



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN SEDE BOGOTÁ

Incidencia del *Soybean mosaic virus* en cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia

Luz Andrea Gordillo Alarcón

Universidad Nacional de Colombia
Ciencias, Instituto de Biotecnología (I.B.U.N)
Bogotá, Colombia

2011

Incidencia del *Soybean mosaic virus* en cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia

Luz Andrea Gordillo Alarcón

Tesis como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Microbiología

Director:

Ph.D., Oscar Arturo Oliveros Garay

Codirectora:

Ph.D., Celsa García Domínguez

Universidad Nacional de Colombia
Ciencias, Instituto de Biotecnología (I.B.U.N)
Bogotá, Colombia

2011

Admiro al hombre que permanece fiel a su conciencia, cualquier cosa que ésta le inspire.

Luis Buñuel

Agradecimientos

Agradezco a las entidades Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Asofrucol y la Universidad Nacional de Colombia, que hicieron posible la realización de éste proyecto.

Le doy gracias al profesor Oscar Arturo Oliveros por dirigirme acertadamente y apoyarme en este camino, a Niyireth Rozo, ingeniera agrónoma (Universidad Nacional), quien me apoyó en el trabajo en campo, a Natalhie Martínez Lic en Biología, MSc Microbiología, por sus enseñanzas y apoyo incondicional, a mi mamá Luz Marina Alarcón que ha sido un apoyo en todos mis logros y a todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Nacional sede Bogotá facultad de agronomía que me apoyaron y me acompañaron en la realización de éste estudio.

Resumen

Soybean mosaic virus (SMV) es el virus más frecuente en cultivos de *Passiflora edulis* Sims (Gulupa) de Cundinamarca – Colombia, y podría ser la causa de pérdidas en la producción y disminución del tiempo de vida de las plantaciones. Este estudio evalúa la incidencia del SMV en 320 plantas de gulupa distribuidas en tres cultivos de Cundinamarca durante dos períodos de muestreo (2010 y 2011). Los datos de factores climáticos fueron recolectados por 4 a 5 meses anteriores a los muestreos. Se encontraron incidencias del 24,05% y 65,64% en los cultivos de Tibacuy y Venecia que aumentaron al 51,89 y 89,33% en el segundo muestreo, respectivamente. En estas localidades la temperatura y la humedad fueron altos durante 2011. Por el contrario la incidencia en el cultivo de San Bernardo, donde la temperatura y humedad fueron bajos, disminuyó del 8,4 al 3,38%. La caracterización de la diversidad genética de SMV se evaluó en los genes P1 y CP, encontrándose un aumento con respecto a los valores previamente reportados. La reconstrucción de relaciones evolutivas mostró la diferenciación de clústers asociados a origen geográfico.

Palabras clave:

Incidencia, *Soybean mosaic virus*, *Passiflora edulis*, diversidad genética

Abstract

Soybean mosaic virus (SMV) is the most frequent virus infecting *Passiflora edulis* Sims (Gulupa) crops in Cundinamarca – Colombia, and it can be cause of losses in production and time decreasing of orchards. This study evaluated SMV incidence in 320 gulupa plants distributed in three fields of Cundinamarca, during two sample periods (2010 and 2011). Weather factor data were collected over a period of four-five months prior to sampling. Incidence was 24.05% and 65.64% in Tibacuy and Venecia crops in 2010, respectively. Incidence of SMV increased to 51.89 and 89.33% in the second sampling in 2011. These localities exhibited high temperature and humidity. In contrast, incidence in San Bernardo crop decreased from 8.4 to 3.38%, and this locality showed low temperature and humidity. Genetic diversity of SMV was evaluated by sequences of genes P1 and CP, and results show an increasing of diversity values in comparison with previously reported ones. Evolutionary relationship reconstruction showed differentiation of cluster associated with geographical origin.

Keywords:

Incidence, *Soybean mosaic virus*, *Passiflora edulis*, genetic diversity

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIV
Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1 Pasifloras en Colombia	3
1.2 <i>Passiflora edulis</i> Sims (Gulupa).....	4
1.3 Cultivo de gulupa.....	6
1.4 Virus que infectan a Pasifloras	7
1.5 Potyvirus:	7
1.5.1 Organización genómica	8
1.5.2 Productos de genes.....	8
1.6 Soybean mosaic virus (SMV).....	10
1.6.1 Generalidades.....	2
1.6.2 Diversidad Genética SMV:.....	11
1.6.3 Rango de hospedero:	12
1.6.4 Transmisión del SMV.....	15
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Muestreo	17
4. Incidencia de potyvirus y SMV en cultivos de gulupa	19
4.1 Introducción	19
4.2 Materiales y métodos	20
4.2.1 Extracción.....	20
4.2.2 Detección de potyvirus.....	20
4.2.3 Detección de SMV	20
4.2.4 Análisis de datos de georeferenciación y variables climáticas	21
4.3 Resultados y discusión.....	22
4.3.1 Incidencia de SMV y potyvirus en cultivos de gulupa en Cundinamarca ...	22

4.3.2 Evaluación de factores bióticos y climáticos en cultivos de gulupa y su posible asociación con incidencia de infección por potyvirus (*Soybean mosaic Virus*) 28

5. Diversidad genética.....	40
5.1 Introducción	40
5.2.1 Diseño de primers	40
5.2.2 Extracción de RNA	41
Extracción de dsRNA de pino (modificado).....	41
Extracción de RNA con trizol® (Invitrogen).....	41
En este procedimiento se pesaron 100mg de tejido vegetal macerado y se adiciono 1 ml de TRIZOL ® (invitrogen) y 200 µl de cloroformo, se centrifugó (12000rpm 15 min.) y se transfirió la fase acuosa un tubo nuevo en donde se agregó 500 µl de isopropanol. Luego se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75% y por último se resuspendió el pellet seco en 50 µl de agua destilada libre de RNAsas incubándolo por 10 min a 60°C, y se almacenaron los extractos a -20°C (Anexo C)	41
5.2.3 Retrotranscripción (RT-PCR) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .	42
5.2.4 Clonación.....	42
5.2.5. Análisis de secuencias.....	43
5.3 Resultados y discusión.....	45
6. Conclusiones y recomendaciones	63
6.1 Conclusiones	63
6.2 Recomendaciones.....	64
A. Anexo: Elisa potyvirus kit Bioreba.....	65
B. Anexo: DAS-ELISA SMV Agdia.....	67
C. Anexo: Extracción con trizol® (modificado).....	68
D. Anexo: Protocolo de extracción de RNA protocolo modificado de Chang <i>et al.</i>, 1993	70
E. Anexo: RT-PCR Retrotranscripción	73
F. Anexo: PCR Reacción.....	74
G. Anexo: Gel electroforesis 1,5% agarosa.....	75
H. Anexo: Clonación	76
I. Anexo: Distancia genética de aislamientos de CP.....	80
Bibliografía	83

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-3: Organización genómica de SMV	13
Figura 4-1: Histograma de la incidencia observada con respecto a la incidencia detectada mediante ELISA	25
Figura 4-2: Síntomas virales en gulupa	26
Figura 4-3: Incidencia de potyvirus en tres cultivos de Cundinamarca (A) y la topografía de las respectivas parcelas (B)	27
Figura 4- 4: Comparación en dos tiempos diferentes de la incidencia de <i>Soybean mosaic virus</i> en 3 cultivos en Cundinamarca (Ay B) .	28
Figura 4-5: Análisis de componentes principales de todas las variables climáticas Gráficos de círculos de correlación. A. B. Venecia primer y segundo muestreo, C. E Tibacuy primer y segundo muestreo; E. F. San Bernardo primer y segundo muestreo	31
Figura 4-6: Círculos de correlaciones de los ACPs de cada cultivo correspondiente a variables clima. A. B. Venecia primer y segundo muestreo. C. D. Tibacuy primer y segundo muestreo. E. F. San Bernardo primer y segundo muestreo	32
Figura 4-7: Plano factorial de la nube de individuos de las horas correspondientes a los 4 o 5 meses antes del muestreo. A. B. Venecia primer y segundo muestreo. C. D. Tibacuy primer y segundo muestreo. E .F. San Bernardo primer y segundo muestreo.	33
Figura 4-8: Círculo de correlaciones del ACP genera con inercia	38
Figura 4-9: Clúster jerárquico	38
Figura 4-10: Plano factorial con los clústers establecidos	39
Figura 5-1: Gel electroforesis 1,5% de amplificaciones de A. P1 y B. CP	47

Figura 5-2: Verificación del inserto de CP para 11 clones de SBA	47
Figura5-3: Árboles filogenéticos del gen P1 de <i>Soybean mosaic virus</i> de acuerdo a los siguientes algoritmos: A) máxima verosimilitud, B) Neighbor-joining C) Máxima Parsimonia. Modelo de substitución kimura-2 parámetros. Entre paréntesis los clones con distancia genética entre ellos de 0. Bootstrap de 1000 replicas.	53
Figura 5-4: Árbol filogenético del gen CP de <i>Soybean mosaic virus</i> de acuerdo a los siguientes algoritmos: A) máxima verosimilitud, B) Neighbor joining C) Máxima Parsimonia. Modelo de substitución kimura-2 parámetros. Entre paréntesis los clones con distancia genética entre ellos de 0. Bootstrap de 1000 replicas.	57
Figura 5-5: Secuencias del gen P1, presentando delección/inserción en la posición 593.	62
Figura 5-6: Alineamientos encontrados por Blastn para el aislamiento 12T2 A. Primers CP con <i>Passion fruit yellow mosaic virus</i> B. Amplificado con primers P1 con <i>Turnip yellow mosaic virus</i>	63

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Reporte de exportaciones de gulupa por departamentos	7
Tabla 1-2: Exportaciones de gulupa de Colombia a Europa	8
Tabla 3-1: Cultivos muestreados y características importantes	19
Tabla 4-1: Correlación de Kendall de la variable presencia o ausencia de potyvirus con respecto a la altura	26
Tabla 4-2: Tabla de los valores propios para los primeros ejes factoriales del ACP total	36
Tabla 4-3: Matriz de correlaciones entre variables	36
Tabla 4-4: Coordenadas, contribuciones y correlaciones de variables climáticas con respecto a los ejes principales escogidos	37
Tabla 5-1: Primers diseñados para gen CP y P1 de SMV	43
Tabla 5-2: Aislamientos del GenBank analizados en este estudio	46
Tabla5-3: Matriz de distancia genética para el gen P1 entre diferentes aislamientos. Modelo de Kimura 2-parametros.	50
Tabla 5-4: Diversidad nucleótida de las secuencias de P1 y CP de <i>Soybean mosaic virus</i> reportadas en este estudio y por (Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2	60

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μ	Medida en micrómetro	1	1/1000

Subíndices

Subíndice	Término
lc	Índice de clúster

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ACP</i>	Análisis de componentes principales
<i>AP</i>	Antipotyvirus
<i>ELISA</i>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>PCR</i>	Polymerase chain reaction
<i>PBST</i>	Phosphate buffer solution

Introducción

La gulupa *Passiflora edulis* Sims pertenece a la familia *Passifloraceae* y es nativa de las regiones tropicales y subtropicales. *P. edulis* es originaria del sur de Brasil, y fue ampliamente distribuida durante el siglo XIX a otros países de Sur América, el Caribe, Asia África, India y Australia (Pinzón, *et al.*, 2007). La gulupa es una fruta exótica promisoriosa de exportación colombiana y su comercialización está dirigida al mercado europeo (Gómez, 2006). *Passiflora edulis* ha sido usado como un producto sedativo diurético, antihelmíntico, antidiarreico, estimulante, tónico y también en el tratamiento de hipertensión, síntomas de menopausia y cólicos en niños de Sur África. Además se han encontrado diversos fitoconstituyentes que lo hacen interesante para nuevas investigaciones (Dhawan, *et al.*, 2004).

P. edulis crece especialmente en regiones frías subtropicales o en regiones de altitudes altas (Fischer & Rezende, 2008), por lo que algunas regiones de montaña de Colombia son adecuadas para su producción. Es necesario tener medidas preventivas y de control de enfermedades para evitar la propagación de las mismas en otros cultivos del país y favorecer su exportación a otros países. Muchas enfermedades asociadas a potyvirus infectando *Passiflora* spp., se han reportado en diferentes partes del mundo. Dentro de estos se ha identificado *Passion fruit woodiness virus* (PWV), infectando diferentes cultivos de *Passiflora* var. *flavicarpa* (maracuyá) en Australia, Nigeria, Taiwan y Japón. Posteriormente, el análisis de secuencias nucleotídica de estos aislamientos de potyvirus permitió definir su identidad como *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. Otros potyvirus encontrado en *Passiflora* spp. fueron *Passiflora rignspot virus* (PRV), *Bean yellow mosaic virus* (YMV), *Passion fruit mottle virus*, *East Asian Passiflora virus* (EACPV) (Fischer & Rezende, 2008) y por último se ha identificado en Colombia *Soybean mosaic virus* (SMV) infectando maracuya (Benscher, *et al.*, 1996).

Por otra parte se han relacionado grandes pérdidas por áfidos directamente por daños asociados a su alimentación en las plantas e indirectamente por su papel en la

transmisión de virus. Alrededor del 50% de las especies virales de plantas son transmitidas por áfidos e invertebrados (Hooks & Fereres, 2006). Algunos áfidos se pueden contener con barreras que no permiten el acercamiento a las flores, ya que se sienten atraídos por los colores diferentes al verde.

El SMV es el agente causal de una de las enfermedades más frecuentes en la familia de las *Passifloras*, particularmente se ha reportado infectando maracuyá en cultivos del Valle del Cauca (Benschel, *et al.*, 1996). Este virus pertenece a la familia *Potyviridae* e infecta principalmente cultivos de soya, en el que causa significantes pérdidas y reducción de la calidad (Fischer & Rezende, 2008). La utilización de métodos rápidos de diagnóstico y sensibles para la detección del SMV en etapas tempranas del cultivo, es crucial para asegurar la producción y/o exportación, sin embargo estas metodologías requieren de personal especializado, infraestructura y equipos.

1. Marco teórico

1.1 Pasifloras en Colombia

Las pasifloráceas son una familia muy llamativa desde varios puntos de vista, sobre todo desde el económico y el ornamental, además algunas especies, como *Pasiflora edulis*, son de importancia económica por sus frutos comestibles (Hernández y Bernal 2000).

