Fischer & Rezende, 2008).

El rango de hospederos de PWV, CABMV, PFRSV, PaMV y EAPV se encuentra restringido a especies de las familias Passifloraceae, Fabaceae (Leguminosae), Solanaceae (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii* y *N. tabacum*), Chenopodiaceae (*Chenopodium album*, *C. amaranticolor* y *C. quinoa*) y Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*). Algunas especies de pasifloras susceptibles a los mencionados potyvirus, desarrollaron infección sistémica, la cual puede ser sintomática o latente. Especies de fabáceas pueden desarrollar infección sistémica sintomática o latente dependiendo de la interacción especie/variedad/potyvirus. Especies de nicotianas susceptibles usualmente desarrollan infección sistémica, mientras que las chenopodiáceas únicamente muestran lesiones locales en las hojas inoculadas (De Wijs, 1974; Chang, 1992; Fischer & Rezende, 2008).

### 3.2.2. *Cucumber mosaic virus* (CMV)

*Cucumber mosaic virus* es el miembro tipo del género *Cucumovirus*. Se encuentra distribuido en todo el mundo y tiene el rango más amplio de hospederos de todos los virus que infectan plantas, causando graves pérdidas económicas en cultivos de hortalizas, frutas y ornamentales. Las partículas virales son isométricas icosaédricas de ~30 nm en diámetro.



**Figura 2.** Diagrama de la organización del genoma de *Cucumber mosaic virus*.

El genoma de CMV es RNA de cadena sencilla con sentido positivo dividido en tres segmentos (RNA 1, 2 y 3), los cuales son encapsidados separadamente en la misma proteína de cápside, la presencia de las tres partículas es requerida para la infección (Figura 2). Los RNA1 y RNA2 codifican las proteínas 1a y 2a, respectivamente, las cuales son necesarias para la replicación de RNA viral en cultivo celular. El RNA2 también codifica la proteína 2b, la cual probablemente está involucrada en el movimiento del virus a larga distancia específico del hospedero. El RNA3 codifica dos proteínas, 3a y la proteína de cápside (CP). La proteína 3a es traducida directamente del RNA3 mientras que la CP es traducida del RNA4 subgenómico y su peso molecular es 26 kDa. Estas proteínas son necesarias para el movimiento célula a célula, mientras que CP

también está implicada en el movimiento a larga distancia del virus (Gioria *et al.*, 2002; Fischer & Rezende, 2008).

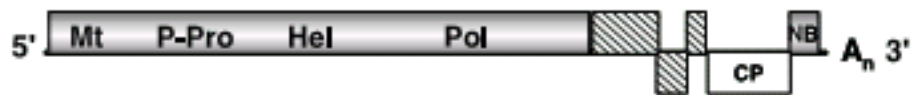
El virus es transmitido naturalmente por varias especies de áfidos en una manera no persistente, y también se transmite mecánicamente a plántulas (Gioria *et al.*, 2002; Fischer & Rezende, 2008).

La detección de CMV en plantas de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) fue reportada por primera vez en Australia. Algunas investigaciones han detectado infección mixta de CMV y PWV; sin embargo, en Brasil, CMV ha sido considerado un patógeno de menor importancia debido a que el virus presenta movimiento sistémico limitado en la planta (Gioria *et al.*, 2002).

Los síntomas causados por CMV en pasifloras están restringidos a pequeñas porciones de las ramas, las hojas infectadas presentan puntos o manchas anulares de color amarillo brillante, la intensidad de los síntomas disminuye hacia la punta de la rama, algunas hojas a medida que crecen pueden volver a ser asintomáticas. La reducción de los síntomas es acompañada por la desaparición de CMV, y el mecanismo por el cual ocurre este fenómeno es aún desconocido (Gioria *et al.*, 2002; Rigden & Newett, 2005; Fischer & Rezende, 2008).

### **3.2.3. *Passiflora latent virus* (PLV)**

*Passiflora latent virus* pertenece al género *Carlavirus*, la secuencia completa de su genoma y su relación con otros carlavirus se publicó en el 2007 (Spiegel *et al.*, 2007). Las partículas virales son flexuosas de 600 a 700 nm de longitud y 12 a 13 nm de ancho, su genoma es monoportatita ssRNA con sentido positivo de ~8386 nucleótidos excluyendo la cola poliadenilada (Figura 3) (Pares *et al.*, 1997; Spiegel *et al.*, 2007; Gaspar *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Diagrama de la organización del genoma de los virus del género *Carlavirus*.

El virus es transmitido por áfidos en una manera no persistente y no circulativa. El rango experimental de hospederos de PLV se limita a *Passiflora* spp., *Chenopodium murale*, *C. amaranticolor* y *C. quinoa* (Spiegel *et al.*, 2007). En todas las especies de *Passiflora* el virus causa un mosaico foliar sistémico; en *C. amaranticolor* las lesiones locales son cloróticas, y en *C. quinoa* las lesiones locales son cloróticas y se presenta clorosis sistémica (St Hill *et al.*, 1992; Hicks *et al.*, 1996).

### 3.2.4. *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV)

*Passion fruit yellow mosaic virus* pertenece al género *Tymovirus*. Las partículas virales son isométricas de ~30 nm en diámetro. La infección de *Passiflora* spp. con PFYMV sólo ha sido reportada en cultivos de maracuyá de Brasil y Colombia (Crestani *et al.*, 1986; Morales *et al.*, 2002). Los síntomas causados por PFYMV son mosaicos y amarillamiento de nervaduras (Morales *et al.*, 2001), las plantas infectadas exhiben un característico mosaico amarillo brillante. Aislamientos de Brasil han sido transmitidos mecánicamente solo a especies de *Passiflora* (Crestani *et al.*, 1986), mientras que aislamientos colombianos se han transmitido a tres especies de *Physalis* (Morales *et al.*, 2002). El coleóptero *Diabrotica speciosa* experimentalmente solo transmitió con baja eficiencia el aislamiento brasileño de PFYMV (Crestani *et al.*, 1986).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- Detectar e identificar los virus asociados a enfermedades de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en cultivos de las regiones Sumapaz y Tequendama del departamento de Cundinamarca.

### 4.2. Objetivos específicos

- Describir los síntomas asociados a enfermedades virales que presenten las plantas de gulupa en campo, mediante la observación directa y registro fotográfico de las plantas muestreadas en los sitios de evaluación.
- Detectar los virus presentes en el cultivo de gulupa mediante RT-PCR y/o ELISA, y definir su identidad mediante secuenciación.
- Confirmar que el virus identificado es uno de los agentes etiológicos de la enfermedad observada en campo, mediante la inoculación de plantas sanas y evaluación de expresión de síntomas en invernadero.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Muestreo y recolección de material vegetal

El muestreo se realizó en cultivos de gulupa ubicados en diferentes veredas de los municipios Granada, San Bernardo, Tibacuy y Venecia del departamento de Cundinamarca (Anexo 1). En las unidades productivas visitadas se realizó un recorrido para detectar aquellas plantas con síntomas asociados a infección viral, tales como manchas verdes en frutos inmaduros, manchas anulares en frutos maduros, deformación en las puntas terminales de las ramas, deformación foliar, mosaicos foliares y clorosis. A las plantas con posibles síntomas de infección viral se les realizó registro fotográfico, descripción de síntomas y recolección de tejidos sintomáticos. El material vegetal recolectado fue macerado con nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### 5.2. Extracción de RNA

Debido a que no existe un protocolo establecido para extracción de RNA viral en plantas de gulupa, se ensayaron tres procedimientos de extracción de RNA. Se evaluaron los procedimientos de extracción de RNA con cromatografía en columna de celulosa Whatman CF-11 (Moreno *et al.*, 1990), TRIzol (Invitrogen) y el protocolo de extracción de RNA para pino (Chang *et al.*, 1993). El método más eficiente fue el tercero, al que se le hicieron las siguientes modificaciones: En un tubo Falcon con capacidad mínima de 15 ml conteniendo 2 g del tejido pulverizado, se adicionaron 3 ml de buffer de extracción (2% CTAB, 100mM Tris HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1,4M NaCl, 1%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 2% PVP-40 y 2%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se llevó a incubación a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Luego, se extrajo dos veces la fase acuosa agregando un volumen igual de cloroformo - isoamil alcohol (24:1), y las fases se separaron centrifugando a 12000 rpm por

15 minutos. La fase acuosa obtenida (1 ml) fue transferida a un tubo eppendorf de 2 ml, se adicionó un volumen igual de 4M LiCl<sub>2</sub> y se incubó a 4°C toda la noche para precipitar el RNA. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos, y el pellet obtenido fue resuspendido en 500 µl de buffer TE-SDS (100mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA y 1% SDS). A la solución homogenizada se le adicionaron 700 µl de isopropanol y 200 µl de 5M NaCl, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó a -20°C por 30 minutos. Finalmente, se precipitó por centrifugación a 12000 rpm por 15 minutos, el pellet se lavó con etanol al 70%, centrifugando a 12000 rpm por 2 minutos. El pellet obtenido se secó a 40°C por 15 minutos y fue resuspendido en 50 µl de agua libre de RNasas, finalmente se almacenó a -20°C (Anexo 2).

### 5.3. Diseño de primers

Los primers empleados en este estudio son listados en la Tabla 2. Los primers para amplificación por RT-PCR de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) y *Soybean mosaic virus* (SMV) fueron diseñados a partir del alineamiento de secuencias depositadas y disponibles en el GenBank. Los primers específicos para *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Tomato ringspot virus* (ToRSV), y los primers universales para los géneros *Potyvirus* y *Carlavirus* fueron previamente reportados y evaluados en otros estudios (Cuspoca, 2007; Gaspar *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2008).

Los primers PWV-R y PWV-F fueron diseñados inicialmente para amplificación por RT-PCR de *Passionfruit woodiness virus* (PWV) basados en secuencias brasileñas depositadas en el GenBank; sin embargo, el análisis filogenético de las secuencias completas de proteína de cápside (CP) indicó una relación cercana entre los aislamientos brasileiros de PWV y CABMV.

Por lo cual, todos los aislamientos caracterizados en Brasil fueron clasificados como CABMV, y aquellos designados como PWV en el GenBank fueron reasignados a CABMV (Nascimento *et al.*, 2004; Alfenas *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2006).

**Tabla 2.** Primers evaluados para la identificación de virus en gulupa.

<b>VIRUS<sup>1</sup></b>	<b>PRIMERS</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>	<b>PRODUCTO ESPERADO</b>	<b>REFERENCIA</b>
CABMV	PWV-R	CAggTgAAgTTCCATTTTCAATgCAC	397 pb	Este estudio
	PWV-F	gATggAAAaggACAAaggATTAgATgC		
CABMV	CABMV-R	AATgCACCAAACCATgAACCCATTC	381 pb	Este estudio
	CABMV-F	TCTgATggAAAaggACAAAgAATTgg		
PFYMV	PFYMV-R	AggAATggAgTCAgATTTggTgTTg	326 pb	Este estudio
	PFYMV-F	gCgCATgCTTCgATTTCTTTgCAg		
CMV	CMV-R	CgACTTCAACAggCgAgC	559 pb	Cuspoca, 2007
	CMV-F	CTgAgTgTgACCTAgg		
ToRSV	ToRSV-R	gCCAAAATgTAATggggc	364 pb	Cuspoca, 2007
	ToRSV-F	CCTgCAgAAgCgATTgg		
SMV	CISMV-R	CgACTATgAAgTgCggTTTC	638 pb	Este estudio
	CISMV-F	CAACAggTTTACCACACCAC		
SMV	CPSMV-R	gCTgCATCTgAgAAATggTg	465 pb	Este estudio
	CPSMV-F	gATgCAggTAAggATTCAAg		
<i>Potyvirus</i>	CI-R	ACICCRTTYTCDATDATRRTTIgTIgC	~700 pb	Ha <i>et al.</i> , 2008
	CI-F	ggIVVIgTIggIWSIggIAARTCIAC		
<i>Carlavirus</i>	CarlaCP-R	ggBYTNggBgTNCNACNgA	940 pb	Gaspar <i>et al.</i> , 2008
	Carla-F	Oligo d(T21)		

1. CABMV: *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. PFYMV: *Passion fruit yellow mosaic virus*. CMV: *Cucumber mosaic virus*. ToRSV: *Tomato ringspot virus*. SMV: *Soybean mosaic virus*.

En este estudio se emplearon primers degenerados debido a que permiten tanto la detección de especies conocidas como la de virus desconocidos pertenecientes a un mismo género. El diseño de los primers degenerados depende de las secuencias disponibles, por lo cual el diseño de primers usando un número pequeño de secuencias podría no cubrir las variaciones de especies desconocidas en el respectivo género de virus (Langeveld *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2010).