La familia passifloraceae consiste en 18 géneros y aproximadamente 630 especies hasta el 2007 descrito por Pérez *et al* distribuido en los trópicos y zonas de costas a 3800m de altura sobre el nivel del mar (Pérez, *et al.*, 2007).

En América, la familia está conformada por 4 géneros (*Ancistrothyrsus*, *Dilkea*, *Mitostemma* y *Passiflora*), en el cual *Passiflora* es numéricamente y económicamente el género más importante de la familia (Ulmer & MacDougal, 2004).

También cuenta con una importancia adicional que yace desde los promisorios usos desde el punto de vista actividades químicas y farmacológicas como la evidencia de los efectos antiinflamatorios de extractos acuosos liofilizados obtenidos de ésta especie, actividad antibacterial, citotóxica y antioxidante de extractos de etanol de hojas y tallo (Dhawan, *et al.*, 2004)

Colombia es el segundo país de mayor biodiversidad en el mundo con un segundo puesto de mayor diversidad de las pasifloras cultivadas, granadilla y las dos formas de maracuyá el amarillo (*P. edulis* var. *flavicarpa*) y el púrpura (*P. edulis*) (Ocampo, *et al.*, 2007). La familia *pasifloraceae* posee 48 especies endémicas, 45 de ellas exclusivamente andinas y una compartida con la región Pacífico (Hernández & Bernal, 2000). Aproximadamente 20 especies de pasifloráceas andinas presentan algún grado de amenaza y cinco especies ya se consideran extintas (Hernández & Bernal, 2000) La región Andina presenta una alta variedad topográfica (1000-5400 m) con tres principales

cordilleras (Hernández & Bernal, 2000) por lo que genera una alta variedad de condiciones climáticas para el crecimiento de *Passiflora edulis*.

1.2 *Passiflora edulis* Sims (Gulupa)

REINO: Vegetal

DIVISION: Angiosperma

CLASE: Dicotiledoneas

SUBCLASE: Archiclamydae

ORDEN: *Parietales*

SUBORDEN: Flacourtiineas

FAMILIA: *Passifloraceae*

GENERO: *Passiflora*


ESPECIE: *edulis* Sims.

("Herbario nacional Colombiano," 2006)

La distribución de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) se encuentra su en Caldas, Quindío, Tolima, Santander, Chocó, Nariño, Córdoba y Magdalena entre otros en menor proporción (Ocampo, *et al.*, 2007), con una producción mayor en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Huila, Cauca y Valle del Cauca (Hernández & Bernal, 2000).

Debido al incremento de la popularidad y la demanda de los jugos y otros productos de “frutas de la pasión”, se ha producido un incremento en la producción de *Passiflora* spp. (Benscher, *et al.*, 1996), haciendo que la región de Cundinamarca sea uno de los principales departamentos de expansión de dichos cultivos por sus condiciones.

Según Proexport Colombia, la región que tiene mayor participación en las exportaciones en Colombia es Cundinamarca, seguido por Bogotá y Antioquia (ver Tabla 1-1).

Tabla 1-1: Reporte de exportaciones de gulupa por departamentos


Departamentos de Origen 0810901030 GULUPA (MARACUYA MORADO (PASSIFLORA EDULIS VARO EDULIS) FRESCAS
Departamentos de Origen

Departamentos	USD 2009 FOB	Participación USD FOB
COLOMBIA	6,511,598.17	100.00 %
CUNDINAMARCA	5,494,226.47	84.38 %
BOGOTA	710,925.71	10.92 %
ANTIOQUIA	294,624.59	4.52 %
CORDOBA	10,310.4	0.16 %
BOYACA	1,511	0.02 %

Fuente: DANE-DIAN
Cálculos: Proexport Colombia
PROEXPORT COLOMBIA Abril 07 2010

Ha disminuido la producción de gulupa debido a diferentes enfermedades en cosecha y pos-cosecha, haciendo que las exportaciones disminuyan notablemente cada año. Exportaciones que en su mayoría se encuentran dirigidas a países de Europa, en mayor cantidad a Francia y Alemania (Tabla 1-2). Dentro de las enfermedades más frecuentes se encuentran las causadas por virus. Aunque la reducción en la producción en Colombia no se puede explicar solamente por virosis, estas enfermedades generan pérdidas económicas por los detrimentos de las cosechas.

Tabla 1-2: Exportaciones de gulupa de Colombia a Europa



Exportaciones Colombianas 0810901030 GULUPA (MARACUYA MORADO (PASSIFLORA EDULIS VARO EDULIS) FRESCAS

Exportaciones por producto

País	USD 2008 FOB	USD 2009 FOB	USD Enero - Enero 2009	USD Enero - Enero 2010
ALEMANIA	2,912,010.43	1,894,584.67	305,766.91	126,922.03
BELGICA	447,211.58	448,588.73	117,052.74	28,319.15
REINO UNIDO	531,815.28	271,875.8		8,208
CANADA	104,661.64	125,228.45	26,348.19	9,139.25
FRANCIA	115,968.46	107,820.77	198.6	340,874.01
SUIZA	65,113.85	71,338.1	8,658	10,451.2
SUECIA	325,031	64,936.71	2,028	34,694.2
ESPAÑA	70,427.37	49,977.9	5,711.64	3,169.36
ITALIA	36,238.27	34,828.06	11,595	225.05
DINAMARCA	21,005.6	30,641.6		1,92
PORTUGAL	53,932.2	17,952.78	5,314.79	
RUSIA	1	5,884	4	
ARUBA	1,855.55	699.56	86.33	58.04
KUWAIT		675		
ANTILLAS HOLANDESES		225.96		19.26
NORUEGA		37.15		
HONG KONG		19.6		
ARGENTINA		3.5		
BRASIL	290.08			
ECUADOR	12			
MALAYSIA				15.8

Fuente: DANE-DIAN

Cálculos: Proexport Colombia

PROEXPORT COLOMBIA Abril 07 2010

1.3 Cultivo de gulupa

Las pasifloráceas son lianas o enredaderas que trepan por medio de zarcillos. Sus hojas son alternas y con estipulas. Las flores tienen un androginóforo prominente, con menos frecuencia solamente ginóforo, y en pocas especies el ovario es sésil. Poseen una corona extraestaminal bien desarrollada, que ayuda a atraer polinizadores, aunque en algunas especies se reduce a una fila de pequeños tubérculos o dientecillos. (Hernández & Bernal, 2000)

La producción de pasifloras estimada para el año 2007 fue de alrededor de 805.000 toneladas, siendo Brasil el productor del 56% del total. Ecuador y Colombia presentaron

producciones de 250.000 y 30.000 toneladas, respectivamente. (Fischer & Rezende, 2008). Debido al incremento de la popularidad y demanda de productos derivados de las frutas de la pasión como jugos y otros, su producción se ha incrementado especialmente en Latino América. Sin embargo, con el incremento del área cultivada, se ha presentado un aumento en la incidencia de virus en los cultivos, particularmente del grupo de potyvirus (Benschler, *et al.*, 1996).

Los insectos reportados que participan en la polinización son *Xilocopa varipuncta* y *Apis mellifera* (Jimenez N., 2006). El fruto gulupa es púrpura, redondo u ovalado con el pericarpio poco grueso, con 4 a 8 cm de diámetro, con arilo pulposo de color anaranjado, de sabor ligeramente ácido y con buenas cualidades organolépticas de sabor y aroma (Quevedo, 1989). La producción de frutos comienza a los 8 meses después de su establecimiento. Las altitudes adecuadas para el desarrollo del cultivo están entre los 1.400 a 2.200 msnm, con una temperatura óptima de 15 a 20°C, con un pH del suelo de 6.5 a 7.5 (Jimenez N., 2006).

1.4 Virus que infectan a Pasifloras

Los potyvirus que han sido identificados infectando *Pasiflora* spp. son: *Passion fruit woodiness virus* (PWV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Passiflora ringspot virus* (PRV), *Passion fruit mottle virus* (PaMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Pasiflora virus Y* (PaVY) y *East Asian Passiflora virus* (EAPV). También se han detectado infecciones por *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Passiflora latent virus* (PLV), *Passion fruit yellow mosaic virus* (PaYMV), *Passion fruit vein clearing virus*, *Purple granadilla mosaic virus* (PGMV), *Passion fruit green spot virus* (PGSV), *Maracujá mosaic virus* (MarMV) y *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Fischer y Rezende, 2008).

En un trabajo de detección de virus que infectan gulupa en Cundinamarca (Camelo García, 2010) se encontraron: *Soybean mosaic virus* (SMV) el cual pertenece a la familia del *Potyvirus*, *Cucumber mosaic virus* (CMV) y *Cowpea aphid-borne mosaic virus*.

1.5 Potyvirus:

La familia *Potyviridae* es la más amplia de virus de plantas con 200 miembros descritos. Los viriones son bastones flexuosos de 11 a 15 nm de diámetro y de 650 a 950 nm de

longitud. El genoma de potyvirus es RNA de banda simple con sentido positivo ss(+) de alrededor de 8.5-10Kb. La infección por potyvirus induce la formación de cuerpos de inclusión nucleares y citoplásmicos en las células del hospedero (Matthews & Hull, 2002). La familia *Potyviridae* está compuesta por tres géneros diferenciados por su vector de transmisión: *Potyvirus* transmitidos por pulgones, *Bymovirus* transmitidos por hongos y *Rymovirus* transmitidos por ácaros. El género de *Potyvirus* contiene la mayor cantidad y los más importantes virus en plantas. Tienen una cadena de RNA sentido positivo y una clase de proteína de cápside.

1.5.1 Organización genómica

El genoma de todos los Potyvirus tiene una proteína VPg (virus protein linked genome) ligada en el extremo 5', mientras que en el extremo 3' tienen una cadena poliadenilada de aproximadamente 190 adeninas, la cual está asociada con la habilidad de RNA para actuar como RNA mensajero (Agrios, 2001). Sin embargo, se ha evidenciado que transcritos sintetizados *in vitro* a partir de clones de cADN de longitud completa, que carecen de VPg y son infecciosos (Domier, *et al.*, 1987). Otras características del genoma de potyvirus es la presencia de una región no codificadora 5' de 144 nucleótidos ricos en A y U, y de un marco de lectura abierto único (ORF) de 9161 nucleótidos iniciando en el residuo 145-147 que codifica para una poliproteína con 3000 aminoácidos aproximadamente (340KDa) (Matthews & Hull, 2002).

1.5.2 Productos de genes.

El genoma de SMV codifica para una larga poli proteína, la cual es clivada para producir 10 proteínas maduras por proteasas codificadas por virus (Jayaram, *et al.*, 1992). Las proteínas de potyvirus que se han encontrado de la poliproteína viral en plantas son: P1, factor de transmisión por pulgones (Helper component HC-Pro), P3, proteína de las inclusiones cilíndricas (CI), proteína pequeña de las inclusiones nucleares (NIa), cuya mitad amino constituye la proteína terminal (VPg), proteína grande de las inclusiones nucleares (Benschler, *et al.*) y proteína de la cápside (Matthews & Hull, 2002). La poliproteína viral es digerida por tres proteasas codificadas por el virus. Las proteínas P1, Pro y HC-Pro cortan en sus respectivos extremos carboxilo, la proteína NIa produce cortes inter e intramoleculares en sitios caracterizados por heptapéptidos conservados dentro de cada potyvirus.

a) Proteínas estructurales o presentes en la partícula viral

P1 es la proteína menos conservada entre los diferentes potyvirus. Su liberación de la poliproteína es por un corte auto catalítico, se desconoce su función pero se ha postulado que podría estar implicada en movimiento del virus de célula a célula (Matthews & Hull, 2002).

La proteína HC-Pro está implicada en la propagación del virus por pulgones, no se conoce la función de la proteína P3 y del péptido 6K1 que le sigue. Mientras que la proteína P3 está muy poco conservada entre diferentes potyvirus, la región correspondiente al péptido 6K1, presenta un alto nivel de similaridad. La proteína P3 es asociada a las inclusiones cilíndricas, formadas por la proteína CI, la cual pertenece al grupo de proteínas con un dominio de unión a NTPs, y pertenece a una superfamilia de ARN helicasas de muy diverso origen, sólo la región amino terminal de la proteína CI presenta homología con otras helicasas (Jayaram, *et al.*, 1992).

La proteína NIa, que forma parte de las inclusiones nucleares que inducen ciertos potyvirus, viene precedida en la proteína por otro pequeño péptido de 6 KDa, se sugiere que la proteína NIa regula su distribución subcelular mediante procesamiento proteolítico del sitio 6K2-NIa, ya que en el producto de fusión el péptido 6K2 evita la migración de NIa al núcleo (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1992).

Según datos de homología de secuencia indican que la proteína NIb junto con NIa, forma las inclusiones nucleares, es la ARN polimerasa dependiente de ARN que replica el genoma viral (Domier, *et al.*, 1987) aunque no existe evidencia experimental que lo pruebe.

La proteína de la cápside de los potyvirus está formada por un dominio central altamente conservado y dos dominios en los extremos amino y carboxilo, el primero de ellos muy variable en longitud y secuencia, que sobresalen del virión y que no son necesarios para el ensamblaje de la partícula viral ni para la infectividad por inoculación mecánica (Jayaram, *et al.*, 1992). La proteína CP desempeña un papel en la transmisión del virus por pulgones y se ha demostrado la relevancia para esta función de un bloque de Asp-Ala-Gly conservado en la región variable del extremo amino así como de otros aminoácidos de esta región, se sugiere que la proteína de la cápside es necesaria tanto para la replicación como para la propagación del virus en la planta.

b) Proteína de inclusión en forma de molino

En todos los potyvirus los cuerpos de inclusión tienen una característica especial en el citoplasma de las plantas infectadas y es la forma de molinete (Matthews & Hull, 2002).

c) Proteína de inclusión citoplásmica amorfa y proteína de componente ayudador HC-Pro. El cuerpo de inclusión citoplasmática amorfa ha sido detectado en algunos pero no en todos los potyvirus. La proteína “helper component” es necesaria para la transmisión del virus por áfidos. Varias evidencias indican que ellas son las mismas proteínas, en todo o en parte, y que están localizadas en la región 5' en el genoma: debido a que co-migran en el gel de electroforesis (Hull, 2001), la proteína de inclusión amorfa reacciona con la misma proteína en los extractos de la proteína ayudadora. Y por último, el antisuero para bloquear el extracto parcialmente purificado del componente helper. La actividad del componente ayudador se encuentra en la proteína localizada a 52KDa codificada cerca a extremo 5'.

d) Proteinasas

Los potyvirus codifican para 3 proteinasas que están involucradas en el procesamiento de poliproteína, la proteína P1 de 35-KDa en N-terminal, HC-Pro-52 KDa en la N-terminal, y la proteína NIa en la C-terminal de 27KDa.