#### **5.4. Retrotranscripción (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

A partir del RNA obtenido de cada uno de los aislamientos, se sintetizó DNA copia (cDNA) empleando los diferentes primers diseñados (Tabla 2) y transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) (Anexo 3). Al RNA (5  $\mu$ l) previamente denaturado a 95°C por 5 minutos, se le adicionó la mezcla de reacción (20  $\mu$ l) de RT, que contenía una concentración final de 1X Buffer RT, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M primer reverso, 0,4 U/ $\mu$ l inhibidor de RNasa (RNaseOUT Invitrogen) y 4 U/ $\mu$ l transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Se realizó un ciclo de retrotranscripción de 90 minutos a 37°C, finalmente la retrotranscriptasa se inactivó a 70°C por 10 minutos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) (Anexo 4). Al cDNA (5  $\mu$ l) se le adicionó la mezcla de reacción PCR (20  $\mu$ l), que contenía una concentración final de 1X Buffer PCR, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M primer sentido, 0,5  $\mu$ M primer antisentido y 0,04 U/ $\mu$ l *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Según los primers empleados, las condiciones de PCR variaron en el número de ciclos y la temperatura de alineamiento. Las condiciones generales de PCR fueron: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 a 40 ciclos de cada paso de 94°C por 30 segundos, 40°C a 68°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto,

y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos (los respectivos programas de amplificación para la detección de cada virus son presentados en el Anexo 4). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados usando el documentador Gel Doc<sup>TM</sup> XR (Bio-Rad). El tamaño del producto fue determinado usando los marcadores de peso 1 Kb DNA ladder ó 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (Anexo 5).

### **5.5. Clonación y secuenciación**

Los productos de PCR del tamaño esperado para cada virus evaluado, fueron purificados de gel usando el kit GENE CLEAN® (Biomedicals) y fueron ligados al plásmido pCR® 2.1. Posteriormente, el plásmido ligado fue usado para transformar células de *Escherichia coli* DH5α químicamente competentes empleando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Se recolectaron 10 colonias transformadas y el DNA plásmidico fue extraído por el método “ebullición miniprep” (Sambrook *et al.*, 1989). La presencia del inserto se verificó mediante PCR. Tres clones de cada producto purificado fueron secuenciados en dirección sentido y antisentido usando los primers universales T7 y M13.

### **5.6. Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas fueron editadas, ensambladas y alineadas empleando los programas CLC DNA Workbench (CLC Bio®) y ClustalW2. La identidad de las secuencias obtenidas se definió usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permite la comparación con secuencias depositadas en el GenBank. El análisis filogenético se evaluó con el

programa MEGA4.1 usando el algoritmo de máxima parsimonia con bootstrap de 1000 réplicas (Tamura *et al*, 2007), las distancias evolutivas se evaluaron por el método de Kimura-2 parámetros. En la construcción de los árboles filogenéticos se eliminaron las secuencias idénticas.

En el análisis filogenético se incluyeron secuencias del gen CI de *Soybean mosaic virus* depositadas en el GenBank provenientes de Canadá (EU871724.1, EU871725.1), Corea (FJ640955.1, FJ640966.1, FJ640975.1, FJ640976.1) y Estados Unidos (D00507.2, FJ640979.1) (Seo *et al.*, 2009). También se incluyó como grupo externo la secuencia del gen CI de un aislamiento de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (NC\_004013.1).

### **5.7. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

La detección mediante ELISA se realizó para CMV usando un kit ADGEN® suministrado por la Dra. Adriana Castañeda (Instituto Colombiano Agropecuario), para SMV usando un kit AGDIA® y para *Potyvirus* usando un kit BIOREBA®. También se realizó ELISA empleando un anticuerpo para CABMV suministrado por el Dr. Jorge Rezende (Universidad de Sao Paulo, Brasil). Se procesaron algunas de las muestras recolectadas en campo, así como muestras de plantas de gulupa inoculadas mecánicamente.

Las pruebas ELISA se realizaron siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante de cada kit ELISA. Los resultados se registraron mediante la medición de la absorbancia a 405 nm, se consideraron muestras positivas a aquellas que duplicaran la media de la lectura del control negativo.

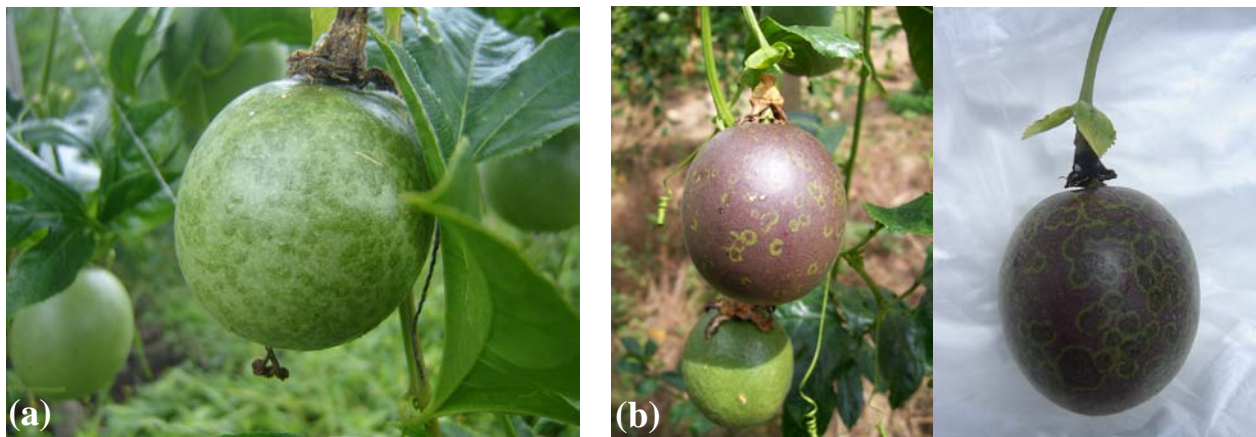
### **5.8. Inoculación mecánica en plántulas**

Para confirmar que el virus identificado es uno de los agentes etiológicos de la enfermedad observada en campo, se realizó inoculación de plantas sanas de gulupa, las cuales se mantuvieron en un cuarto de crecimiento. Las plantas sanas se obtuvieron de viveros y fueron evaluadas mediante RT-PCR para determinar ausencia de infección por SMV y/o CMV. El inóculo viral fue tomado de las plantas muestreadas y codificadas como 37, 40 y 50 para inocular mecánicamente plántulas de gulupa. Las muestras seleccionadas se maceraron en un mortero agregando buffer de fosfato salino (PBS) pH 7.2. Antes de ser inoculadas, las hojas jóvenes de las plántulas de gulupa se frotaron con carbodorum. Inmediatamente, el extracto obtenido de la maceración del tejido de plantas infectadas se frotó con una gasa estéril. Posteriormente se evaluó la expresión de síntomas y se detectó la presencia del virus inoculado mediante RT-PCR a los 15 después de la inoculación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

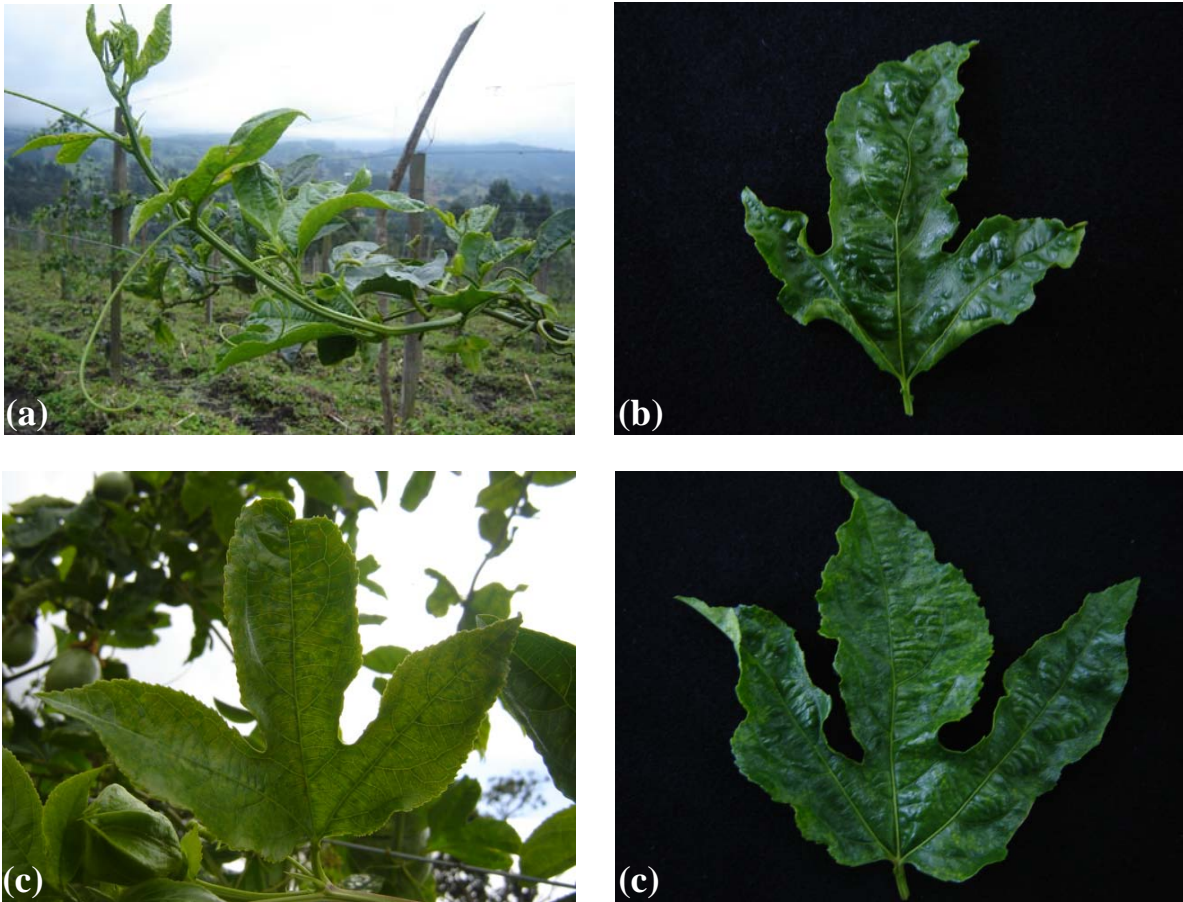
### 6.1. Síntomas asociados a infección viral en gulupa

Un total de 58 muestras de campo fueron recolectadas: 7 provienen de Granada, 13 de San Bernardo, 4 de Tibacuy, 32 de Venecia y 2 de Ibagué. Adicionalmente, se evaluaron 45 plantas procedentes de viveros de propagación (Anexo 1). Como controles positivos, se incluyeron 2 muestras de soya y 2 muestras de maracuyá que exhibían síntomas asociados a infección viral. Las plantas de gulupa recolectadas presentaban síntomas de infección viral en frutos y hojas. Los síntomas característicos en frutos fueron diferentes de acuerdo al estado de desarrollo del fruto, siendo manchas verdes en estados inmaduros y manchas anulares en estados maduros (Figura 4). En la parte aérea de la planta se presentaba deformación en las puntas terminales de las ramas, deformación foliar, mosaicos foliares y clorosis (Figura 5).



**Figura 4.** Síntomas asociados a infección viral en frutos de gulupa. (a) Manchas verdes en frutos inmaduros. (b) Manchas anulares en frutos maduros.



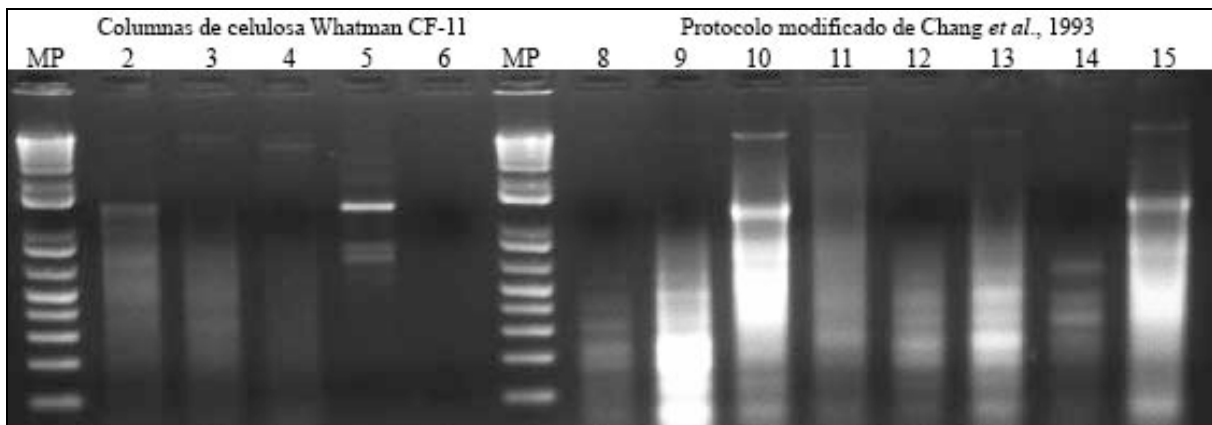


**Figura 5.** Síntomas asociados a infección viral en área foliar de gulupa. (a) Deformación en las puntas terminales de las ramas. (b) Deformación foliar. (c) Mosaicos foliares y clorosis.

Los mosaicos y la deformación foliar fueron los síntomas que se observaron con mayor frecuencia en gulupa. Los síntomas asociados a enfermedades virales en maracuyá con mayor frecuencia son vejigas, deformación foliar, hojas coriáceas y mosaicos (Chávez *et al.*, 1999). La presencia de partículas filamentosas de *Soybean mosaic virus* en tejidos de maracuyá ha sido asociada a síntomas de deformación foliar, mosaicos y manchas anulares en frutos (Morales *et al.*, 2001).

## 6.2. Extracción de RNA

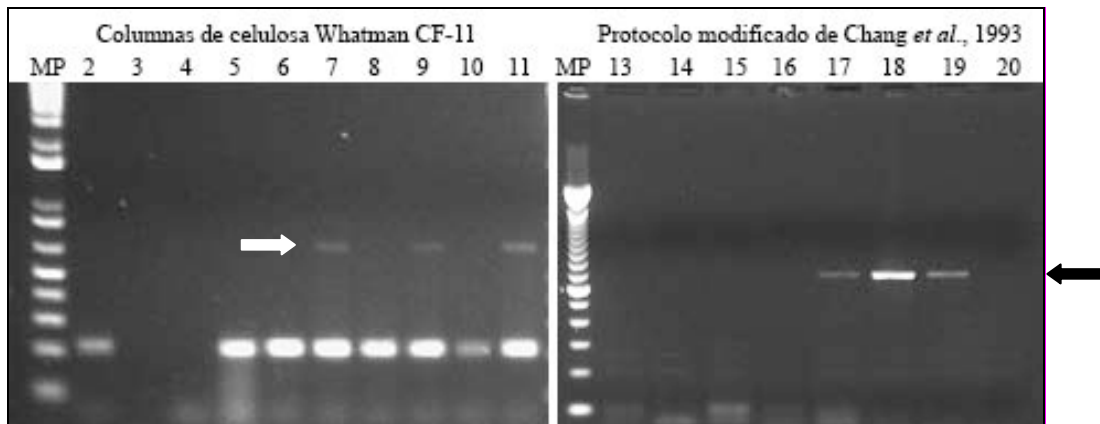
Se evaluaron tres métodos de extracción de RNA a partir de tejido foliar: Cromatografía en columna de celulosa Whatman CF11 (Moreno *et al.*, 1990), TRIzol (Invitrogen) y protocolo de extracción para pino (Chang *et al.*, 1993), siendo este último método el que presentó mayor eficiencia. Los patrones electroforéticos RNA obtenidos en algunos extractos de plantas procedentes de San Bernardo y Venecia correspondieron a fragmentos de 10.000 pb (Figura 6).



**Figura 6.** Patrones electroforéticos de RNA de plantas de gulupa que exhiben síntomas sugestivos de infección viral, obtenidos mediante dos procedimientos de extracción de RNA. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). Carril: 2 y 8 aislamiento 19. 3 y 10 aislamiento 30. 4 aislamiento 33. 5 y 13 aislamiento 40. 6 y 14 aislamiento 42. 9 aislamiento 20. 11 aislamiento 36. 12 aislamiento 39. 15 aislamiento 43.

Los productos de cada procedimiento de extracción de RNA fueron evaluados mediante RT-PCR usando primers degenerados para *Potyvirus* (Anexo 3). A partir de los extractos de RNA obtenidos empleando columnas de celulosa Whatman CF-11 y el protocolo modificado de Chang *et al.*, 1993 se obtuvo amplificación de productos con el tamaño esperado (Figura 7). En los extractos de RNA obtenidos a partir de TRIzol no se obtuvo producto de PCR.

Debido a que el método de Chang *et al.*, 1993 permitió el procesamiento de un mayor número de muestras en un menor tiempo, este fue seleccionado para continuar realizando el análisis mediante RT-PCR de las muestras colectadas en campo.



**Figura 7.** Análisis RT-PCR empleando primers degenerados para *Potyvirus* en extractos RNA obtenidos por dos procedimientos de extracción. Las flechas indican el producto de PCR esperado (~700 bp). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). Carril: 1 aislamiento 6. 2 aislamiento 13. 3 aislamiento 16. 4 aislamiento 27. 5 aislamiento 27. 6 aislamiento 28. 7 aislamiento 31. 8 aislamiento 34. 9 aislamiento 48. 10 y 18 aislamiento 50. 11 y 19 aislamiento 51. 13 aislamiento 30. 14 aislamiento 36. 15 aislamiento 39. 16 aislamiento 40. 17 aislamiento 42. 20 control negativo.

Aunque en algunas muestras procesadas no se observó la presencia de patrones electroforéticos de RNA que sugieren la presencia de RNA viral, todas las muestras fueron evaluadas mediante RT-PCR usando los diferentes primers diseñados. Debido a que el objetivo del presente trabajo es detectar especies virales que infectan gulupa mediante procedimientos serológicos y/o moleculares, los patrones dsRNA fueron evaluados como fuente de RNA viral más que como método para definir un patrón electroforético asociado a una especie viral. En total se obtuvieron 89 aislamientos, de los cuales: 7 provienen de Granada, 10 de San Bernardo, 4 de Tibacuy, 21 de Venecia, 2 de Ibagué y 45 de viveros de propagación.

### 6.3. Detección de virus de gulupa mediante RT-PCR

La Tabla 3 presenta los resultados de la detección de virus que infectan gulupa, para lo cual se evaluaron primers específicos de seis especies virales y primers degenerados de los géneros *Potyvirus* y *Carlavirus*. Las especies evaluadas fueron *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Passionfruit yellow mosaic virus* (PFYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y *Soybean mosaic virus* (SMV).

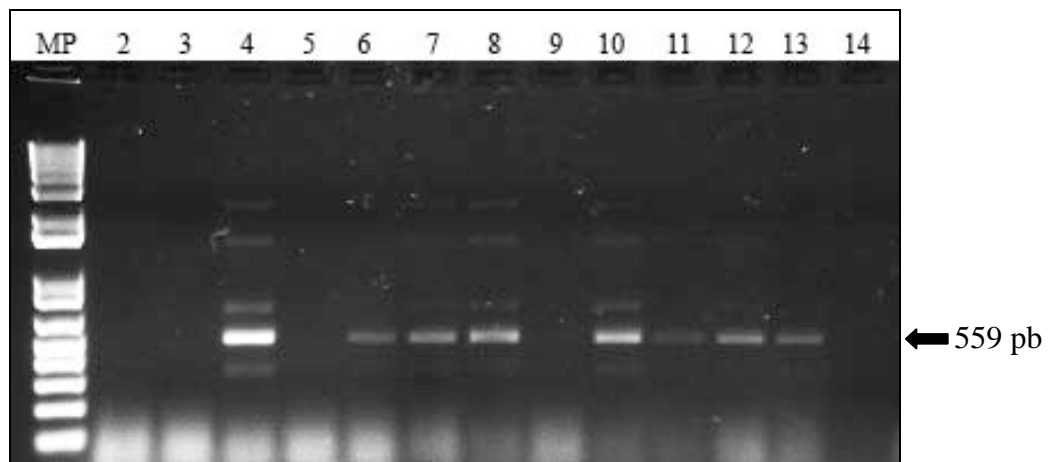
**Tabla 3.** Detección mediante RT-PCR de virus que infectan gulupa.

Origen geográfico	Primers específicos						Primers degenerados		
	CABMV		PFYMV	CMV	ToRSV	SMV		<i>Potyvirus</i>	<i>Carlavirus</i>
	PWV	CABMV				CI	CP		
Ibagué	0/2 <sup>b</sup>	0/2	-	0/1	0/1	0/1	-	0/2	0/1
Tibacuy	-	-	-	0/4	-	1/4	1/1	1/4	-
Granada	0/7	0/2	0/2	5/5	0/5	0/5	-	0/5	0/5
San Bernardo	1/9	0/9	0/8	4/10	0/9	5/10	3/6	5/10	0/9
Venecia	0/15	0/13	0/4	11/19	0/10	9/18	3/5	5/21	0/15
Palmira <sup>a</sup>	-	-	-	0/4	-	3/4	1/3	3/4	-
TOTAL Aislamientos campo	1/33	0/26	0/14	20/43	0/25	18/42	8/15	14/46	0/30
Viveros	-	-	-	3/45	-	36/45	0/8	1/9	-
TOTAL	1/33	0/26	0/14	23/88	0/25	54/87	8/23	15/55	0/30

<sup>a</sup>: Muestras de plantas de soya y maracuyá con síntomas asociados a virus, fueron incluidas como controles positivos. <sup>b</sup>: Productos positivos de PCR sobre el total de muestras analizadas.

A través de la evaluación por RT-PCR no se detectó infección por PFYMV, ToRSV o *Carlavirus*. Una muestra proveniente de San Bernardo resultó positiva para CABMV (Anexo 1).

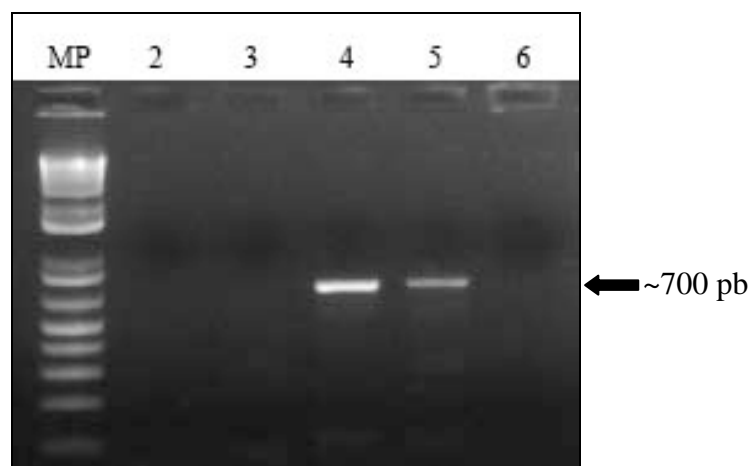
La amplificación con primers específicos para CMV permitió la detección de 20 aislamientos de campo sobre un total de 43 muestras analizadas. El producto de PCR esperado de 559 pb con primers específicos para CMV se muestra en la Figura 8. Los aislamientos de CMV detectados provienen de Granada, San Bernardo y Venecia. Los aislamientos de Granada corresponden a muestras de cultivos localizados en las veredas San Raimundo Alto, La 22 y Guasimal. Los aislamientos detectados en San Bernardo provienen de cultivos de las veredas San Miguel, Santa Helena y Buenos Aires. Los aislamientos de Venecia son originarios de cultivos de las veredas Aposentos Doa, Aposentos Centro, La Chorrera y El Diamante. En la evaluación de plántulas de vivero de propagación, se encontraron 3 plantas infectadas por CMV en una muestra de 45.



**Figura 8.** Detección de *Cucumber mosaic virus* en plantas de gulupa mediante RT-PCR usando primers específicos. La flecha indica el producto de PCR esperado (559 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). Carril 2 a 13: Aislamientos 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 29, 32, 37, 38, 39. Carril 14: Control negativo.

La amplificación con primers degenerados para *Potyvirus* permitió la detección de 11 muestras positivas sobre un total de 42 plantas procedentes de San Bernardo, Venecia y Tibacuy. También se obtuvo amplificación en 3 de 4 muestras de maracuyá y soya provenientes de Palmira, las cuales fueron incluidas como controles positivos. El producto de PCR esperado de ~700 pb con

primers degenerados de *Potyvirus* se presenta en las Figuras 7 y 9. La evaluación de 9 plántulas de vivero de propagación mostró una muestra positiva. Los aislamientos detectados en San Bernardo provienen de cultivos de las veredas San Miguel, Alejandría y Buenos Aires. Los aislamientos de Venecia son originarios de cultivos de las veredas Aposentos Doa, Aposentos Centro y El Diamante.



**Figura 9.** Detección de *Potyvirus* mediante RT-PCR usando primers degenerados. La flecha indica el producto de PCR esperado (~700 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). Carriles 2 a 5: Aislamientos 36, 39, 40, 42. Carril 6: Control negativo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se determinó que de 83 muestras analizadas 11 presentan infección mixta por *Soybean mosaic virus* y *Cucumber mosaic virus* (Tabla 4). Las muestras con infección mixta provienen de los municipios de San Bernardo y Venecia, también se encontró presencia de estos virus en muestras provenientes de viveros. Lo anterior es similar a lo reportado en Australia, donde en una misma planta se ha encontrado infección viral por *Cucumber mosaic virus* y *Passionfruit woodiness virus*, el cual es otro virus del género *Potyvirus* (Gioria *et al.*, 2002; Ridgen & Newett, 2005).

**Tabla 4.** Detección mediante RT-PCR de infecciones mixtas por *Soybean mosaic virus* y *Cucumber mosaic virus* en plantas de gulupa.