1.6 Soybean mosaic virus (SMV)

1.6.1 Generalidades:

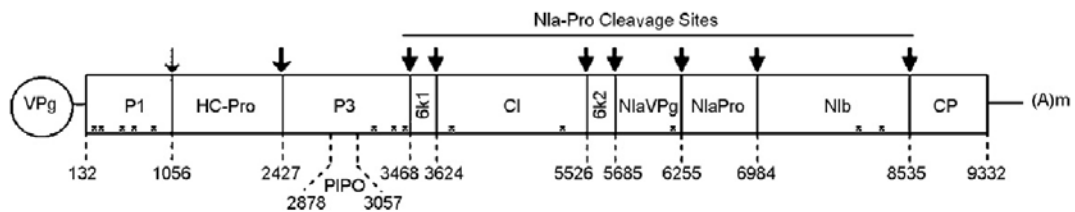
SMV es un potyvirus que infecta leguminosas como soya, los síntomas que causa son mosaico, moteado, clorosis y rugosidad en hojas y severas reducciones en el crecimiento de la planta (Gagarinova *et al.*, 2008). SMV en cultivos de soya causa pérdidas de rendimiento del 35 % al 50 % bajo condiciones naturales de campo (Arif & Hassan, 2002). El SMV es mecánicamente transmitido y se extiende eficientemente por polen y por áfidos de manera no persistente (Arif & Hassan, 2002). Se ha detectado SMV en cultivos de gulupa de la región Cundinamarca de Colombia (Camelo García, 2010), produciendo síntomas de mosaico en hojas y fruto, arrugamiento en hojas y disminución del tamaño de las plantas y no se ha observado áfidos en los cultivos.

1.6.2 Diversidad Genética SMV:

El estudio de la variabilidad genética y molecular de los virus ayuda al entendimiento de la evolución de los mismos en relación a su virulencia, dispersión y emergencia de nuevas epidemias.

Soybean mosaic virus (SMV) es un miembro del género de *Potyvirus*, tiene un genoma de RNA cadena sencilla sentido positivo de aproximadamente 10 Kb de longitud, un genoma unido a una proteína viral (VPg) en el 5' terminal y una cola de poli (A) en el 3' (Seo *et al.*). El genoma viral contiene un pequeño marco de lectura abierta (ORF), que codifica a una proteína grande de 350KDa que es clivada dentro de 10 diferentes productos de proteína (Gagarinova, A., *et al.*, 2008; Matthews & Hull, 2002)

Figura 1-3: Organización genómica de SMV



El círculo representa el genoma unido a la proteína viral, VPg, Dos líneas horizontales representan regiones no traducidas 5' y 3', respectivamente. Las cajas representan los fragmentos de lectura abierta de (132 nucleótidos a 9332) que codifica la poliproteína 350 KDa que es procesada dentro de 11 productos finales. La posiciones nucleotídicas de cada proteína madura predicha son indicados. Los sitios de clivaje son reconocidos por la proteasa NIa son indicados con la línea punteada. Sitios de clivaje son reconocidos por las proteasas P1 y HC-Pro son indicados por las flechas delgadas o gruesas, respectivamente. Las proteínas maduras resultantes del procesamiento son mostradas en los correspondientes bloques. PIPO es derivado de un fragmento en el cistron P3, región policistronica. La cola de poli-A es mostrado como (A)n. (Gagarinova, A. G., *et al.*, 2008)

1.6.3 Rango de hospedero:

Por mucho tiempo se pensó que se limitaba a la soya, ahora se conoce alrededor de 30 especies de plantas a las que se transmite, 10 de ellos causando reacciones locales o ninguno. Las especies susceptibles reportados son: *Chenopodium álbum*, *Chenopodium quinoa*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Glycine max*, *Phaseolus lathyroides*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vigna mungo*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata*, *Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis*. Las especies no susceptibles son: *Amaranthus retroflexus*, *Arachis hypogaea*, *Brassica campestris*, *Cajanus cajan*, *Capsicum frutescens*, *Cassia tora*, *Chenopodium album*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Cicer arietinum*, *Crotalaria spectabilis*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Datura stramonium*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Lens culinaris*, *Lotus corniculatus*, *Lupinus albus*, *Lycopersicon esculentum*, *Macroptilium lathyroides*, *Medicago sativa*, *Melilotus albus*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia x hybrida*, *Pisum sativum*, *Sesbania exaltata*, *Tetragonia tetragonioides*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Vicia faba*, *Vigna unguiculata*, *Zinnia elegans* (Adams & Antoniw; Antoniw & Adams; Brunt, A. A., et al., 1996).

El principal síntoma que produce es el mosaico en la soja. Sin embargo se reportan otros síntomas en los hospederos como:

Glycine max (soja): La mayoría de las variedades desarrollan el aclareamiento de la vena sistémica, seguido por un enrollamiento y un mosaico que lleva a la distorsión de las hojas jóvenes, hinchando las últimas áreas a lo largo de las venas principales y clorosis entre las zonas de color oscuro. Algunas variedades desarrollan una necrosis progresiva. Las hojas primarias que crecen de semillas infectadas pueden mostrar moteado y rizados. Los síntomas son más severos a 18-20°C que a 27-30°C. (Antoniw & Adams)

Phaseolus vulgaris: Infección local en algunos cultivos, seguido por una infección latente sistémica en unos pocos de esto. Moteado en las hojas

Phaseolus lathyroides: Moteado o mosaico sistémico clorótico y rizado en las hojas.

1.6.4 Transmisión del SMV:

SMV es transmitido por insectos vectores, injerto, semilla y mecánicamente (Arif & Hassan, 2002). Los insectos que han sido reportados en la transmisión de este virus son: especies de *Chrysomelidae* (*Ceratoma trifurcata*, *Epilachna varietis*) y *Coleoptera*, mediante mecanismo semipersistente. De manera no persistente es transmitido por *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. (Adams & Antoniw; Antoniw & Adams; Brunt, A. A., et al., 1996)

2. Objetivos

2.1 Objetivo

Determinar la incidencia de *Soybean mosaic virus* (SMV) en cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en Cundinamarca y la diversidad genética del SMV en las plantas procedentes de diferentes sitios de Colombia.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la incidencia del *Soybean mosaic virus* (SMV) mediante ELISA en tres cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) de Cundinamarca.
- Determinar la presencia de *Soybean mosaic virus* en malezas asociadas y en cultivos vecinos.
- Relacionar factores asociados con la incidencia de enfermedad causada por potyvirus (*Soybean mosaic virus*) como: malezas, cultivos adyacentes o anteriores, variables climáticas.
- Evaluar la diversidad del *Soybean mosaic virus* en las plantas de *P. edulis* Sims. mediante secuenciación de nucleótidos de aislamientos procedentes de diferentes regiones de Colombia.

3. Muestreo

El muestreo se realizó en tres cultivos de gulupa ubicados en los municipios de Venecia, Tibacuy y San Bernardo del departamento de Cundinamarca. Las características de los tres cultivos son presentadas en la Tabla 3-1. Las muestras de plantas con síntomas relacionados con infección viral o no sintomática, de malezas y de cultivos vecinos fueron colectadas en dos periodos de tiempo. Entre la primera y segunda colecta transcurrieron 3-4 meses. Inicialmente se tomaron muestras de un cultivo de San Bernardo de 5000 mil plantas, pero éste no se pudo seguir evaluando debido a que el productor erradicó la plantación por una alta incidencia de virosis y bacteriosis, y dificultad para su manejo. En consecuencia, se determinó evaluar otro cultivo de San Bernardo cercano al anterior y proveniente de las semillas de éste, el cual tenía 6 meses edad. Los cultivos de Tibacuy y Venecia contaban con tutorado en espaldera, por el contrario el cultivo de San Bernardo contaba con un tutorado emparrado.

Tabla 3-1: Características de los cultivos muestreados

Cultivo	Tutorado	Número de plantas	Edad del cultivo	Cultivos vecinos	Distancia Surcos (m)	Malezas	Cultivo vecino
Venecia	Espaldera	2000	2 años	No	3	Si	Tomate
Tibacuy	Espaldera	1000	2 años	No	3	Si	Silvestre
San Bernardo	Emparrado	500	6 meses	Si	3	No	Uchuva, frijol

El diseño experimental se estableció de forma sistemática tomando 5 hojas de diferentes ramas por planta, y cada planta recolectada se distancia por dos plantas con la siguiente planta evaluada. Cada planta colectada fue georeferenciada con el sistema de posición global (GPS), registrando 5 veces cada posición espacial para disminuir el error de precisión. Adicionalmente se contó con el registro climático en los meses previos al muestreo con estaciones meteorológicas satelitales que se encontraban en cada cultivo.

4. Incidencia de potyvirus y SMV en cultivos de gulupa

4.1 Introducción

Soya (*Glycina maxima* (L.) Merrill) es uno de los cultivos más importantes en China. Alrededor de 54 enfermedades de soya disminuyen su producción como plagas, infección por hongos, bacterias y virus. Las prácticas de control incluyen rotación de los cultivos y uso de variedades resistentes (Liu, *et al.*, 2008). Una de las enfermedades más comunes en dichos cultivos es el mosaico de la soya causado por *Soybean mosaic virus* (SMV), las pérdidas en producción se estiman entre el 8% y 35%, alcanzando en algunos casos el 86.94% (Lu, *et al.*, 2010).

La incidencia de SMV (%) a escala de campo y de países se define como el número de muestras detectadas como positivas para SMV, dividido por el número total de muestras evaluadas (Lu, *et al.*, 2010).

Se han encontrado secuencias de SMV infectando *Passifloras* spp. (Benschler, *et al.*, 1996). Los síntomas inducidos por SMV en pasifloras son: mosaico severo, epinastia, defoliación y muerte prematura de las plantas (Fischer & Rezende, 2008). Sin embargo, la detección de SMV es debe realizarse directamente mediante detección serológica o molecular y no por evaluación de los síntomas de la enfermedad. Esto debido a que los síntomas que se observan pueden variar con respecto a los cultivares, genotipo del virus, edad de la planta con tiempo de infección y factores ambientales (Lu, *et al.*, 2010). En el presente estudio se evaluara la incidencia del SMV mediante la técnica DAS-ELISA.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Extracción

Se tomaron cinco hojas de diferentes ramas de cada planta (preferiblemente con síntomas), conservándolas en papel aluminio y en neveras de icopor con hielo durante el viaje, posteriormente fueron maceradas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. El procedimiento de extracción dependió del procedimiento del kit que se utilizó para las diferentes detecciones, explicadas a continuación.

4.2.2 Detección de potyvirus

Se utilizó el kit indirecto ELISA-potyvirus de Bioreba. Las muestras se homogenizan con bufer de extracción PTA en una proporción de 1:50 (100mg en 500 µl en bufer de extracción). Se adicionaron 200 µl de de cada extracto por dos pozos, haciendo un duplicado de cada muestra. En cada placa se incluyeron controles positivo y negativo específicos de cada kit. Las placas se llevaron a condiciones de cámara húmeda y temperatura de 4°C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron varios lavados con PBST (1x), luego se adicionó la IgG anti poty(1:1000) en cada pozo y se llevó a incubación a 37 °C por dos horas. Después de lavar de nuevo con PBST (1x), se adicionó el Ig antimouse conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000), y se incubó 2 horas a 37°C. Después del último lavado con PBST (1x) se adicionó una solución de pNPP (p-nitrofenilfosfato), se incubó por una hora y se midieron los valores de absorbancia a 405nm en un lector de ELISA BioRad. Las muestras positivas fueron determinadas por presentar un valor superior al el doble del promedio del negativo. Los rangos establecidos como bajo, medio y alto, fueron determinados por la división de las absorbancias del mínimo positivo hasta el máximo positivo dividido en tres, con el fin de parametrizar los valores ya que la concentración no se puede calcular directamente de la absorbancia por motivos como: no se realizó una curva de calibración por cada placa y por los epitopes o anticuerpos que se pueden unir, sin embargo es proporcional a lo detectado.

4.2.3 Detección de SMV

Se utilizó el kit de DAS ELISA de Agdia SRA 333000 que detecta específicamente las proteínas virales de *Soybean mosaic virus* (SMV). Para la extracción se tomaron 150-200

mg de hojas previamente maceradas y se adicionan 600µl de buffer de extracción para macerar con pistilos. Primero se realizó el cubrimiento de los pozos con el primer anticuerpo colocando el IgG anti SMV en dilución 1:200 cubrimiento con su respectivo buffer en los pozos (100 µl/pozo). Esta placa se dejó en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C (nunca se dejó a 4 horas a temperatura ambiente). Luego se lavó con PBST (1x), y se dispensaron las extracciones frescas de las muestras en cada pozo por duplicado, al igual que el positivo, negativo y blanco. Se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron siete lavados. Posteriormente se incubó con 100 µl de la inmunoglobulina AntiSMV conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (dilución 1:100), se realizaron tres lavados y se adicionaron 100 µl de p-NPP (para-nitrofenilfosfato). La reacción se evaluó a las dos horas mediante el valor de absorbancia a 405 nm. Las medidas positivas y los respectivos rangos fueron determinados como se mencionó previamente en la prueba de detección de potyvirus para analizar a grosso modo las concentraciones víricas.

4.2.4 Análisis de datos de georeferenciación y variables climáticas

Los datos de georeferenciación para cada planta se ubicaron en un plano cartesiano usando método de patrones puntuales y posteriormente se hizo una interpolación para realizar los mapas de densidad que se encuentran en ARGIS. El Ic es el índice de clúster que representa a la agregación de los focos de la variable ausencia-presencia del potyvirus o SMV utilizando SADIE shell v. 1.5.