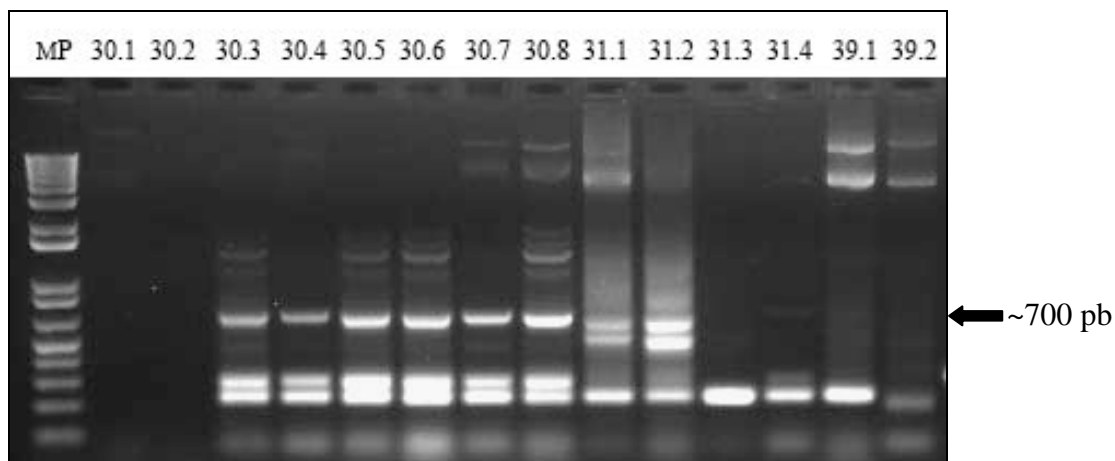
Origen geográfico	SMV		CMV	SMV/CMV
	CI	CP		
Tibacuy	1/4	1/1	0/4	0
San Bernardo	5/10	3/6	4/10	1
Venecia	9/18	3/5	11/19	7
Granada	0/5	-	5/5	0
Viveros	36/45	0/8	3/45	3
TOTAL	51/82	6/20	23/83	11

<sup>a</sup>: Productos positivos de PCR sobre el total de muestras analizadas.

Las plantas muestreadas que presentaron infección mixta exhibían clorosis, deformación y mosaicos foliares. Debido a que dichos síntomas son similares a los exhibidos por plantas con infección viral por *Soybean mosaic virus* ó *Cucumber mosaic virus*, y/o con deficiencias nutricionales, es importante que el diagnóstico este acompañado de otros procedimientos de detección. Así mismo, algunas plantas infectadas con SMV, CMV ó infección mixta pueden volverse asintomáticas dependiendo de las condiciones climáticas, el mecanismo por el cual ese fenómeno sucede aún es desconocido (Ridgen & Newett, 2005).

#### 6.4. Análisis de secuencias

Los productos de PCR obtenidos con primers degenerados para *Potyvirus* fueron purificados de gel con el kit GENE CLEAN® (Biomedicals). Posteriormente, fueron clonados usando el kit TOPO TA 2.1 (Invitrogen) con el propósito de secuenciarlos con los primers universales T7 y M13. Antes de secuenciar, los clones seleccionados fueron evaluados mediante PCR para confirmar la presencia del respectivo inserto (Figura 10).



**Figura 10.** Análisis PCR empleando primers degenerados de *Potyvirus* para verificar la presencia del inserto (producto PCR *Potyvirus*) en los clones seleccionados. La flecha indica el producto de PCR esperado (~700 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

A partir de las secuencias obtenidas se realizó análisis de BLAST con el propósito de definir la identidad del *Potyvirus* que infecta gulupa. Los aislamientos colombianos 30 y 50 mostraron valores de identidad nucleotídica de 95 a 98% con secuencias de aislamientos de *Soybean mosaic virus* provenientes de Canadá, Corea y Estados Unidos (Seo *et al.*, 2009). El producto de PCR del aislamiento 30 presentó homología con el gen de la proteína de cápside (CP), mientras que el del aislamiento 50 mostró complementariedad con el gen de los cuerpos de inclusión cilíndrica (CI). Se diseñaron dos pares de primers específicos a partir de las secuencias obtenidas de los genes CP y CI, con el propósito de confirmar y ampliar la detección mediante RT-PCR de *Soybean mosaic virus* infectando plantas de gulupa (Tabla 2).

Los productos de PCR esperados con los primers específicos para CI (638 pb) y CP (465 pb) se muestran en las Figuras 11 y 12. En la Tabla 5 se describen las muestras evaluadas para cada primer. Se encontró amplificación en plantas provenientes de Tibacuy, San Bernardo, Venecia y

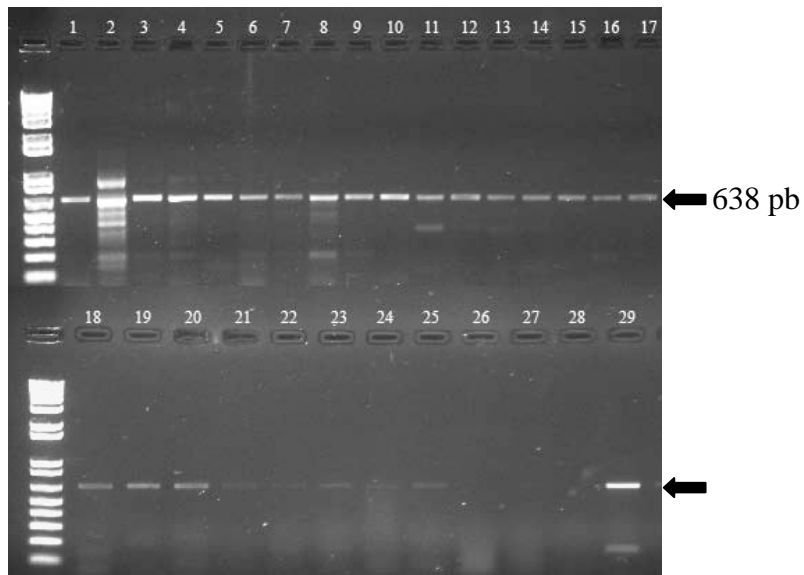


Palmira. Algunas de estas muestras habían sido previamente evaluadas con primers degenerados para *Potyvirus*. También se evaluaron extractos de RNA de plántulas provenientes de diferentes viveros mediante RT-PCR con los primers CI y CP.

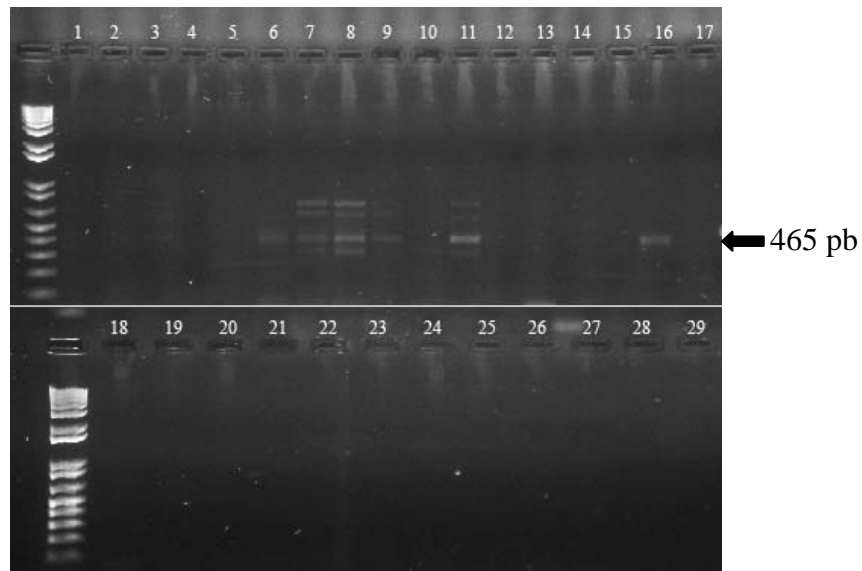
**Tabla 5.** Descripción de los aislamientos evaluados mediante RT-PCR usando los primers CI y CP para *Soybean mosaic virus*.

CARRIL <sup>a</sup>	N° MUESTRA	ORIGEN GEOGRÁFICO	MUESTRA	SMV	
				CI	CP
1	31	San Bernardo	Hojas gulupa	+	-
2	36	San Bernardo	Hojas gulupa	+	-
3	39	San Bernardo	Hojas gulupa	+	+
4	40	San Bernardo	Hojas gulupa	+	-
5	42	Venecia	Hojas gulupa	+	-
6	48	Venecia	Hojas gulupa	+	+
7	50	Venecia	Hojas gulupa	+	+
8	51	Venecia	Hojas gulupa	+	+
9	56A	Tibacuy	Hojas gulupa	+	+
10	56B	Tibacuy	Frutos gulupa	+	-
11	57A	Palmira	Hojas maracuyá	+	+
12	57B	Palmira	Frutos maracuyá	+	-
13	58	Palmira	Hojas soya	+	-
14	59A	Palmira	Hojas maracuyá	+	-
15	59B	Palmira	Frutos maracuyá	+	-
16	61A	Venecia	Hojas gulupa	+	+
17	61B	Venecia	Frutos gulupa	+	-
18	62	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
19	63	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
20	64	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
21	65	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
22	66	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
23	67	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
24	68	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
25	69	Vivero Fusagasugá	Hojas gulupa	+	-
26	70	San Bernardo	Hojas gulupa	-	-
27	71	Venecia	Hojas gulupa	-	-
28	-	Control negativo	Agua	-	-
29	30	San Bernardo	Hojas gulupa	+	-

<sup>a</sup>: El carril corresponde a la posición de la muestra en los geles de agarosa de las Figuras 8 y 9.

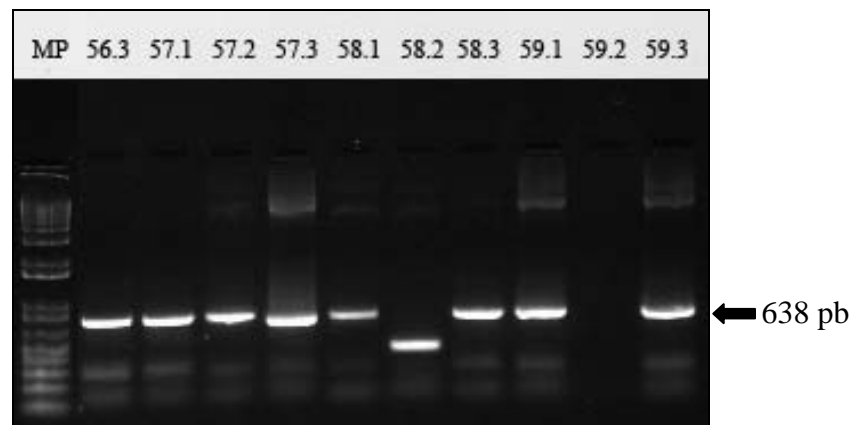


**Figura 11.** Detección de *Soybean mosaic virus* mediante RT-PCR usando primers específicos del gen CI. Las flechas indican el producto de PCR esperado (638 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). Ver descripción de cada carril en la Tabla 4.



**Figura 12.** Detección de *Soybean mosaic virus* mediante RT-PCR usando primers específicos del gen CP. La flecha indica el producto de PCR esperado (465 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). Ver descripción de cada carril en la Tabla 4.

La identidad de los productos de PCR se obtuvo mediante secuenciamiento de nucleótidos, y comparación mediante BLAST con las secuencias depositadas en el GenBank. Antes de secuenciar, los clones seleccionados fueron evaluados mediante PCR para confirmar la presencia del respectivo inserto (Figura 13).

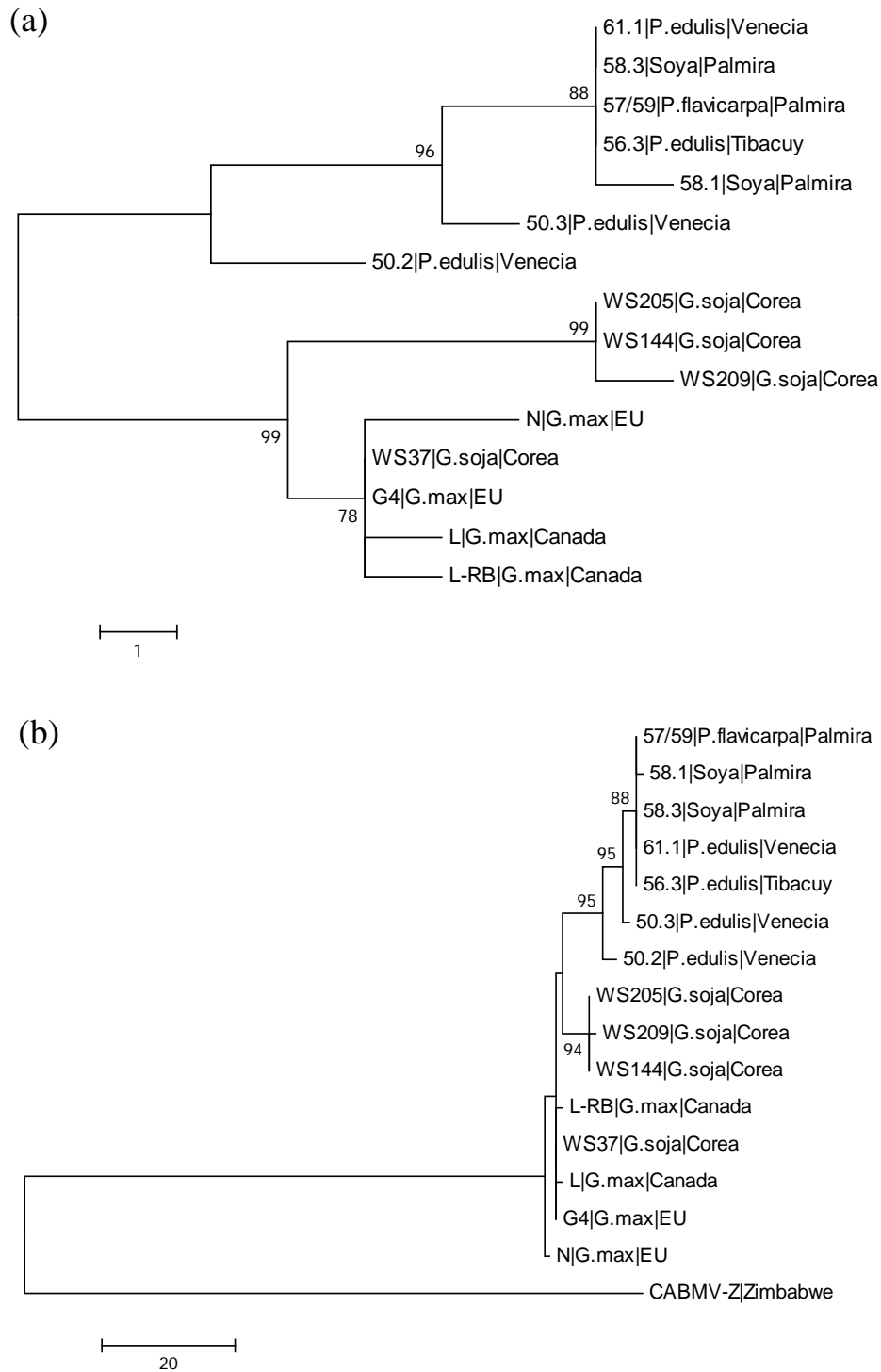


**Figura 13.** Análisis PCR empleando primers del gen CI de *Soybean mosaic virus* para verificar la presencia del inserto (producto PCR SMV) en los clones seleccionados. La flecha indica el producto de PCR esperado (638 pb). MP: Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

Las secuencias obtenidas fueron editadas, ensambladas y alineadas empleando los programas CLC DNA Workbench (CLC Bio®) y ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). Al realizar los alineamientos con las secuencias depositadas en el GenBank, las secuencias obtenidas mostraron entre un 95% y 98% de identidad nucleotídica con secuencias de *Soybean mosaic virus* (Seo *et al.*, 2009). Estos aislamientos provenían de Canadá, Corea y Estados Unidos y corresponden a muestras colectadas en soya cultivada (*Glycine max*) y soya silvestre (*Glycine soja*), el cual es el principal hospedero de SMV.

Las secuencias analizadas en el presente estudio mostraron mayor identidad con las secuencias de los aislamientos L y L-RB provenientes de Canadá, G5H, G6H, G7H, WS37, WS109, WS128, WS144, WS145, WS149, WS160, WS200, WS202, WS205 y WS209 provenientes de Corea, y N, G1, G2, G3 y G4 provenientes de Estados Unidos. Se realizó la comparación entre cada una de las secuencias con relación a porcentaje de identidad y diferencias nucleotídicas para eliminar las secuencias idénticas en la construcción de los árboles filogenéticos. Adicionalmente, se incluyó como grupo externo la secuencia homóloga de un aislamiento del potyvirus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV-Z).

Para el análisis filogenético de las secuencias del gen CI de *Soybean mosaic virus* se incluyeron las secuencias de aislamientos Colombianos obtenidas en el presente trabajo y las secuencias de aislamientos de Canadá, Corea y Estados Unidos depositadas en el GenBank. El análisis se realizó mediante máxima parsimonia y máxima verosimilitud, encontrándose topologías similares en los dos algoritmos. Por lo anterior, solo se ilustran los árboles de máxima parsimonia (Figura 14), en los que se evidencian dos grupos con un soporte mayor al 75%: uno de aislamientos de Colombia que infectan pasifloras (*P. edulis* y *P. edulis* f. *flavicarpa*) y soya, y un segundo grupo que infecta soya cultivada y silvestre en Canadá, Corea y Estados Unidos. Lo anterior sugiere una estructura de población dependiente del origen geográfico e independiente del hospedero, lo cual es evidente en los aislamientos SMV de Colombia que se agrupan a pesar de que provienen de diferentes especies (gulupa, maracuyá y soya). En el presente trabajo se obtuvieron pocas secuencias del gen de la proteína de cápside de SMV, por lo cual no fue posible realizar un análisis amplio respecto a este gen.



**Figura 14.** Árboles de máxima parsimonia de relaciones filogenéticas en el gen CI de *Soybean mosaic virus*. Los árboles fueron construidos con bootstrap de 1000 réplicas. (a) Árbol sin raíz de las secuencias de SMV. (b) Árbol filogenético incluyendo como grupo externo un aislamiento de *Cowpea aphid-borne mosaic virus*.

El valor de la media general de diversidad nucleotídica para la región CI de SMV es 0,0139±0,0029 ( $\pm$  error estándar). La Tabla 6 presenta los valores de distancias genéticas entre pares de secuencias del gen CI en aislamientos SMV que infectan pasifloras y soya en Colombia, respecto a aislamientos que infectan soya en otros países. Como grupo externo se incluyó la secuencia del gen CI del aislamiento CABMV-Z de Zimbabwe. Las distancias genéticas dentro del grupo de aislamientos colombianos se encuentran en un rango de 0,0016 a 0,0128, y con respecto al grupo de aislamientos que infectan soya en Corea se presentan distancias nucleotídicas en un rango de 0,0145 a 0,0259.

**Tabla 6.** Distancias genéticas del gen CI en aislamientos de *Soybean mosaic virus*.

AISLAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
50.2 P.edulis Venecia		0,0036	0,0039	0,0039	0,0041	0,0039	0,0039	0,0049	0,0048	0,0045	0,0052	0,0045	0,0054	0,0052	0,0052	0,0269	1
50.3 P.edulis Venecia	0,0096		0,0026	0,0026	0,0031	0,0026	0,0026	0,0054	0,0053	0,0051	0,0057	0,0051	0,0060	0,0057	0,0057	0,0273	2
56.3 P.edulis Tibacuy	0,0112	0,0048		0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0056	0,0055	0,0053	0,0058	0,0053	0,0061	0,0058	0,0058	0,0271	3
57/59 P.flavicarpa Palmira	0,0112	0,0048	0,0000		0,0015	0,0000	0,0000	0,0056	0,0055	0,0053	0,0058	0,0053	0,0061	0,0058	0,0058	0,0271	4
58.1 Soya Palmira	0,0128	0,0064	0,0016	0,0016		0,0015	0,0015	0,0057	0,0056	0,0054	0,0060	0,0054	0,0061	0,0059	0,0059	0,0271	5
58.3 Soya Palmira	0,0112	0,0048	0,0000	0,0000	0,0016		0,0000	0,0056	0,0055	0,0053	0,0058	0,0053	0,0061	0,0058	0,0058	0,0271	6
61.1 P.edulis Venecia	0,0112	0,0048	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000		0,0056	0,0055	0,0053	0,0058	0,0053	0,0061	0,0058	0,0058	0,0271	7
L-RB G.max Canada	0,0161	0,0194	0,0210	0,0210	0,0226	0,0210	0,0210		0,0022	0,0015	0,0027	0,0015	0,0040	0,0036	0,0036	0,0263	8
L G.max Canada	0,0161	0,0194	0,0210	0,0210	0,0226	0,0210	0,0210	0,0032		0,0015	0,0027	0,0015	0,0041	0,0037	0,0037	0,0264	9
G4 G.max EU	0,0145	0,0177	0,0193	0,0193	0,0210	0,0193	0,0193	0,0016	0,0016		0,0022	0,0000	0,0038	0,0034	0,0034	0,0264	10
N G.max EU	0,0177	0,0210	0,0226	0,0226	0,0243	0,0226	0,0226	0,0048	0,0048	0,0032		0,0022	0,0043	0,0040	0,0040	0,0261	11
WS37 G.sojal Corea	0,0145	0,0177	0,0193	0,0193	0,0210	0,0193	0,0193	0,0016	0,0016	0,0000	0,0032		0,0038	0,0034	0,0034	0,0264	12
WS209 G.sojal Corea	0,0210	0,0243	0,0259	0,0259	0,0276	0,0259	0,0259	0,0112	0,0112	0,0096	0,0128	0,0096		0,0016	0,0016	0,0266	13
WS144 G.sojal Corea	0,0194	0,0226	0,0243	0,0243	0,0259	0,0243	0,0243	0,0096	0,0096	0,0080	0,0112	0,0080	0,0016		0,0000	0,0266	14
WS205 G.sojal Corea	0,0194	0,0226	0,0243	0,0243	0,0259	0,0243	0,0243	0,0096	0,0096	0,0080	0,0112	0,0080	0,0016	0,0000		0,0266	15
CABMV-Z Zimbabwe	0,3530	0,3555	0,3557	0,3557	0,3585	0,3557	0,3557	0,3395	0,3422	0,3422	0,3393	0,3422	0,3473	0,3446	0,3446		16

Valores de distancias genéticas estimadas por el método Kimura-2 parámetros se presentan debajo de la diagonal y los valores de error estándar se muestran arriba de la diagonal. Columna 16, aislamiento de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* como grupo externo.

Un estudio reciente basado en las secuencias completas del genoma de 44 aislamientos de SMV infectando soya, mostró que la estructura de la población de SMV es genéticamente conservada, y las proteínas P1 y P3 fueron más variables que otras proteínas (Seo *et al.*, 2009). Lo anterior, es similar a lo reportado para secuencias completas del genoma de *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, donde P1 y P3 son las proteínas más variables, y CI, Nib y CP son las proteínas más

conservadas (Mlotshwa *et al.*, 2006). La existencia de dos grupos de SMV relacionados con origen geográfico y que se evidencia a partir del análisis del gen CI, constituye una observación original del presente trabajo. Por lo anterior, se recomienda ampliar la evaluación de secuencias génicas variables (P1 y/o P3) en un mayor número de aislamientos SMV.

### 6.5. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

La detección mediante PTA-ELISA se realizó para *Cucumber mosaic virus* usando un kit ADGEN®. El resultado mostró 7 muestras positivas sobre un total de 24 muestras analizadas. Los aislamientos positivos provienen de Granada y Venecia (Anexo 6). En la Tabla 7 se presentan los resultados de detección de CMV obtenidos mediante ELISA y RT-PCR. Estos resultados indican que la detección de CMV mediante RT-PCR tiene mayor sensibilidad que la evaluación mediante ELISA.

**Tabla 7.** Comparación de procedimientos de detección de *Cucumber mosaic virus*.

ORIGEN GEOGRÁFICO	DETECCIÓN CMV <sup>a</sup>	
	ELISA	RT-PCR
Granada	3/5	5/5
San Bernardo	0/5	4/5
Venecia	4/14	10/14

<sup>a</sup>: Número de plantas positivas / Número de plantas evaluadas.

La detección de *Potyvirus* se realizó mediante PTA-ELISA usando un kit BIOREBA® y para la detección de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido por el grupo de investigación de J. Rezende (Universidad de Sao Paulo, Brasil). Para *Potyvirus* se encontraron 25 muestras positivas sobre un total de 42 muestras analizadas, los aislamientos positivos provienen de Granada, Tibacuy, Venecia, San Bernardo, Palmira y viveros. Para CABMV se encontraron 11 muestras positivas sobre un total de 42 muestras analizadas, los aislamientos positivos provienen de Granada, Venecia, San Bernardo, Palmira y viveros (Anexo 7). La detección mediante DAS-ELISA se realizó para *Soybean mosaic virus* usando un kit AGDIA®, se encontraron 17 muestras positivas sobre un total de 42 muestras analizadas, los aislamientos positivos provienen de Venecia, San Bernardo y Palmira (Anexo 7). En la Tabla 8 se presentan los resultados de detección de *Potyvirus*, CABMV y SMV obtenidos mediante ELISA y RT-PCR. Estos resultados indican que la detección mediante ELISA tiene mayor sensibilidad que la evaluación mediante RT-PCR.

**Tabla 8.** Comparación de procedimientos de detección de *Potyvirus*, *Soybean mosaic virus* y *Cowpea aphid-borne mosaic virus*.