Por otra parte para el análisis de datos climáticos se utilizó el método multivariado ya que el análisis de datos multivariantes tiene por objeto el estudio estadístico de las diversas variables medidas en elementos de una población. El procedimiento incluye las siguientes estrategias (Peña, 2002):

- Resumir el conjunto de variables en unas pocas nuevas variables, construidas como transformaciones de las originales, con la mínima pérdida de información.
- Encontrar grupos en los datos si existen.
- Clasificar nuevas observaciones en grupos definidos.
- Relacionar dos conjuntos de variables

La técnica del análisis en componentes principales se puede presentar desde diversos puntos de vista. Para la estadística clásica se trata de la búsqueda de los ejes principales de la elipsoide indicadora de una distribución normal multidimensional, estos ejes se estiman a partir de una muestra (Lebart, *et al.*, 1984).

Se trata de una técnica de representación de los datos, con un carácter óptimo según ciertos criterios algebraicos y geométricos y que se utiliza en general sin referencia a hipótesis de naturaleza estadística ni a un modelo particular.

El análisis en componentes principales presenta numerosas variantes según las transformaciones realizadas sobre la tabla de datos: la nube de puntos individuos puede centrarse o no, reducirse o no. Entre estas variantes, el análisis en componentes principales normado (nube centrada-reducida) es ciertamente la más utilizada y es esta la que seleccionamos para presentar los principios del análisis en componentes principales (Lebart, *et al.*, 1984).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Incidencia de SMV y potyvirus en cultivos de gulupa en

Cundinamarca

Las muestras detectadas por ELISA-Poty y ELISA-SMV fueron categorizadas en un rango de bajo, medio y alto. Las muestras con valores inferiores a dos veces el valor del control negativo fueron definidas con un valor negativo o nulo (Harlo&Lane, 1988). La incidencia (%) de SMV en los cultivos fue calculada como el número de muestras detectadas con SMV, dividido por el número total de muestras tomadas de un cultivo por 100 (Lu, *et al.*, 2010).

En total fueron evaluadas 320 plantas distribuidas en 165 procedentes de Venecia, 95 de Tibacuy y 60 de San Bernardo en cada muestreo. Los síntomas asociados a infección viral en plantas de gulupa, fueron manchas circulares verdes en frutos inmaduros, manchas anulares verdes en frutos maduros, deformación en ápices de ramas,

deformación y mosaicos foliares(ver Figura 4-2) (Camelo García, 2010). Sin embargo, como se evidencia en el histograma (Figura 4-1), el porcentaje de plantas con síntomas fue significativamente menor (prueba de proporciones p-value) comparado con el valor obtenido mediante detección serológica para SMV y poty. En estudios previos de SMV en cultivos de soya se encontró que la mejor estrategia para evaluar incidencia es la evaluación mediante pruebas serológicas o moleculares y no mediante valoración visual de síntomas, ya que éstos son modificados por el cultivar de la planta, factores ambientales, o tipo de aislamientos de SMV (Lu, *et al.*, 2010).

Figura 4-1: Histograma de la incidencia observada con respecto a la incidencia detectada mediante ELISA

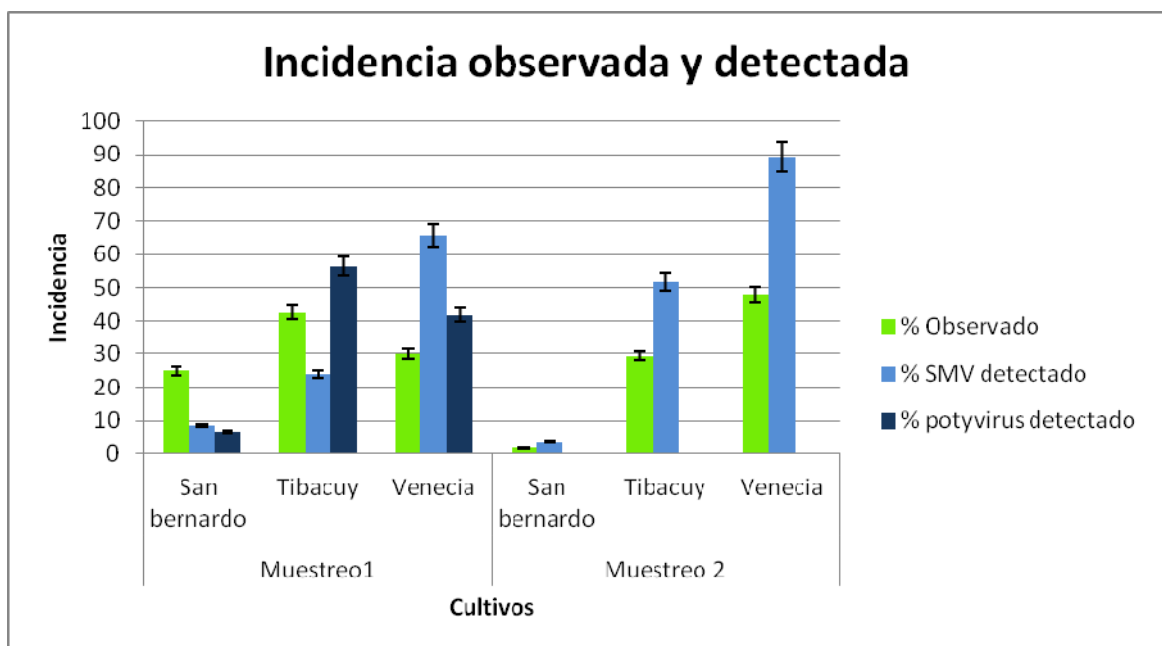
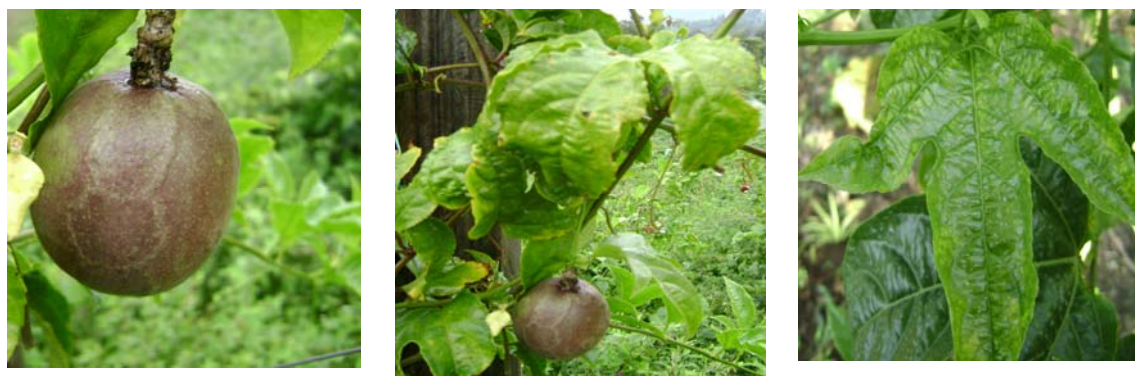


Figura 4-2: Síntomas virales en gulupa



Fotografías: Luz Andrea Gordillo, 2011

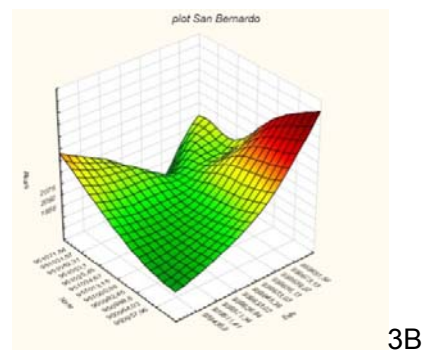
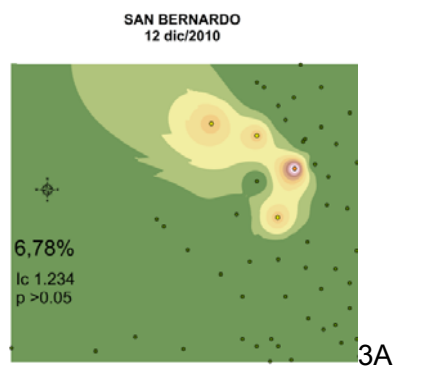
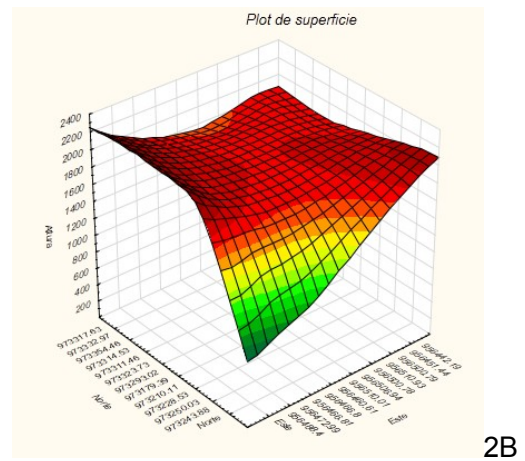
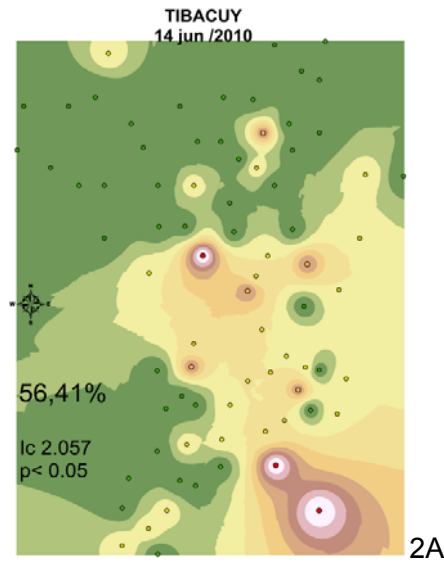
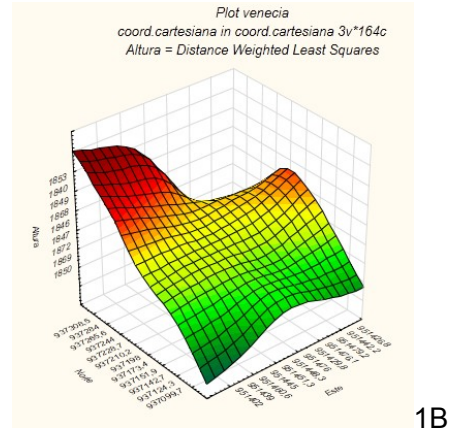
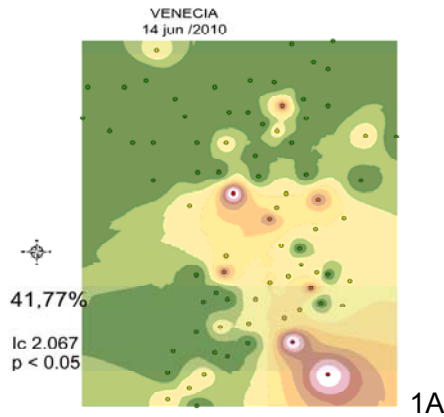
En la Figura 4-3, se observa el patrón de relieve de los cultivos con sus respectivos mapas de densidad de las plantas detectadas por ELISA para potyvirus. El foco de infección vírica en cultivos de Venecia y Tibacuy se encontró en áreas de menor altitud, sin embargo en San Bernardo esta relación no es evidente.

Para determinar si los cultivos presentaban agregación de focos de infección según la altura, se realizó una correlación no paramétrica (tau- Kendall) usando R 2.13.2 entre la altura con la variable de ausencia-presencia de potyvirus. El resultado de esta correlación mostró valor de significancia en Venecia ($p < 0,005$) (Tabla 4-1). Para SMV la diseminación de la virosis se presentó independiente de la altura, calculada por una no significancia estadística ($p > 0.05$) de los índices de clúster o agregación de Venecia y San BB. Aunque no hay una correlación significativa para todos los cultivos solo en Venecia (Tabla 4-1), la altitud podría influir sobre los focos de infección, ya que en las áreas más bajas la humedad puede aumentar promocionando así el microambiente adecuado para el desarrollo de patógenos (bacteriosis, víricas, hongos, etc.), lo que abriría la expectativa de siembra en mayores alturas.

Tabla 4-1: Correlación de Kendall de la variable presencia o ausencia de potyvirus con respecto a la altura

	p-value	Tau
Venecia	0,003	0,193
Tibacuy	0,012	0,238
San BB	0,110	-0,174

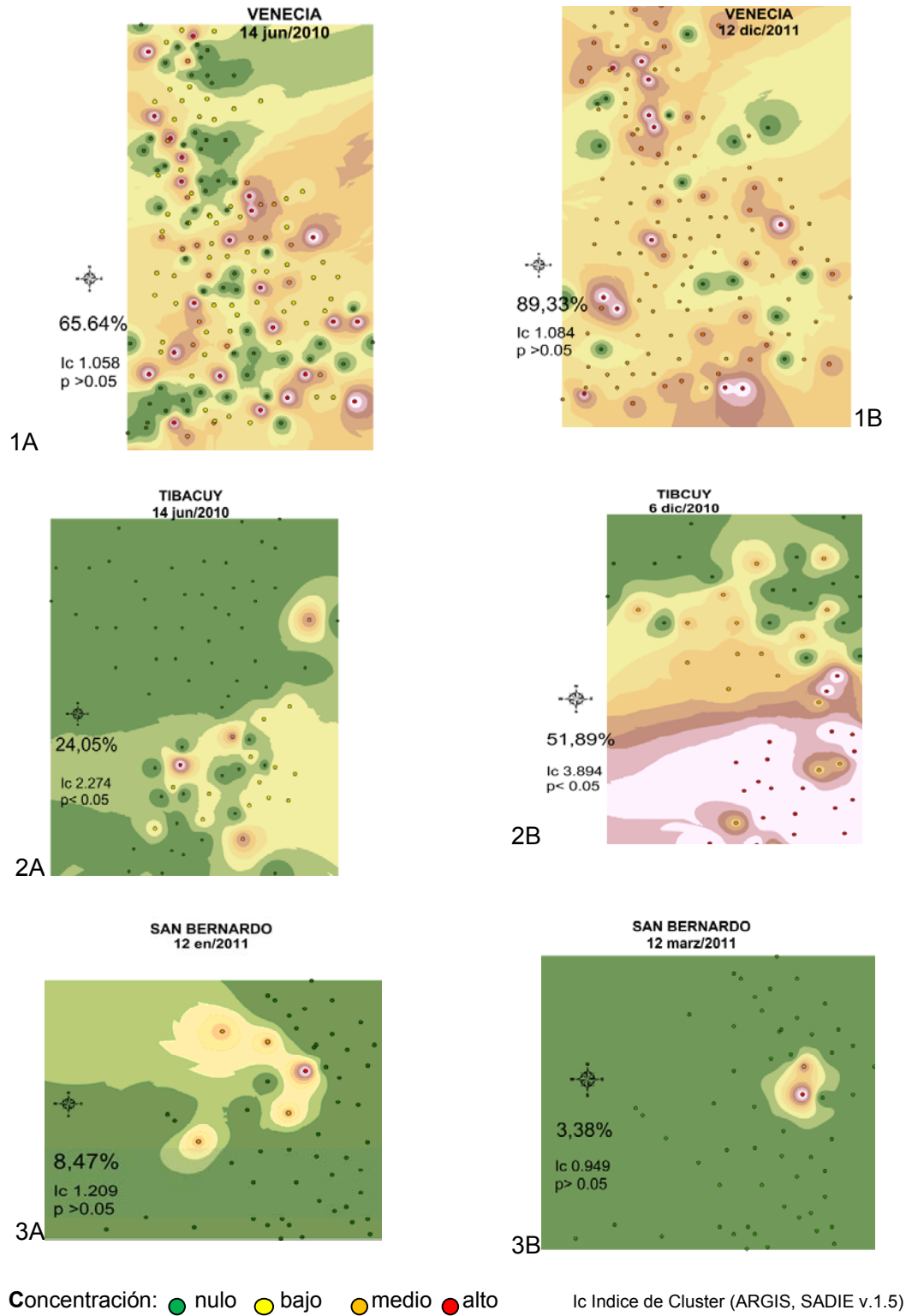
Figura 4-3: Incidencia de potyvirus en tres cultivos de Cundinamarca (A) y la topografía de las respectivas parcelas (B)



Concentración: ● nulo ● bajo ● medio ● alto

Ic Índice de Cluster (ARGIS, SADIE v1.5)

Figura 4- 4: Comparación en dos tiempos diferentes de la incidencia de *Soybean mosaic virus* en 3 cultivos en Cundinamarca (Ay B) .