ORIGEN GEOGRÁFICO	<i>Potyvirus</i>		SMV		CABMV	
	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA
Granada	0/5 <sup>a</sup>	2/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Tibacuy	1/1	1/1	1/1	0/1	-	0/1
Venecia	5/17	12/17	9/17	11/17	0/12	3/17
San Bernardo	3/8	5/8	3/8	4/8	1/7	5/8
Palmira	3/4	3/4	3/4	2/4	-	1/4
Viveros	-	2/7	4/7	0/7	-	1/7

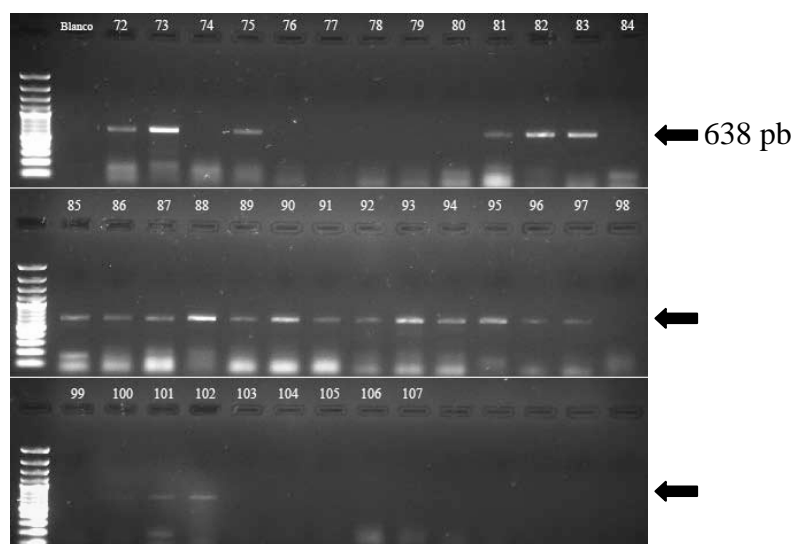
<sup>a</sup>: Número de plantas positivas / Número de plantas evaluadas.



La presente detección mediante ELISA de *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, es el primer reporte de infección por este virus en pasifloras de Colombia. Sin embargo, para confirmar la presencia de este virus en el país, es necesario complementar las pruebas serológicas con análisis de secuencias y de relaciones evolutivas.

### 6.6. Inoculación mecánica en plántulas

Con el fin de comprobar la transmisión de SMV y CMV en plantas de gulupa se inocularon mecánicamente plántulas sanas. Las plantas seleccionadas fueron previamente evaluadas mediante RT-PCR para determinar ausencia de infección por SMV y CMV, y las plantas enfermas fueron separadas para hacer seguimiento de expresión de síntomas. Debido a que en las primeras plántulas evaluadas se detectó infección viral, se procedió a evaluar plántulas de diferentes viveros, encontrándose la presencia de SMV en el 80% de plántulas evaluadas y CMV en el 8,9% de plántulas evaluadas (Figura 15).

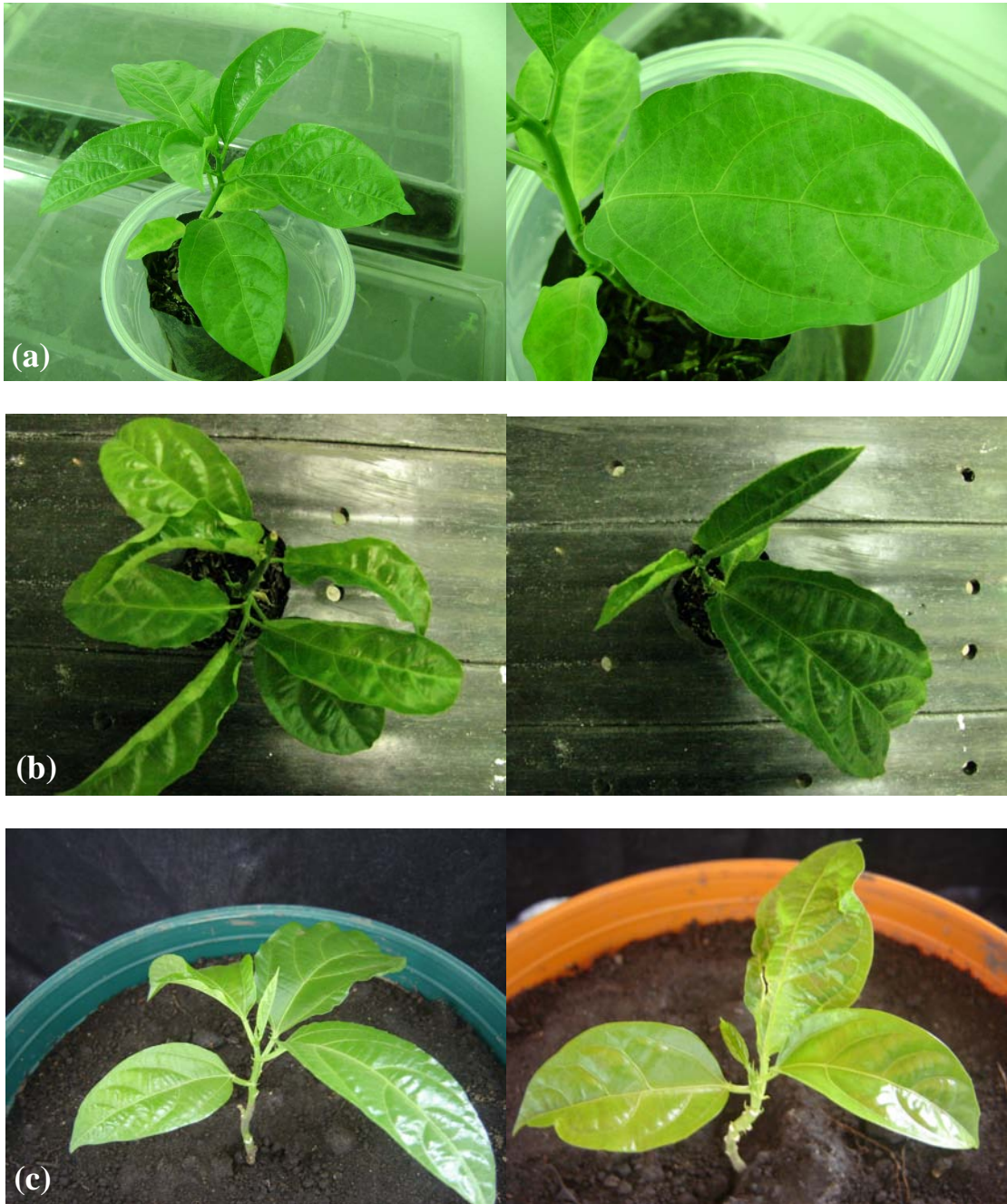


**Figura 15.** Detección de *Soybean mosaic virus* mediante RT-PCR en muestras de plántulas de gulupa provenientes de diferentes viveros de propagación. Las flechas indican el producto de PCR esperado (638 pb). Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

En las plántulas sanas se inocularon los aislamientos 37CMV, 40SMV y 50 que corresponde a un inóculo de infección mixta SMV/CMV (Anexo 1). Después de la inoculación, se realizó seguimiento para observar la expresión de síntomas.

Las plántulas infectadas fueron evaluadas mediante RT-PCR, y las positivas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento para evaluar la expresión de síntomas. Aproximadamente a los 3 meses, después de la inoculación, algunas de las plántulas presentaron mosaicos y deformación foliar (Figura 16). Los síntomas son similares a los observados en campo, lo cual podría indicar que la sintomatología que se presenta en los cultivos de gulupa proviene de la siembra de material infectado, por lo tanto es importante al momento de establecer un cultivo garantizar la sanidad del material de propagación.

En un estudio donde se evaluaba la transmisión de aislamientos colombianos de *Soybean mosaic virus* en plantas de maracuyá y granadilla, se concluyó que no hay transmisión por semillas y que los áfidos *Aphis gossypii* y *Toxoptera citricida* pueden transmitir el virus (Benschler *et al.*, 1996). Sin embargo, los áfidos en el cultivo de maracuyá se encuentran reportados como plagas secundarias, debido a que directamente no ocasionan grandes daños en los cultivos, sino que su importancia es como vectores de enfermedades virales; por ejemplo, *Myzus persicae* y *A. gossypii* han sido asociados con el endurecimiento de los frutos causado por *Passionfruit woodiness virus* (Aguiar-Menezes *et al.*, 2002). Por lo tanto, en general se considera que la transmisión mecánica es el principal mecanismo de difusión de enfermedades virales en los cultivos de maracuyá (Fischer & Rezende, 2008). En el cultivo de gulupa aún falta mayor discernimiento sobre los mecanismos de transmisión de virus, aunque al igual que en el cultivo de maracuyá la presencia de áfidos es ocasional.



**Figura 16.** Síntomas asociados a infección viral en plántulas de gulupa. (a) Mosaicos foliares. (b) Deformación foliar (plegamientos de lámina foliar). (c) Plantas control no inoculadas.

## 7. CONCLUSIONES

- La detección mediante RT-PCR y ELISA permitió encontrar infección viral por *Soybean mosaic virus* y *Cucumber mosaic virus* en los cultivos de gulupa de Cundinamarca. *Soybean mosaic virus* está presente en los municipios de Tibacuy, San Bernardo y Venecia. *Cucumber mosaic virus* se encuentra distribuido en los municipios de Granada, San Bernardo y Venecia. La infección por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* fue detectada mediante ELISA.
- Los síntomas encontrados en campo asociados a infección viral en plantas de gulupa son: Manchas verdes en frutos inmaduros, manchas anulares en frutos maduros, deformación en las puntas terminales de las ramas, deformación foliar, mosaicos foliares y clorosis.
- Las secuencias de los productos de PCR de *Potyvirus* mostraron valores de identidad nucleotídica de 95 a 98% con secuencias de aislamientos de *Soybean mosaic virus*.
- La detección de *Soybean mosaic virus* mediante RT-PCR usando primers específicos para CP y CI, permitió obtener secuencias de estos dos genes. El análisis de relaciones evolutivas de secuencias CI mostró la existencia de dos grupos SMV relacionados con origen geográfico.
- Las plántulas de gulupa provenientes de viveros de propagación que presentaron infección por *Soybean mosaic virus*, exhibieron mosaicos y deformación foliar, síntomas similares a los observados en campo. Lo anterior indica que la sintomatología que se presenta en los cultivos de gulupa proviene de la siembra de material infectado, por lo tanto es importante al momento de establecer un cultivo garantizar la sanidad del material de propagación.

## **8. AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a las entidades financiadoras que me proporcionaron los recursos para llevar a cabo mi investigación, especialmente al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Asohfrucol y la Universidad Nacional de Colombia. Mis sinceros agradecimientos a mi director Óscar Oliveros por su excelente y acertada orientación, al grupo de investigación en gulupa especialmente a Ricardo Mora por su constante apoyo, a mis compañeros de laboratorio especialmente a Angela Vargas por sus consejos, y a todos los productores de gulupa que nos permitieron entrar en sus cultivos. De igual forma doy gracias a mi familia por su apoyo incondicional, y a todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la realización de mi investigación.

## 9. LITERATURA CITADA

1. **Aguiar-Menezes, E. L., E. B. Menezes, P. C. R. Cassino & M. A. Soares. 2002.** Passion fruit. pp 361-390. En: Peña, J. E., J. L. Sharp & M. Wysoki (eds.). Tropical fruit pests and pollinators: biology, economic importance, natural enemies and control. CAB International.
2. **Alfenas, P. F., A.S.K. Braz, L.B. Torres, E.N. Santana, A.V.S. Nascimento, M. Carvalho, W. C. Otoni & F. M. Zerbini. 2005.** Transgenic passionfruit expressing RNA derived from *Cowpea aphid-borne mosaic virus* is resistant to passionfruit woodiness disease. *Fitopatología Brasileira* 30, 33-38.
3. **Asohofrucol - DANE. 2004.** Primer censo nacional de 10 frutas agroindustriales y promisorias. 63p.
4. **Benscher, D., S. Pappu, C. Niblett, F. Varón de Agudelo, F. Morales, E. Hodson, E. Álvarez, O. Acosta & R. Lee. 1996.** A strain of soybean mosaic virus infecting *Passiflora* spp. in Colombia. *Plant disease* 80, 258-262.
5. **Brunt, A., K. Crabtree, M. Dallwitz, A. Gibbs, L. Watson & E. Zurcher. 1996.** Plant viruses online: Descriptions and lists from the VIDE database. En: <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/>; consulta: mayo 2010.
6. **Carstens, E. B. 2010.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Archives of virology* 155, 133-146.
7. **Chang, C. A. 1992.** Characterization and comparison of *Passionfruit mottle virus*, a newly recognized potyvirus, with *Passionfruit woodiness virus*. *Phytopathology* 82, 1358-1363.
8. **Chang, S., J. Puryear & J. Cairney. 1993.** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter* 11, 113-116.