En la infección por potyvirus (Figura4-3) se observa que hay formación de agregados o de clústeres en Venecia y Tibacuy ($p < 0.05$ índice de clúster) los cuales eran cultivos con edad mayor y tutorado en espaldera. Por el contrario, el cultivo de San Bernardo era más joven, con tutorado en emparrado, tratamiento exhaustivo de malezas y que provenía de semillas de otro cultivo erradicado por virosis. A pesar de esta última condición, este cultivo presentó menor incidencia de virus. Observaciones preliminares muestran que al erradicar malezas se puede disminuir la expresión de síntomas mosaico y arrugamiento en las hojas y manchas anulares en los frutos (Parrado, 2010).

Diferencias significativas entre la incidencia de potyvirus y SMV en el mismo tiempo de muestreo fueron encontradas. Se encontraron diferencias de incidencia en Venecia de 41.77% para potyvirus y 65.64% para SMV en el mismo muestreo. Este resultado podría explicarse en las características de la técnica serológica utilizada para la detección del SMV. El kit de ELISA directo (DAS-ELISA) es más sensible que el indirecto empleado en la detección de potyvirus, adicionalmente los anticuerpos son diseñados para secuencias aminoacídica que infectan soya lo que produciría un cambio en la detección de SMV. En cuanto al cultivo de Tibacuy, la incidencia de potyvirus fue del 56.41% y de SMV fue del 24.05%. Esta diferencia indica que las plantas pueden estar infectadas con otros potyvirus diferentes a SMV, en este sentido se han reportado otros potyvirus infectando otras *Pasifloras* (Fischer & Rezende, 2008).

Comparando los dos muestreos que se realizaron en tiempos diferentes, se observó que tanto en Venecia como en Tibacuy hay un aumento de la incidencia de SMV. En Venecia se encontró en Junio del 2010 una incidencia del 65.64% que alcanzó un valor del 89.33% en diciembre de ese año. Para el mismo año en Tibacuy, se encontró en Junio una incidencia del 24.05% y en diciembre aumentó al 51.89%. Además la concentración del virus en las plantas detectadas inicialmente también aumentó. Por el contrario en el cultivo de San Bernardo, la incidencia disminuyó del 8.47% en enero de 2011 al 3.38% en marzo del mismo año, explicado por factores que se mencionan más adelante.

Otro punto de interés es la transmisión del SMV por áfidos de las especies de *Chrysomelidae* (*Ceratoma trifurcata*, *Epilachna varietis*) y *Coleoptera*, *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. (Adams & Antoniw; Antoniw & Adams; Brunt, A.

A., et al., 1996). Estos áfidos no tienen a las pasifloras como fuente de alimentación, sino que pueden adquirir el SMV durante pruebas y serían trasladados en un período de tiempo corto (Camelo García, 2010). Por otra parte el SMV y en general los potyvirus pueden ser transmitidos mecánicamente por el uso de herramientas utilizadas en el cultivo (Fischer & Rezende, 2008). Recientemente se encontró SMV infectando plántulas de gulupa en viveros, lo cual puede explicar la infección temprana en cultivos de Cundinamarca (Camelo García, 2010).

4.3.2 Evaluación de factores bióticos y climáticos en cultivos de gulupa y su posible asociación con incidencia de infección por potyvirus (*Soybean mosaic Virus*)

La incidencia de una enfermedad viral puede depender de la dinámica de la población de insectos vectores, y esta a su vez depende de las condiciones ambientales y de los hospederos de un virus. Por esta razón fueron evaluados algunos factores que pudieran influir en la infección por SMV en los cultivos de gulupa en Cundinamarca como lo son: cultivos cercanos a la parcela de estudio, cultivos anteriores y variables climáticas.

En los muestreos de plantas de gulupa en Venecia se observaron hemipteros (chinchas). Si bien no existen reportes de hemipteros como vectores de potyvirus se extrajo RNA de cinco individuos y se realizó RT-PCR (retrotranscripción y PCR), encontrándose resultado negativo para SMV. Otro factor que podría influir en la incidencia de SMV es la presencia de cultivos susceptibles a SMV. Tanto en Venecia como en Tibacuy, cultivos de frijol precedieron a los de gulupa y el frijol ha sido reportado como hospedero de SMV (Adams & Antoniw).

El análisis de variables climáticas se realizó en varios pasos: 1) Descripción de variables, para descartar variables con poca información y de bajo interés, 2) Análisis multivariado de cada muestreo, 3) Análisis multivariado de todos los muestreos, para ello se utilizaron los programas SPAD 7.0 y R 2.13.2.

En éste estudio se utilizó el método de Análisis de componentes principales usando el método normado, para las p variables ($p=9$), y n horas (n =horas de los 4 meses), el cual se reduce a un plano factorial de menor dimensión para facilitar la interpretación de la situación climática de los muestreos en el espacio de 3 cultivos en Cundinamarca y tiempo comprendido entre abril de 2010 al marzo del 2011.

Figura 4-5: Análisis de componentes principales de todas las variables climáticas. Gráficos de círculos de correlación. A. B. Venecia primer y segundo muestreo, C.D. Tibacuy primer y segundo muestreo; E.F. San Bernardo primer y segundo muestreo

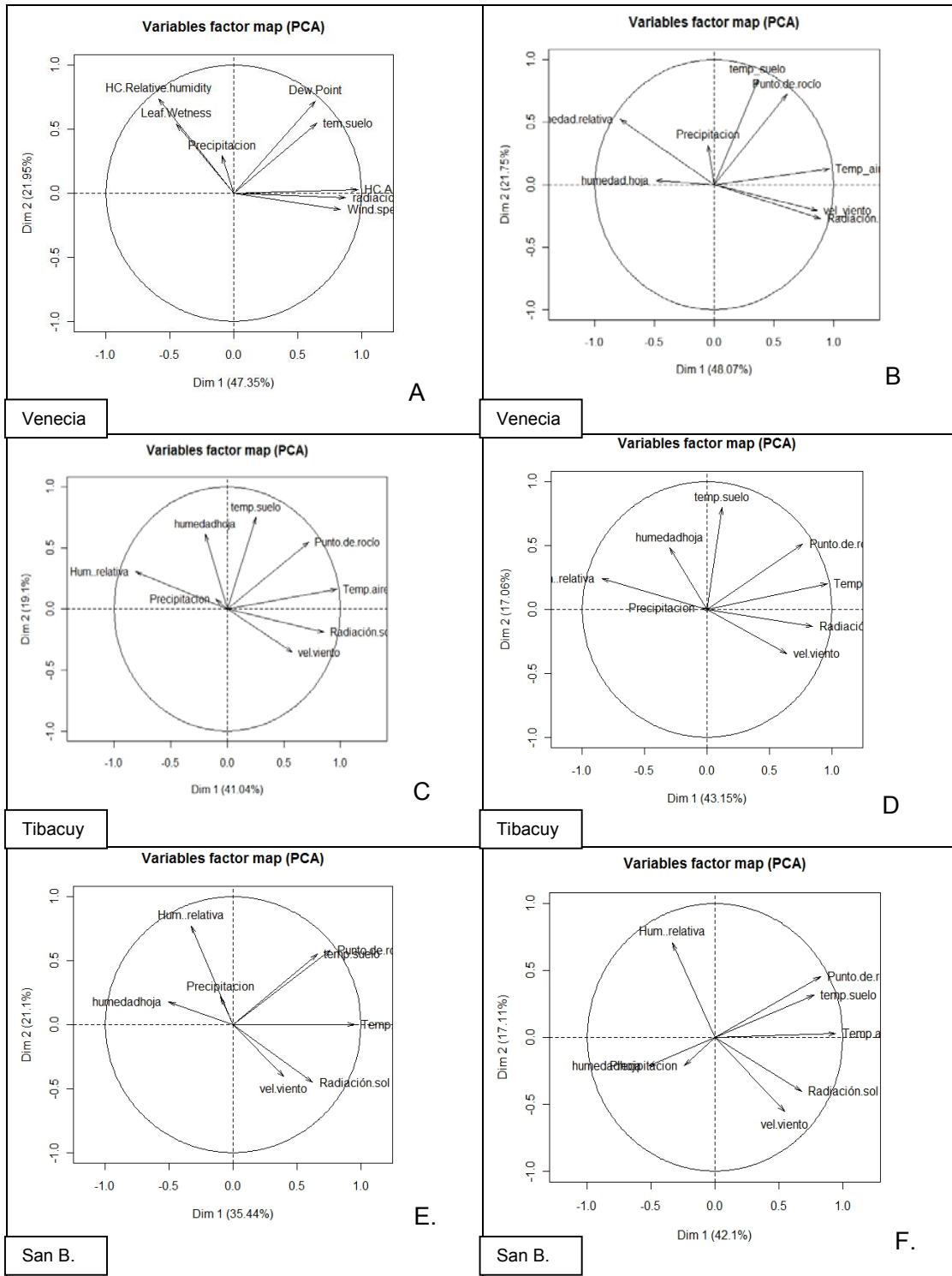


Figura 4-6: Círculos de correlaciones de los ACPs de cada cultivo correspondiente a variables clima. A. B. Venecia primer y segundo muestreo. C. D. Tibacuy primer y segundo muestreo. E. F. San Bernardo primer y segundo muestreo