9. **Chávez, B., F. Varón, F. Morales, M. Castaño, J. Arroyave & G. Gálvez. 1999.** Reconocimiento, transmisión y hospederas de patógenos virales del maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 23(1), 24-31.
10. **Crestani, O. A., E. W. Kitajima, M. T. Lin & V. L. A. Marinho. 1986.** *Passion fruit yellow mosaic virus*, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathology* 76, 951-955.
11. **Cuspoca Martínez, J. 2007.** Evaluación de virus de tomate de árbol (*Solanum betacea*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
12. **De Wijs, J. J. 1974.** A virus causing ringspot of *Passiflora edulis* in the Ivory Coast. *Annals of applied biology*. 77, 33-40.
13. **Ferreira, S.S., D. R. Barros, M. R. de Almeida & F. M. Zerbini. 2010.** Characterization of *Passionfruit severe leaf distortion virus*, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant pathology* 59, 221-230.
14. **Fischer, I. H. & J. A. M. Rezende. 2008.** Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). *Pest technology* 2(1), 1-19.
15. **Fisch, M. B. 1975.** Passionfruit the world over. *CRFG yearbook*.
16. **Gaspar, J. O., P. Belintani, A.M.R. Almeida & E.W. Kitajima. 2008.** A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. *Journal of virological methods* 148, 283-285.
17. **Gioria, R., L. M. Espinha, J. A. M. Rezende, J. O. Gaspar & E. W. Kitajima. 2002.** Limited movement of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in yellow passion flower in Brazil. *Plant pathology* 51, 127-133.

18. **Guyot, A. 1991.** El mercado europeo de las passifloras. Primer simposio internacional de Passifloras - Memorias, Colombia. 276p.
19. **Ha, C., S. Coombs, P. A. Reville, R. M. Harding, M. Vu & J. L. Dale. 2008.** Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Archives of virology 153, 25-36.
20. **Hadidi, A., R. K. Khetarpal & H. Koganezawa. 1998.** Plant virus disease control. APS Press, USA. 684p.
21. **Hicks, R. G. T., M. E. Mohamed & D. Blakesley. 1996.** Passiflora latent carlavirus in european collections of ornamental *Passiflora*. Journal of phytopathology 144, 203-205.
22. **Hodson de Jaramillo, E. 2005.** Transformación genética de plantas para resistencia a virus. Academia Colombiana de Ciencias 29(110), 5-24.
23. **Iwai, H., Y. Yamashita, N. Nishi & M. Nakamura. 2006.** The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species *East asian passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. Archives of virology 151, 811-818.
24. **Kitajima, E.W., J. A. M. Rezende & J. C. V. Rodrigues. 2003.** *Passion fruit green spot virus* vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on passion fruit in Brazil. Experimental and applied acarology 30, 225-231.
25. **Jan, F. J. & S. D. Yeh. 1995.** Purification, *in situ* localization, and comparative serological properties of *Passionfruit woodiness virus*-encoded amorphous inclusion protein and two other virus proteins. Phytopathology 85, 64-71.
26. **Jiménez Neira, Y. 2006.** El cultivo de la gulupa *Passiflora edulis* Sims. Tesis especialización en horticultura con énfasis en fruticultura. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.



27. **Langeveld, S. A., J. M. Dore, J. Memelink, A. F. L. M. Derks, C. I. M. van der Vlugt, C. J. Asjes & J. F. Bol. 1991.** Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of general virology* 72, 1531-1541.
28. **Liberato, J. R. & F. Murilo Zerbini. 2003.** Diseases of Passionfruit (*Passiflora* spp.). En: The American Phytopathological Society, <http://www.apsnet.org/online/common/comment/passionfruit.asp>; consulta: mayo 2010.
29. **Manicom, B., C. Ruggiero, R. C. Ploetz & A de Goes. 2003.** Diseases of passion fruit. pp 413-441. En: Ploetz, R.C. (ed.). Diseases of tropical fruit crops. CAB International, Wallingford.
30. **Mlotshwa, S., J. Verver, I. Sithole-Niang, T. Van Kampen, A. Van Kammen & J. Wellink. 2002.** The genomic sequence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and its similarities with other potyviruses. *Archives of virology* 147, 1043-1052.
31. **Moraes, F. H. R., W. R. F. Belo, G. J. Moraes & E. W. Kitajima. 2006.** Ocorrência do vírus da pinta verde em maracujá no estado do Maranhão, Brasil. *Fitopatología brasileira* 31(1), 100.
32. **Morales, F., I. Lozano, C. Muñoz, M. Castaño, J. Arroyave, F. Varón, B. Chávez & G. Castillo. 2001.** Caracterización molecular de los virus que afectan al maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) y otras pasifloras en Colombia. *Fitopatología colombiana* 25(2), 99-102.
33. **Morales, F. J., I. Lozano, M. Castaño, J. Arroyave, A. C. Velasco & F. Varón. 2002.** Partial characterization of a tymovirus infecting passion fruit in Colombia, South America. *Journal of phytopathology* 150, 292-296.
34. **Moreno, P., J. Guerri & N. Muñoz. 1990.** Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology* 80, 477-482.
35. **Morton, J. 1987.** Fruits of warm climates. Florida Flair Books, Miami. 505p.

36. Nascimento, A., A. Souza, P. Alfenas, G. Andrade, M. Carvalho, G. Pio-Ribeiro & F. Murilo Zerbini. 2004. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. *Fitopatología brasileira* 29, 378-383.
37. Nascimento, A., E. Santana, A. Braz, P. Alfenas, G. Pio-Ribeiro, G. Andrade, M. de Carvalho & F. Murilo Zerbini. 2006. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Archives of virology* 151, 1797-1809.
38. Naqvi, S.A.M.H. 2004. Diseases of fruits and vegetables. Volume II: Diagnosis and management. Springer 1<sup>ra</sup> edition. 704p.
39. Novaes, Q. S., J. Freitas-Astua, V. A. Yuki, E. W. Kitajima, L. E. A. Camargo & J. A. M. Rezende. 2003. Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. *Plant pathology* 52, 648-654.
40. Pares, R. D., L. V. Gunn, E. N. Keskula, A. B. Martin & D. S. Teakle. 1997. Occurrence of *Passiflora latent carlavirus* in cultivated and wild *Passiflora* species in Australia. *Plant disease* 81, 348-350.
41. Rigden, P. & S. Newett. 2005. Passionfruit problem solver field guide. Natural library of Australia, Australia. 132p.
42. Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory guide. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
43. Seo, J. K., K. Ohshima, H. G. Lee, M. Son, H. S. Choi, S. H. Lee, S. H. Sohn & K. H. Kim. 2009. Molecular variability and genetic structure of the population of *Soybean mosaic virus* based on the analysis of complete genome sequences. *Virology* 393, 91-103.

44. **Shukla, D. D., C. W. Ward, A. A. Brunt & P. H. Berger. 1998.** *Potyviridae* family. CMI/AAB Descriptions of plant viruses N° 366. En: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=366>; consulta: julio 2010.
45. **Spiegel, S., M. Zeidan, I. Sobolev, Y. Beckelman, V. Holdengreber, Y. Tam, M. Bar Joseph, Z. Lipsker & A. Gera. 2007.** The complete nucleotide sequence of *Passiflora latent virus* and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. Archives of virology 152, 181-189.
46. **St Hill, A. A., F. W. Zettler, M. S. Elliott, M. A. Petersen, R. H. Li & J. Bird. 1992.** Presence of *Passiflora latent virus* and a serologically distinct strain of *Maracuja mosaic virus* in *Passiflora* spp. in Florida. Plant disease 76, 843-847.
47. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007.** *MEGA4.1*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.1. Molecular biology and evolution 24, 1596-1599.
48. **Vanderplank, J. 1996.** Passion Flowers. Cambridge Press, London, 224 p.
49. **Varón, F., M. Castaño, J. Arroyave, A. Velasco, C. Vuillaume & F. Morales. 1991.** Complejo viral que afecta plantaciones de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en el Valle del Cauca. Primer simposio internacional de Passifloras - Memorias, Colombia. 276p.
50. **Zheng, L., B. C. Rodoni, M. J. Gibbs & A. J. Gibbs. 2010.** A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant pathology 59, 211-220.

**Anexo 1.** Origen geográfico del material vegetal recolectado y resultados de la evaluación mediante RT-PCR para detección de virus en gulupa.

N°	ORIGEN GEOGRÁFICO		PRIMERS ESPECÍFICOS							PRIMERS DEGENERADOS	
	MUNICIPIO	VEREDA	PWV	CABMV	PFYMV	CMV	ToRSV	CISMV	CPSMV	Potyvirus	Carlavirus
1	Venecia	Quebrada Grande Alta	NE <sup>c</sup>	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2	Venecia	Quebrada Grande Alta	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
3	Venecia	Quebrada Grande Alta	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
4	Venecia	Quebrada Grande Alta	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
5	Venecia	Quebrada Grande Alta	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
6	Venecia	Aposentos Doa	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	-
7	Venecia	Aposentos Doa	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
8	Venecia	Aposentos Doa	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
9	San Bernardo	Alejandría	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
10	San Bernardo	Diamante	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
11	San Bernardo	Diamante	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
12	Venecia	La Chorrera	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
13	Venecia	La Chorrera	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	NE
14	Venecia	La Chorrera	-	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE
15	Venecia	La Chorrera	-	NE	-	-	NE	NE	NE	NE	NE
16	Venecia	La Chorrera	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	NE
17	Granada	La 22/Recreo	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
18	Granada	La 22/Recreo	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
19	Granada	San Raimundo Alto	-	NE	NE	+	-	-	NE	-	-
20	Granada	San Raimundo Alto	-	NE	NE	+	-	-	NE	-	-
21	Granada	La 22	-	NE	-	+	-	-	NE	-	-
22	Granada	La 22	-	NE	-	+	-	-	NE	-	-
23	Granada	Guasimal	-	-	NE	+	-	-	NE	-	-
24	Venecia	La Chorrera	-	NE	NE	-	-	-	NE	-	-
25	Venecia	La Chorrera	-	NE	NE	-	-	-	NE	-	-
26	Venecia	Aposentos Doa	-	NE	NE	+	-	-	NE	-	-
27	Venecia	Aposentos Doa	-	-	NE	+	NE	-	NE	-	-
28	Venecia	El Diamante	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	-	NE
29	Venecia	El Diamante	-	-	NE	+	NE	-	NE	NE	NE
30	San Bernardo	San Miguel	+	-	-	-	-	+	-	+	-
31	San Bernardo	San Miguel	-	-	NE	-	-	+	-	+	-
32	San Bernardo	San Miguel	-	-	-	+	-	-	NE	-	-
33	Ibagué	La Maria	-	-	NE	-	-	-	NE	-	-
34	Ibagué	La Maria	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	-	NE
35	San Bernardo	Alejandría	-	-	-	-	-	-	NE	-	-
36	San Bernardo	Alejandría	-	-	-	-	-	+	-	+	-
37	San Bernardo	Santa Helena	-	-	-	+	-	-	NE	-	-
38	San Bernardo	Santa Helena	-	-	-	+	-	-	NE	-	-
39	San Bernardo	Buenos Aires	-	-	-	+	-	+	+	+	-
40	San Bernardo	Buenos Aires	-	-	-	-	-	+	+	+	-
41	Venecia	Aposentos Doa	-	-	-	-	-	-	NE	-	-
42	Venecia	Aposentos Doa	-	-	-	+	-	+	-	+	-
43	Venecia	Aposentos Doa	-	-	NE	+	-	-	NE	-	-
44	Venecia	Aposentos Centro	NE	NE	NE	+	-	+	NE	-	-
45	Venecia	La Chorrera	NE	NE	NE	+	-	+	NE	-	-
46	Venecia	La Chorrera	NE	NE	NE	+	-	+	NE	-	-
47	Venecia	La Chorrera	NE	-	NE	-	-	+	NE	-	-
48	Venecia	El Diamante	NE	-	NE	-	NE	+	+	+	-
49	Venecia	El Diamante	NE	-	NE	+	NE	-	NE	-	NE
50	Venecia	El Diamante	NE	-	NE	+	NE	+	+	+	-
51	Venecia	El Diamante	NE	-	NE	+	NE	+	+	+	-
52	Vivero Fusagasugá <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	-	NE
53	Tibacuy	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	-	NE
54	Tibacuy	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	-	NE
55	Tibacuy	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	-	NE
56	Tibacuy	-	NE	NE	NE	-	NE	+	+	+	NE
57	Palmira (Maracuyá) <sup>b</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	+	+	NE
58	Palmira (Soya) <sup>b</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	+	NE
59	Palmira (Maracuyá) <sup>b</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	+	NE
60	Palmira (Soya) <sup>b</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	-	NE
61	Venecia	Aposentos Centro	NE	NE	NE	-	NE	+	+	+	NE
62	Vivero Fusagasugá <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	-	NE
63	Vivero Fusagasugá <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	+	NE	+	-	+	NE
64	Vivero Fusagasugá <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	-	NE
65	Vivero Fusagasugá <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	-	NE

N°	ORIGEN GEOGRÁFICO		PRIMERS ESPECÍFICOS							PRIMERS DEGENERADOS	
	MUNICIPIO	VEREDA	PWV	CABMV	PFYMV	CMV	ToRSV	CISMV	CPSMV	Potyvirus	Carlavirus
66	Vivero Fusagasuga <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	-	NE
67	Vivero Fusagasuga <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	-	NE
68	Vivero Fusagasuga <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	-	NE
69	Vivero Fusagasuga <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	-	-	NE
70	San Bernardo	-	NE	NE	NE	-	NE	-	-	-	NE
71	Venecia	-	NE	NE	NE	-	NE	-	-	-	NE
72	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
73	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
74	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
75	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
76	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE
77	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE
78	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE
79	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
80	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
81	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
82	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
83	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
84	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
85	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
86	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
87	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
88	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
89	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE
90	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE
91	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
92	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
93	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
94	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
95	Vivero Cota <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
96	San Bernardo <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
97	San Bernardo <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
98	San Bernardo <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE
99	San Bernardo <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
100	Venecia <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
101	Venecia <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	+	NE	+	NE	NE	NE
102	Venecia <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE
103	Venecia <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE
104	<i>In vitro</i> - Corpoica <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
105	<i>In vitro</i> - vivero <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	+	NE	NE	NE
106	Vivero Fusagasuga <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE
107	Vivero Fusagasuga <sup>a</sup>	-	NE	NE	NE	-	NE	-	NE	NE	NE

a: Plántulas de diferente procedencia. b: Muestras de plantas de soya y maracuyá con síntomas asociados a virus, incluidas como controles positivos. c. No evaluado.