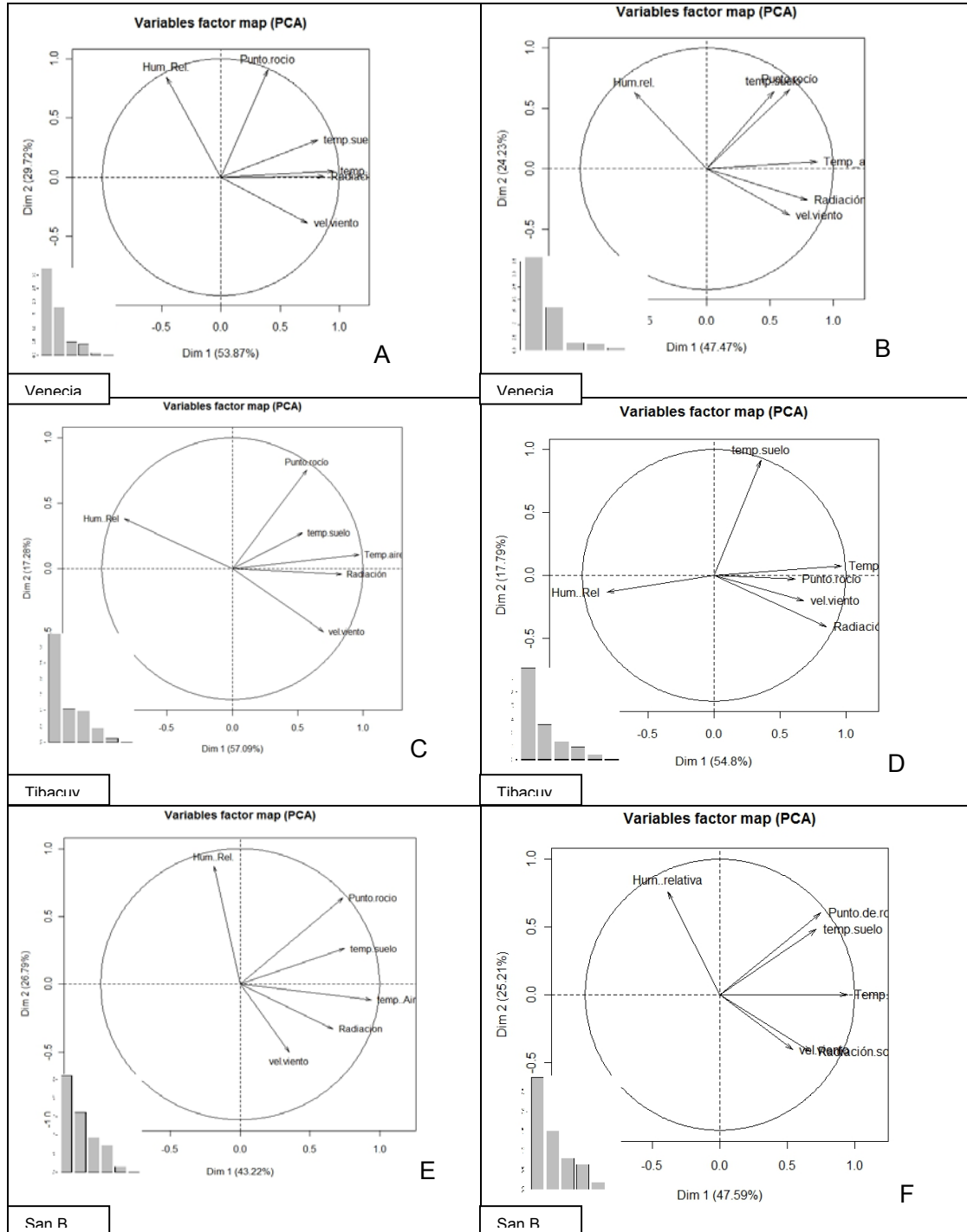
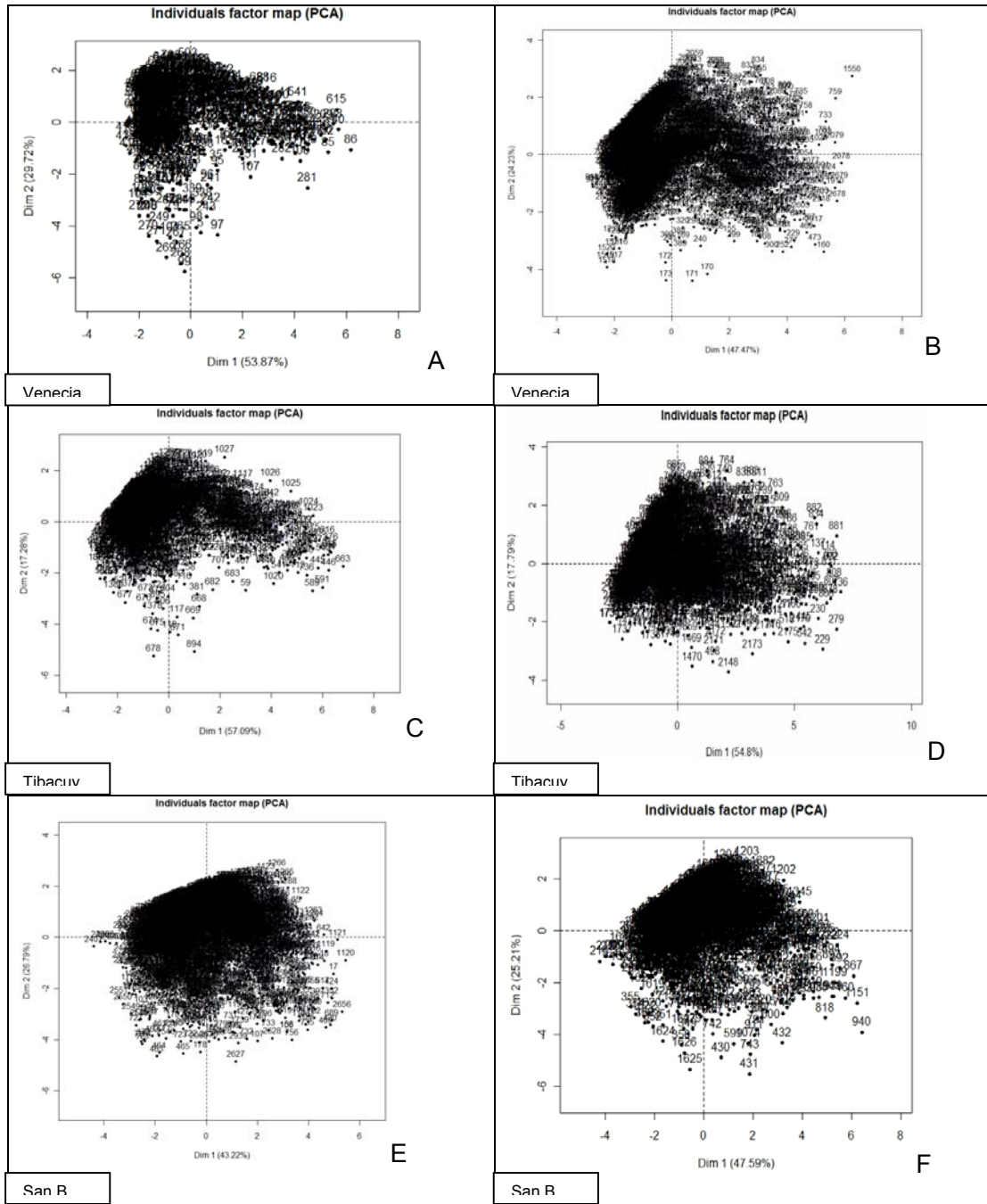


Figura 4-7: Plano factorial de la nube de individuos- horas correspondientes a los 4 o 5 meses antes del muestreo. A. B. Venecia primer y segundo muestreo. C. D. Tibacuy primer y segundo muestreo. E. F. San Bernardo primer y segundo muestreo



En la Figura 4-5 de análisis de componentes principales se observa que las variables de precipitación y humedad de hoja no aportan mucha información al análisis, ya que los vectores de estas variables se encuentran muy cortas las cuales se confirmaron con los datos de contribuciones de las variables a los ejes (datos no mostrados), no aportan información y pueden estar sujetos a errores por la forma de medida de los satélites, ya que la velocidad de viento no es la misma en todo el campo y la humedad de hoja es un estimativo.

En todos los análisis de componentes principales de las variables en cada cultivo, las varianzas fueron representativas (todas mayores al 70%), siendo que para el primer eje se encontraba la mayor inercia como se representan en los "barplot" o diagrama de caja, y los segundos ejes aportaban más de información con lo cual era suficiente para hacer el análisis, además el cambio de inercia en los barplots es hasta el segundo eje lo que indica que las dos dimensiones son suficientes para realizar el análisis en todos los cultivos.

En cuanto a la Figura 4-7 se observó que la nube de puntos de las horas, formado por la medida de sus 7 variables meteorológicas, presentaba tendencias hacia la parte de superior lo que indica que el centroide de la nube de puntos se caracterizaba por tener índices altos de humedad.

También se encontró que existían horas por fuera del rango promedio, es decir que tenían medidas diferentes a las promedio de las variables medidas, como se observa en Venecia y en Tibacuy que son los cultivos con incidencias de infección alta, se presentan horas que se encuentran en la parte extrema hacia el lado positivo que se caracterizaron por mayores temperaturas de aire y suelo.

Las horas encontradas fuera del promedio son picos dentro de las medidas regulares, sin embargo no son picos aislados o errores del sensor porque como se aprecia en la gráfica hay una agrupación de horas cercanas, por lo que se estaría hablando de picos de días y esto es propio de un sistema ambiental.

En San Bernardo (E y F) que tiene una incidencia baja y que disminuyo en el segundo muestreo, se observa que hay una disminución de la velocidad de viento, radiación solar,

temperaturas de aire y suelo. Esto sugiere que la incidencia disminuye al disminuir estas variables. En cuanto a humedad relativa no tiene un efecto marcado debido a que como se observa no hay una tendencia hacia el cuadrante superior izquierdo.

Sin embargo no se podría decir más que las descripciones de cada cultivo, por lo tanto, es necesario reunir toda la información en un solo análisis para la descripción total y conclusión final.

Primero se determinó cuantos componentes factoriales se tomarían en cuenta para su posterior análisis.

Teniendo en cuenta los diferentes criterios para escoger los ejes principales, se realizó el siguiente análisis:

- Alcanzando más del 70% de la varianza acumulada se escogerían los dos primeros componentes, ya que con éstos se alcanza más del 70%, lo que es representativo para el análisis.
- Según el criterio de los valores propios, se escogerían los tres primeros componentes debido a que son mayores de 1 y proporcionarían información significativa.
- Según el criterio del cambio de inercias, representado en el histograma de los valores propios que se observa en la figura 4-8, el primer eje es el que mayor inercia tiene (45,40%) y el segundo un poco menos (26,99) y es ahí cuando se encuentra un punto de inflexión en debido a que cambia la inercia, por lo que se escogería también los dos primeros ejes principales

En conclusión se escogieron los dos primeros ejes para el análisis general de los componentes ya que así sería más sencillo de observar y sería representativo además esto se comprobó quitando los ejes parásitos según método de Anderson's Laplace (Lebart, *et al.*, 1984), en donde se observan que los dos primeros ejes tenían valores propios mayores de 1.

Tabla 4-2: Tabla de los valores propios para los primeros ejes factoriales del ACP total

Eje	Valor propio	Porcentaje de varianza	Varianza acumulada
1	2,7239	45,40	45,40
2	1,6196	26,99	72,39
3	1,0816	18,03	90,42
4	0,4042	6,74	97,16
5	0,1432	2,39	99,54

Después de justificar debidamente el análisis de los dos primeros ejes se observa la matriz de correlaciones, la cual es una matriz cuadrada en la que se presentan las relaciones entre las variables (Tabla 4-3). Allí se encuentra que la máxima correlación la presenta temperatura de suelo con temperatura de aire (0,72) y radiación solar con temperatura de suelo (0,64. Esto es coherente ya que tanto la radiación y la temperatura de aire modifican la temperatura del suelo, por la ley de la termodinámica en el que un cuerpo con mayor calor le pasa a uno de menor calor.

Por otra parte se encontró que radiación solar no tiene ninguna correlación con punto de rocío. La velocidad del viento y la humedad relativa tiene una correlación negativa con la variable temperatura de aire, es decir cuando la velocidad de viento aumenta y la humedad relativa también la temperatura de aire tiende a disminuir.

Tabla 4-3: Matriz de correlaciones entre variables

	Temp. suelo	Radiación solar	Vel. viento	Temp. aire	Hum#rel	Punto rocío
Temp. suelo	1,00					
Radiación solar	0,64	1,00				
Vel viento	-0,18	-0,11	1,00			
Temp. aire	0,72	0,44	-0,57	1,00		
Hum. rel	-0,14	-0,36	0,35	-0,54	1,00	
Punto rocío	0,39	0,00	-0,31	0,31	0,55	1,00

En primera medida se analizó el plano de las variables, en donde se observaron las coordenadas y las contribuciones de cada una con respecto a las dos dimensiones escogidas.

En la tabla 4-4 se observa que la variable de radiación, temperatura de aire y temperatura de suelo poseen las coordenadas positivas más altas en el eje1 (0.69. 0.93 y 0.81 respectivamente) y en este eje la velocidad del viento y la humedad relativa tienen coordenadas negativas que significan correlaciones y varianzas altas con respecto al eje 1.

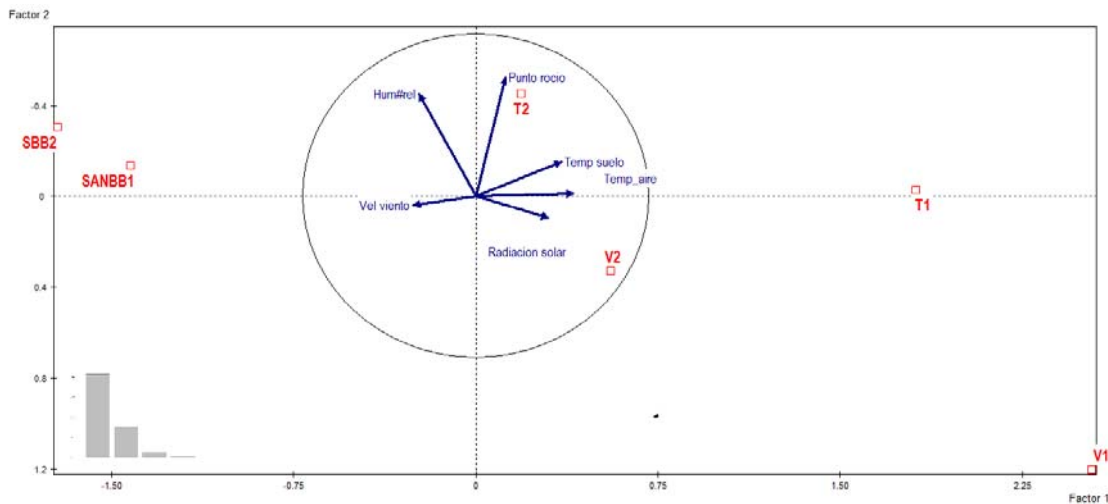
Tabla 4-4: Coordenadas, contribuciones y correlaciones de variables climáticas con respecto a los ejes principales escogidos

Variable	Coordenadas		Correlación con eje		Varianza	
	Eje 1	Eje 2	Eje 1	Eje 2	Eje 1	Eje 2
Temp suelo	0,81	0,27	0,81	0,27	0,49	0,21
Radiación solar	0,69	-0,17	0,69	0,17	0,42	-0,13
Vel. viento	-0,6	-0,07	-0,6	-0,07	-0,36	-0,06
Temp_aire	0,93	0,02	0,93	0,02	0,56	0,02
Hum. rel	-0,54	0,8	-0,54	0,8	-0,32	0,63
Punto rocío	0,28	0,93	0,28	0,93	0,17	0,73

En el eje 2 se observan que las coordenadas son muy bajas para las variables temperatura del suelo, radiación solar, velocidad del viento, temperatura del aire, pero para humedad relativa y punto de rocío son altas (0,8 y 0,93), al igual sus varianzas son de 0,63 y 0,73 las cuales están bien representados.

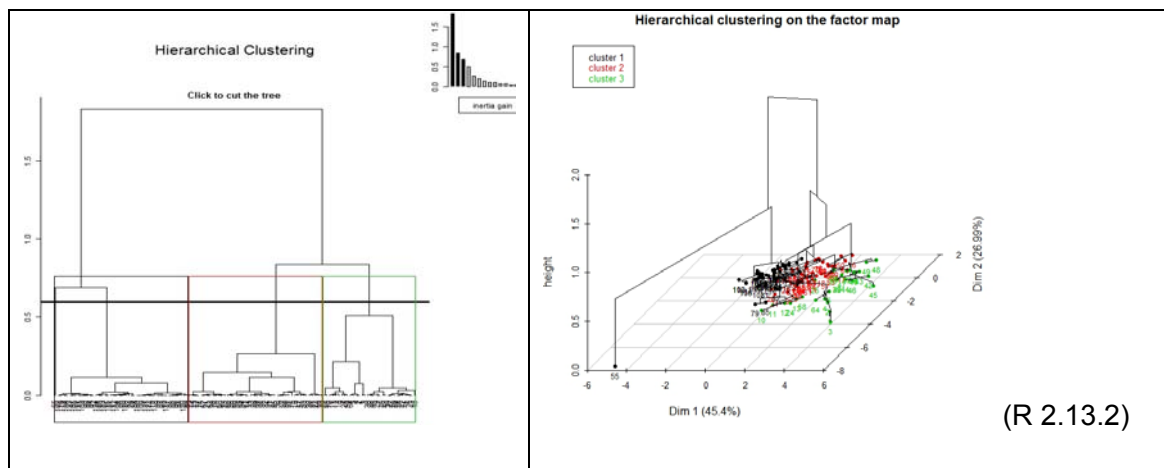
Se definió el eje 1 como temperatura con contraposición el viento y en el eje 2 se colocó el nombre de “humedad” en el que se incluye humedad relativa y punto de rocío.

En el gráfico descriptivo del círculo de correlaciones se observa lo sustentado cuantitativamente, adicionando una variable cualitativa suplementaria (cultivos), la cual no interfiere en la formación de los ejes, pero se ubica en el plano formado por las variables, aportando mayor información sobre la característica de cada cultivo y se observa más que la gráfica de la horas ya que siendo más de 6000 datos no se podrían sacar conclusiones.

Figura 4-8: Circulo de correlaciones del ACP general con inercia

Para determinar las características de los cultivos primero se realizó el método de agrupamiento llamado clúster .con el fin de realizar agrupaciones de los cultivos más idénticos de acuerdo a la distancia generada en este plano factorial sin los ejes parásitos que aumentan el ruido.

En primera medida se realiza un clúster jerárquico en el fin de determinar cuántas agrupaciones o particiones necesito realizar para validar y consolidar los clúster.

Figura 4-9: Clúster jerárquico

Como se observa en la Figura 4-9 se establecieron 3 grupos que tenían un cambio de inercia y es adecuado para el análisis, otra posibilidad era particionarlo en 2 pero para

objetivo de este análisis no daba mucha información, y la siguiente era de 4 que tampoco era justificable para 6 muestreos.

CLUSTERING CONSOLIDATION
 AROUND CENTERS OF THE 3 CLUSTERS ACHIEVED BY 10 ITERATIONS 8WITH MOVING CENTERS
 BETWEEN-CLUSTERS INERTIA INCREASE

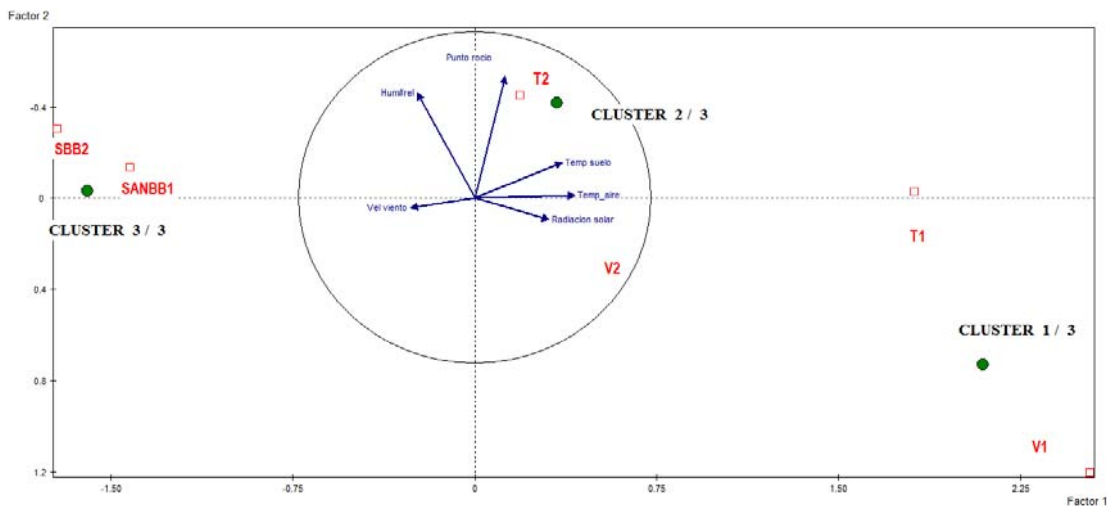
ITERATION	TOTAL INERTIA	INTER-CLUSTERS INERTIA	RATIO
0	5.42511	2.66559	0.49134
1	5.42511	2.75142	0.50716
2	5.42511	2.75501	0.50783
3	5.42511	2.75501	0.50783
4	5.42511	2.75501	0.50783

(SPAD 7)

En los datos anteriores se observa que después de pocas iteraciones fue posible aumentar la inercia con lo cual se valida el establecimiento de grupos (Lebart, *et al.*, 1984)

Teniendo en cuenta esto se realizo el establecimiento de los clúster con las variables cualitativas informativas obteniéndose la siguiente figura 4-10.

Figura 4-10: Plano factorial con los clústers establecidos



(SPAD 7)

Aquí se observa que Tibacuy 1 se encuentra en el mismo grupo de Venecia 1 ya que las distancias en el ACP son muy cercanas, esta partición que aparece en la Figura 5-10 como clúster 1 es el grupo que presentaron incidencia 24,05% y 65,64%, por el contrario Tibacuy 2 y Venecia2 presentaron incidencias del 51,89% y 89,33%, lo que muestra que en estos dos cultivos aumentaron las incidencias en el segundo muestreo.

Por otra parte San Bernardo 1 y San Bernardo 2 con las incidencias más bajas 8,47 y 3,38% se ubican en coordenadas negativas del ACP en el eje 2, este cluster se caracteriza por tener mayor humedad relativa y viento y en contraposición a los que tienen mayores incidencias se caracteriza por tener menor temperatura en el cultivo en todos los 4 meses antes de muestreo, esto se afirma cuando al observar la diferencia entre San Bernardo 1 y 2, la incidencia del SMV es disminuida cuando disminuyo la temperatura en esos meses, lo que puede indicar que la carga viral es modificada por la temperatura.

En cambio Tibacuy 1, Tibacuy 2, Venecia 1 y Venecia se caracterizan por tener mayores temperaturas, la diferencia entre estos dos "clúster" (clúster 1 y cluster2) es que cuando aumentaron las incidencias en los segundos muestreos ((clúster 2), éstos subieron en coordenadas en el segundo eje. Es decir que el cultivo de Venecia 2 aumento hacia el lado positivo en el eje al igual en Tibacuy por lo que indica que aumentaron en el punto de rocío y humedad relativa.

Al respecto se ha encontrado que la respuesta de defensa antiviral mediada por silenciamiento es dependiente de la temperatura. En el 2003 se describió que a bajas temperaturas el nivel de carga viral SMV o de siRNA derivados de transgenes es dramáticamente reducido (Szittyá *et al.*, 2003). De manera similar, el silenciamiento de RNA es activado a bajas temperaturas en *Nicotiana benthamiana* infectada por *Cymbidium ringspot virus*, lo cual se acompaña de una mayor severidad de síntomas (Szittyá *et al.*, 2003). Por el contrario, un estudio reciente muestra que plantas de papaya infectadas por *Papaya ringspot potyvirus* exhiben un aumento de expresión de síntomas y de concentración viral cuando crecen en altas temperaturas (Magrauthia *et al.*, 2009). La explicación a este fenómeno está relacionada con aumento de afinidad dependiente de temperatura entre la proteína viral supresora de silenciamiento HC-Pro y siRNA de la planta (Magrauthia *et al.*, 2009). En soya infectada por *Soybean mosaic virus* se ha encontrado que la reacción necrótica extrema de susceptibilidad es dependiente de la temperatura, a mayor temperatura los síntomas de necrosis son reemplazados por mosaicos (Pengyin *et al.*, 2009). Los resultados encontrados en el presente estudio referidos a los valores de incidencia de SMV (carga viral) en plantas de gulupa, son similares a los reportados en papaya infectada por *Papaya ringspot virus*, en el sentido

que la plantación que creció a menor temperatura fue la que presentó la menor incidencia viral.

Existe la posibilidad que estos factores climáticos no afecten directamente la incidencia del SMV y los síntomas inducidos por éste, sino que por el contrario puede actuar indirectamente como por ejemplo sobre las poblaciones de áfidos. En los cultivos de maracuyá los áfidos se encuentran reportados como plagas secundarias debido a que directamente no ocasionan grandes daños en los cultivos, sino que su importancia es como vectores no persistentes del virus. Esta transmisión es dependiente de otros factores ambientales que pueden modificar el comportamiento del áfido.

Se considera que la transmisión mecánica es el principal mecanismo de difusión de enfermedades virales en los cultivos de maracuyá (Fischer & Rezende, 2008). Por lo anterior, se requiere más investigación sobre transmisión viral en cultivos de gulupa y su relación con poblaciones de áfidos involucrados específicamente con la transmisión de SMV.

5. Diversidad genética

5.1 Introducción

Los virus RNA son los patógenos más frecuentes en las infecciones de plantas, y el entendimiento de su diversidad a partir de análisis de secuencias nucleotídicas ha permitido avanzar en el entendimiento de la interacción con la planta hospedera, los insectos vectores (u otro tipo de vectores), la severidad de los síntomas inducidos, la dinámica poblacional en campo, entre otros. En virus RNA de plantas se ha encontrado que la alta frecuencia de mutaciones no necesariamente conduce a una alta variabilidad en las proteínas virales o a un cambio genómico rápido. Los genomas RNA virales muestra una estabilidad marcada (Albiach-Martí, *et al.*, 2000; Garcia-Arenal, *et al.*, 2000) y la variación en la secuencia aminoacídica no es mayor a la presentada por las proteínas de sus hospederos (Austin L, 2009). La bioinformática es una herramienta que ayuda a visualizar y a entender el problema mediante herramientas y métodos estadísticos.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Diseño de primers

Los primers empleados en este estudio para amplificación por RT-PCR de *Soybean mosaic virus* (SMV) fueron diseñados a partir del alineamiento de más de 30 secuencias disponibles en el GenBank. A pesar de que en estudio previo de diversidad de SMV infectando pasifloras en Colombia, fueron diseñados primers para CP y CI (Camelo García, 2010), fue necesario diseñar primers que permitan amplificar la longitud completa de los genes de interes. Para ello se diseñaron primers CP y P1, usando el programa Primer3 y alineamientos multiples con Clustalw.

Tabla 5-1: Primers diseñados para gen CP y P1 de SMV

PRIMERS	SECUENCIA (5'-3')	PRODUCTO ESPERADO	REFERENCIA
CP-R	GCGACCCGAAATGATAACTG	840pb	Este estudio
CP-F	GCTYGCTTCGTCYGGAAAAG	840pb	Este estudio
P1-R	GMRCTTCAGGATTTTGGGAG	960pb	Este estudio
P1-F	YCTYACAGCARCAGCAAGTC	960pb	Este estudio

5.2.2 Extracción de RNA

Extracción de dsRNA de pino (modificado)

Para realizar este procedimiento de extracción se adicionó 1g de la muestra de tejido vegetal macerado a 5ml de buffer de extracción, se mezcló con vortex, se incubó a 65°C por 15 minutos, se lavo la fase acuosa 2 veces adicionando en la primera extracción 4 ml y en la segunda 3 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó (12000rpm 30 min.), se adicionó 1ml de cloruro de litio 4M a la fase acuosa obtenida y se incubó toda la noche a 4 °C. Posteriormente se centrifugó 30min, para resuspender el pellet en 500 µl de buffer TE-SDS, luego se adiciono 700 µl isopropanol y 200 µl NaCl 5M llevándolo a incubación a -20°C por 30 min, luego se centrifugó a 3000rpm por 20min a 4 °C , se hizo un lavado en etanol para resuspender en 50 µl de agua estéril libre de RNAsas (Chang, 1993) (anexo D)

Extracción de RNA con trizol® (Invitrogen)

En este procedimiento se pesaron 100mg de tejido vegetal macerado y se adiciono 1 ml de TRIZOL ® (invitrogen) y 200 µl de cloroformo, se centrifugó (12000rpm 15 min.) y se transfirió la fase acuosa un tubo nuevo en donde se agregó 500 µl de isopropanol. Luego se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75% y por último se resuspendió el pellet seco en 50 µl de agua destilada libre de RNAsas incubándolo por 10 min a 60°C, y se almacenaron los extractos a -20°C (Anexo C)

5.2.3 Retrotranscripción (RT-PCR) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de la extracción de RNA se sintetizó cDNA con los primers reverse presentados en la tabla 5-1. RNase out (Invitrogen). Para ello se dejó el RNA (5 µl) de la extracción en denaturación a 95 °C por 5 min y se colocó directamente en hielo por 3 minutos, posteriormente se adicionó 20µl de la mezcla de reacción (Anexo E), la cual tenía las concentraciones finales de 1x Buffer RT (5x), 10mM DTT, 0.5mM dNTPs, 0.5 µM primer reverse, 0,4 U/µl RNasa OUT (RNaseOUT invitrogen), 4 U/µl transcriptasa inversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Invitrogen). Finalmente se programó en el termociclador BioRad un ciclo retrotranscripción de 90 minutos a 37°C y finalmente la retrotranscriptasa se inactivó a 70°C por 15 minutos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando *Taq Platinum®* DNA polimerasa (Invitrogen) (Anexo F), para lo cual se tomaron 5 µl de cDNA y se le adicionó 20µl de la mezcla de reacción que contenía una concentración final de 1X Buffer PCR(5x) , 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 0,5 µM primer sentido, 0,5 µM primer antisentido y 0,04 U/µl *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones generales de PCR fueron: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 a 40 ciclos de de 94°C por 30 segundos, 52 °C y 49°C para CP y P1 respectivamente por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos (Anexo F). La visualización de los resultados fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa 1,5%, y con tinción de bromuro de etidio, para la visualización en un documentador de Gel Doc™ XR (Bio-Rad). El tamaño del producto fue determinado usando los marcadores de peso 100 bp DNA ladder de Invitrogen.

5.2.4 Clonación

Al obtener los productos amplificados y compararlos con sus correspondientes pesos moleculares, se realizó el proceso de corte de las bandas directamente del gel de electroforesis de agarosa 1.5%. Posteriormente se realizó la purificación de las bandas con el kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit de invitrogen en donde se procesaron más de 30 muestras P1-SMV y CP-SMV

El proceso de clonación se realizó con el TOPO® TA Cloning® Kit (with pCR®2.1-TOPO®) with One Shot Mach1™-T1R Chemically Competent E. coli and PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (L y V) en donde los productos de pCR fueron ligados al plasmido pCR®2.1-TOPO® químicamente competente. Se recolectaron 10 colonias transformadas y la extracción se realizó por el método de ebullición(Sambrook & Russell, 2001). Se confirmó la presencia del inserto por PCR con los primers específicos para cada gen CP-SMV y P1-SMV, y se realizó por último la purificación del plásmido. Los fragmentos clonados fueron secuenciados mediante el método de Sanger. Tres clones de cada producto purificado fueron secuenciados en dirección sentido y anti-sentido usando los primers universales T7 y M13.