**Anexo 2.** Protocolo de extracción de RNA protocolo modificado de Chang *et al.*, 1993.

1. Agregar en un tubo Falcon con capacidad mínima de 15 ml, aproximadamente 2 g de tejido vegetal infectado, previamente macerado en nitrógeno líquido.
2. Calentar en un baño maría el buffer de extracción a 65°C. Adicionar al tubo 3 ml de buffer de extracción. Mezclar invirtiendo el tubo y dar vórtex por 10 segundos. Posteriormente, llevar a baño maría por 15 minutos a 65°C.
3. Retirar del baño maría y agregar 3 ml de cloroformo - isoamil alcohol (24:1), para mezclar dar vórtex por 10 segundos. Llevar a centrifugación a 8000 rpm por 15 minutos a 15°C.
4. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo falcón, aproximadamente 2 ml para evitar tomar elementos de la fase orgánica. Agregar 2 ml de cloroformo - isoamil alcohol (24:1), para mezclar dar vórtex por 10 segundos. Llevar a centrifugación a 8000 rpm por 15 minutos a 15°C. Sí las fases no se separan, volver a centrifugar.
5. Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf de 2 ml, aproximadamente 1 ml para evitar tomar elementos de la fase orgánica. Agregar 1 ml de LiCl<sub>2</sub> 4M. Llevar a incubación toda la noche a 4°C para precipitar el RNA.
6. Centrifugar a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 µl de buffer TE-SDS.
7. Adicionar 700 µl de isopropanol y 200 µl de NaCl 5M. Mezclar invirtiendo el tubo y llevar a incubación por 30 minutos a -20°C.
8. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µl de etanol al 70%. Centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos a 4°C.
9. Descartar el sobrenadante y secar el pellet a 40°C por 30 minutos. Resuspender en 50µl de agua libre de RNasas. Almacenar a -20°C.

Preparación de soluciones para la extracción de RNA:

a. *Tris HCl pH 8.0 1M*

- Tris base                      121,1 g
- H<sub>2</sub>O                              800 ml

Disolver, ajustar el pH a 8.0 adicionando HCl y llevar a 1000 ml. Esterilizar.

b. *EDTA pH 8.0 0,5M*

- EDTA                            186,1 g
- H<sub>2</sub>O                              800 ml

Disolver, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y llevar a 1000 ml. La disolución del EDTA se produce cuando el pH es cercano o igual a 8.0.

c. *NaCl 5M*

- NaCl                              292 g
- H<sub>2</sub>O                              800 ml

Llevar a 1000 ml y esterilizar.

d. *Agua libre de RNasas*

Disolver DEPC al 0,2% en agua MQ y llevar a agitación toda la noche. Posteriormente esterilizar.

*e. Buffer de extracción* *Para 1000 ml*

- |                                   |        |                               |
|-----------------------------------|--------|-------------------------------|
| - CTAB                            | 2%     | 2 g                           |
| - Tris HCl pH 8.0                 | 100 mM | 10 ml de Tris HCl pH 8.0 1 mM |
| - EDTA                            | 20 mM  | 5 ml de EDTA pH 8.0 0,5 M     |
| - NaCl                            | 1,4 M  | 40 ml de NaCl 5M              |
| - Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> | 1%     | 1 g                           |
| - PVP- 40                         | 2%     | 2 g                           |

Completar el volumen restante con agua libre de RNasas, agitar fuertemente y calentar hasta disolver. Esterilizar y posteriormente agregar 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol.

*f. Cloroformo - isoamil alcohol (24:1)*

*Para 100 ml*

- |                   |       |
|-------------------|-------|
| - Cloroformo      | 96 ml |
| - Isoamil alcohol | 4 ml  |

*g. Buffer TE- SDS*

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| - Tris HCl pH 8.0 1M | 1 ml   |
| - EDTA pH 8.0 0,5M   | 0,2 ml |
| - SDS                | 1%     |

Llevar a 100 ml con agua libre de RNasas y esterilizar.



### Anexo 3. Protocolo de retrotranscripción (RT).

#### *Concentración de los reactivos*

Reactivo	$C_i$	$C_f$	$V_f = 25 \mu\text{l}$
Buffer	5x	1x	5 $\mu\text{l}$
DTT	0,1 M	10 mM	2,5 $\mu\text{l}$
Primer reverse	25 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
dNTPs	25 mM	0,5 mM	0,5 $\mu\text{l}$
RNaseOUT	40 U/ $\mu\text{l}$	0,4 U/ $\mu\text{l}$	0,25 $\mu\text{l}$
M-MLV	200 U/ $\mu\text{l}$	4 U/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	-	-	10,75 $\mu\text{l}$
RNA	-	-	5 $\mu\text{l}$

#### *Procedimiento*

1. Agregar en un tubo eppendorf de 200  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  de RNA. Denaturar a 95°C por 5 minutos.
2. Llevar inmediatamente a hielo por 3 minutos.
3. Agregar 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción RT (preparada de acuerdo a la tabla anterior).
4. Ejecutar en el termociclador el siguiente programa:
  - 90 minutos a 37°C
  - 10 minutos a 70°C
  - $\infty$  a 4°C
5. Diluir las muestras adicionando el doble del volumen de la reacción (25  $\mu\text{l}$  de agua MQ).

**Anexo 4.** Protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

*Concentración de los reactivos*

Reactivo	$C_i$	$C_f$	$V_f = 25 \mu\text{l}$
Buffer	10x	1x	2,5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	1,25 $\mu\text{l}$
Primer reverse	25 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Primer forward	25 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
dNTPs	25 mM	0,5 mM	0,5 $\mu\text{l}$
Taq DNA polimerasa	5 U/ $\mu\text{l}$	0,04 U/ $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	-	-	14,55 $\mu\text{l}$
cDNA	-	-	5 $\mu\text{l}$

*Procedimiento*

1. Agregar en un tubo eppendorf de 200  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  de cDNA.
2. Agregar 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción PCR (preparada de acuerdo a la tabla anterior).
3. Según los primers empleados, seleccionar en el termociclador el programa de PCR.

PWV	CABMV	PFYMV
5 minutos a 94°C	5 minutos a 94°C	5 minutos a 94°C
35x 30'' a 94°C	35x 30'' a 94°C	35x 30'' a 94°C
30'' a 65°C	30'' a 60°C	30'' a 60°C
45'' a 72°C	45'' a 72°C	45'' a 72°C
10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C

CMV

5 minutos a 94°C

30x 30'' a 94°C

1' a 48°C

1' a 72°C

10 minutos a 72°C

ToRSV

5 minutos a 94°C

35x 45'' a 94°C

45'' a 58,3°C

90'' a 72°C

10 minutos a 72°C

CISMV

5 minutos a 94°C

35x 30'' a 94°C

1' a 57,5°C

1' a 72°C

10 minutos a 72°C

CPSMV

5 minutos a 94°C

35x 30'' a 94°C

1' a 57,5°C

1' a 72°C

10 minutos a 72°C

*Potyvirus*

5 minutos a 94°C

40x 30'' a 94°C

30'' a 40°C

1' a 72°C

10 minutos a 72°C

*Carlavirus*

5 minutos a 94°C

35x 1' a 94°C

1' a 50°C

2' a 72°C

10 minutos a 72°C

**Anexo 5.** Protocolo de electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

1. Agregar en un erlenmeyer, 1,5 g de agarosa y 80 ml de TAE 1X. Disolver calentando.
2. Adicionar 3,2  $\mu$ l de bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y homogenizar la mezcla.
3. Servir en la mezcla y dejar que gelifique.
4. Sembrar las muestras dentro de los pozos, mezclando  $\sim$ 5  $\mu$ l de los productos de PCR con  $\sim$ 5  $\mu$ l de buffer carga 2X. En el primer pozo sembrar 1  $\mu$ l del marcador de peso (1 Kb DNA ladder o 100 bp DNA ladder (Invitrogen).)
5. Correr el gel en la cámara de electroforesis horizontal con TAE 1X, a 80V durante 60 minutos.
6. Al finalizar el tiempo de corrido, retirar el gel y visualizar en el documentador Gel Doc<sup>TM</sup> XR (Bio-Rad) con luz ultravioleta.
7. Fotografiar y guardar la imagen en el equipo.

**Anexo 6.** Detección mediante ELISA de *Cucumber mosaic virus* infectando gulupa.

N° MUESTRA	ORIGEN GEOGRÁFICO		RT-PCR	ELISA
	MUNICIPIO	VEREDA		
19	Granada	San Raimundo Alto	+	-
20	Granada	San Raimundo Alto	+	-
21	Granada	La 22	+	+
22	Granada	La 22	+	+
23	Granada	Guasimal	+	+
24	Venecia	La Chorrera	-	-
25	Venecia	La Chorrera	-	-
26	Venecia	Aposentos Doa	+	-
27	Venecia	Aposentos Doa	+	+
29	Venecia	El Diamante	+	-
32	San Bernardo	San Miguel	+	-
35	San Bernardo	Alejandro	-	-
37	San Bernardo	Santa Helena	+	-
38	San Bernardo	Buenos Aires	+	-
39	San Bernardo	Buenos Aires	+	-
43	Venecia	Aposentos Doa	+	-
44	Venecia	Aposentos Centro	+	-
45	Venecia	La Chorrera	+	-
46	Venecia	La Chorrera	+	+
47	Venecia	La Chorrera	-	+
48	Venecia	El Diamante	-	+
49	Venecia	El Diamante	+	-
50	Venecia	El Diamante	+	-
51	Venecia	El Diamante	+	-

**Anexo 7.** Detección mediante RT-PCR y ELISA de *Potyvirus*, *Soybean mosaic virus* y *Cowpea aphid-borne mosaic virus* infectando gulupa.

N° MUESTRA	POTYVIRUS		SMV		CABMV	
	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA
<b>MUESTRAS GRANADA</b>						
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	+
21	-	+	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	+	-	-	-	-
<b>MUESTRAS TIBACUY</b>						
56	+	+	+	-	NE	-
<b>MUESTRAS VENECIA</b>						
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
41	-	+	-	+	-	-
42	+	+	+	+	-	-
43	-	+	-	+	-	-
44	-	+	+	+	-	-
45	-	-	+	-	NE	-
46	-	+	+	-	NE	-
47	-	+	+	+	-	-
48	+	+	+	+	-	-
49	-	+	-	+	-	+
50	+	+	+	+	-	-
51	+	+	+	+	-	+
52	-	-	-	-	NE	+
61	+	+	+	+	NE	-
71	-	+	-	+	NE	-
<b>MUESTRAS SAN BERNARDO</b>						
32	-	+	-	+	-	+
35	-	+	-	-	-	+
36	+	-	+	-	-	+
37	-	-	-	-	-	+
38	-	-	-	-	-	+
39	+	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	-	-
70	-	+	-	+	NE	-
<b>MUESTRAS PALMIRA</b>						
57	+	+	+	+	NE	-
58	+	-	+	-	NE	-
59	+	+	+	+	NE	-
60	-	+	-	-	NE	+
<b>MUESTRAS VÍVEROS</b>						
96	NE	-	+	-	NE	-
97	NE	-	+	-	NE	-
100	NE	+	+	-	NE	-
101	NE	-	+	-	NE	-
102	NE	+	-	-	NE	+
103	NE	-	-	-	NE	-
106	NE	-	-	-	NE	-