5.2.5. Análisis de secuencias

Se definieron las identidades de las secuencias de P1 y CP de SMV obtenidas realizando alineamientos con BLAST, posteriormente fueron editadas con bioedit (Sequence alignment Editor) para realizar alineamientos múltiples con CLUSTALW y posteriormente la reconstrucción filogenética y distancias se realizó con MEGA 5.05. En la tabla 5-2 se especifican las secuencias tomadas del Gen Bank con sus respectivas accesiones y referencias.

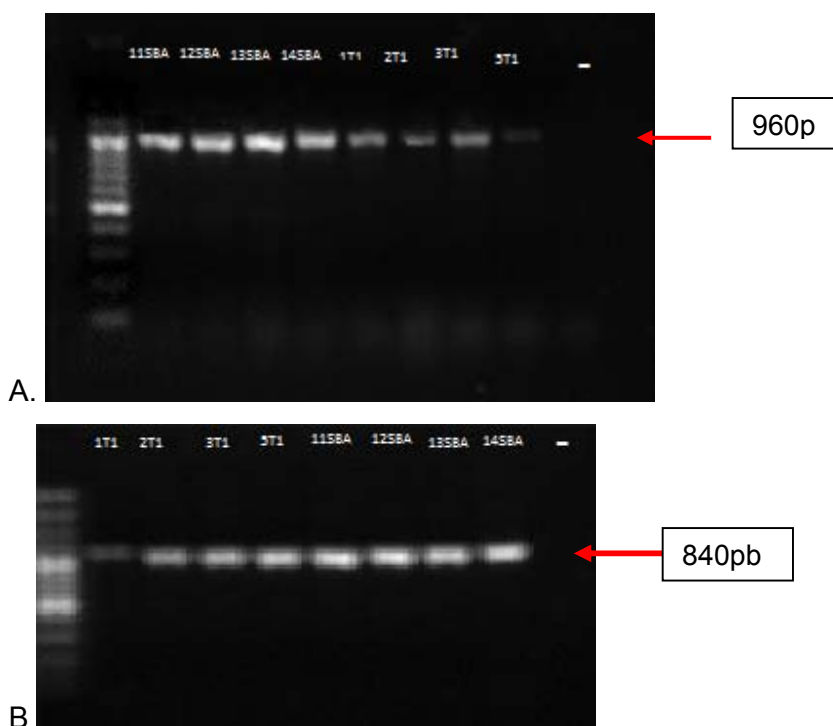
Tabla 5-2: Aislamientos del GenBank.

Aislamiento	País de	Hospedero	Año de		Referencia
	origen		muestreo	No. Accesoión	
WS209	Corea	<i>Glycine max</i>	2006	FJ640976	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
WS205	Corea	<i>Glycine max</i>	2006	FJ640975	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
WS144	Corea	<i>Glycine max</i>	2006	FJ640966	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
G5H	Corea	<i>Glycine max</i>	2005	FJ807701	(Seo, J. K., <i>et al.</i> , Marzo 2009)
G6H	Corea	<i>Glycine max</i>	2003	FJ640981	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
G7H	Corea	<i>Glycine max</i>	2001	FJ807700	(Seo, J.-K., Lee, <i>et al.</i> , 2009)b
WS37	Corea	<i>Glycine max</i>	2006	FJ640955	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
L-RB	Canada	<i>Glycine max</i>	2005	EU871725	(Gagarinova, A. G., <i>et al.</i> , 2008)
L	Canada	<i>Glycine max</i>	2005	EU871724	(Gagarinova, A. G., <i>et al.</i> , 2008)
Rsv4-RB3	Canada	<i>Glycine max</i>	2011	JN416770	(NCBI, <i>et al.</i> , 2009)
N	USA	<i>Glycine max</i>	2000	D00507.2	(Eggenberger, <i>et al.</i> , 2008)
G1	USA	<i>Glycine max</i>	2003	FJ640977	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
G3	USA	<i>Glycine max</i>	2003	FJ640978	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
G4	USA	<i>Glycine max</i>	2003	FJ640979	(Seo, J.-K., Ohshima, <i>et al.</i> , 2009)
VA2	USA	<i>Glycine max</i>	1999	AF200582	(NCBI, <i>et al.</i> , 2009)
IL1	USA	<i>Glycine max</i>	1999	AF200579	(NCBI, <i>et al.</i> , 2009)
UA	Ukraine	<i>Glycine max</i>	2011	JF803911	(NCBI, <i>et al.</i> , 2009)
CABMV-z	Zimbabwe	<i>Cowpea</i>	2002	AF348210	(Mlotshwa, <i>et al.</i> , 2002)

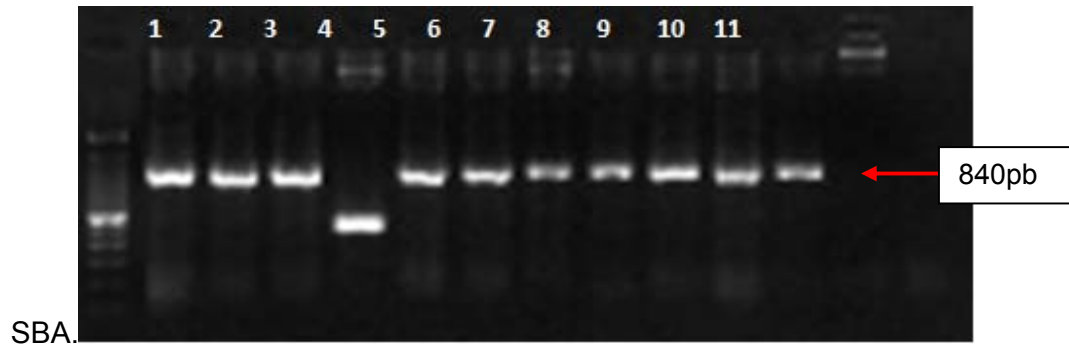
5.3 Resultados y discusión

Para el análisis de diversidad genética se obtuvieron varios aislamientos procedentes de cultivos de Cundinamarca y Boyacá. Adicionalmente, se evaluaron 50 muestras tomadas de diferentes partes del país: 6 Huila, 12 Boyacá, 6 Cali, 10 Antioquia, 4 del Tolima, 4 de La Vega. Sin embargo solo se encontraron plantas infectadas en Cundinamarca y un aislamiento en Boyacá, posiblemente porque la mayor producción reside en Cundinamarca. En total se analizaron 27 aislamientos de los cuales 7 aislamientos fueron secuenciados para el gen P1 y 20 aislamientos para el gen CP. En cada caso se secuenciaron 5 clones por aislamiento. La Figura 5.1 muestra los productos de PCR obtenidos con primers de genes P1 y CP.

Figura 5-1: Productos de PCR obtenidos para genes P1 (A) y CP (B). Electroforesis en gel de agarosa 1.5%.



La presencia de los insertos CP y P1 de los clones, fue confirmada por medio de PCR con los primers específicos (Figura5-2).

Figura 5-2: Verificación del inserto de CP para 11 clones de

CP es el gen más frecuentemente seleccionado para estudios de diversidad potiviral. Su porción 3' ha contribuido a la dilucidación de la variabilidad potiviral en varios virus de esta familia. Incluso la comparación de aminoácidos de CP permite discriminar entre cepas y especies.

En cuanto a la proteína codificada por el gen P1, es un factor de patogenicidad y supresor del silenciamiento post-ranscripcional, es una proteasa ubicada en extremo 5' del genoma potiviral. No es requerido para la infectividad pero si para el incremento y replicación del virus.

Las secuencias nucleotídicas de los clones del gen CP presentaron una máxima identidad del 97 %, y las secuencias de P1 del 96% con secuencia de SMV depositadas en el Gen Bank (BLASTn) (NCBI, *et al.*, 2009).

La matriz de distancia presentada en la Tabla 5-3 muestra las distancias entre pares de aislamientos a partir de las secuencias del gen P1. Los valores presentados por debajo de la diagonal corresponden a distancia genética y por sobre la diagonal se presentan los valores de error estándar. Los valores bajos de error estándar indican que los valores de distancia se encuentran en rangos estrechos. La distancia más alta se presenta entre el grupo externo *Aphid borne mosaic virus* con respecto a los demás, el cual es un potyvirus que se encuentra infectando otras Pasifloras en otros países. Por otra parte las distancias genéticas más altas se presentaron entre aislamientos de Colombia que están infectando *P. edullis* Sims. con respecto a los aislamientos de Corea, Canadá y Estados Unidos que se encuentra infectando soja. La distancia entre estos grupos es

aproximadamente 0,5, mientras que las distancias dentro del grupo es cercana a cero. Esto sugiere una estructura genética asociada a origen geográfico de los aislamientos, y que es independiente de la planta hospedante.

Un trabajo previo mostro clusters de aislamientos de SMV sin importar el hospedante como *Passiflora flavicarpa* (maracuyá) y *Passiflora edulis* (gulupa) (Camelo García, 2010). Aunque no se encuentran reportes específicos en otras pasifloras, en el 2008 se encontraron variaciones nucleotídicas y alta recombinación en las secuencias del gen CP de SMV infectando *Pinella ternata* (Sun, *et al.*, 2008). Se encontraron regiones del gen CP con mayor variabilidad hacia la parte N-terminal y hacia el “core” de las secuencias. Adicionalmente, las agrupaciones filogenéticas de la secuencias en CP revelan que la alta variación de SMV estaría sometida a presión de selección de factores ambientales, vector y hospedero (Sun, *et al.*, 2008).

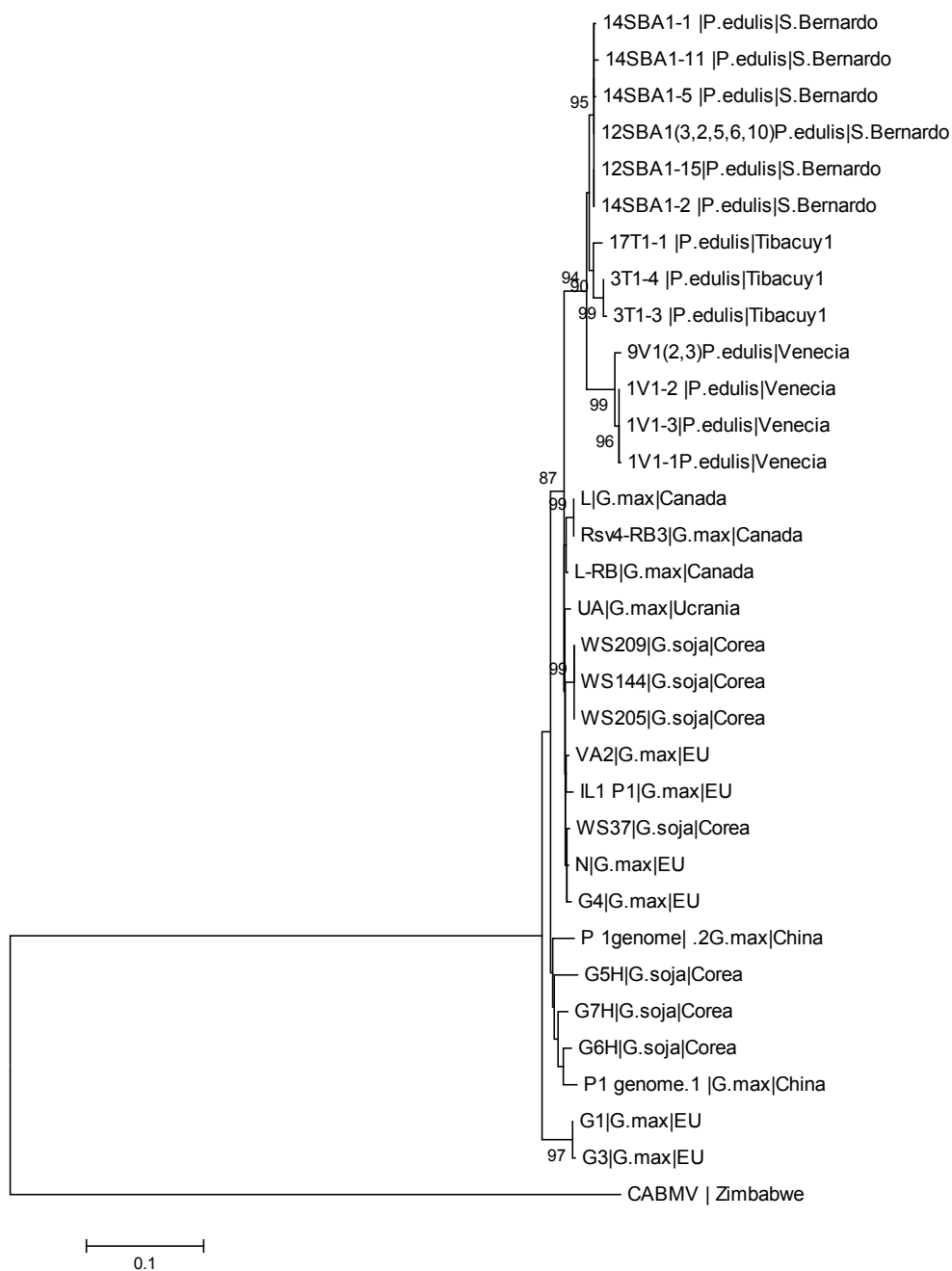
En cuanto a los métodos de análisis filogenético se observa que por los tres métodos de reconstrucción evolutiva (máxima verosimilitud, Neighbor-joining y máxima parsimonia) forman dos clúster principales, uno de secuencias de SMV infectando *Glycine max.* y *Glycine soja* en los países de Corea, E. U., Canadá y Ucrania y el otro clúster incluye los aislamientos de Colombia en gulupa. Este tipo de agrupamiento es similar al reportado en infecciones de SMV en *Pinella ternata* comparado con infecciones en *Glicina* spp. (Sun *et al.*, 2008)

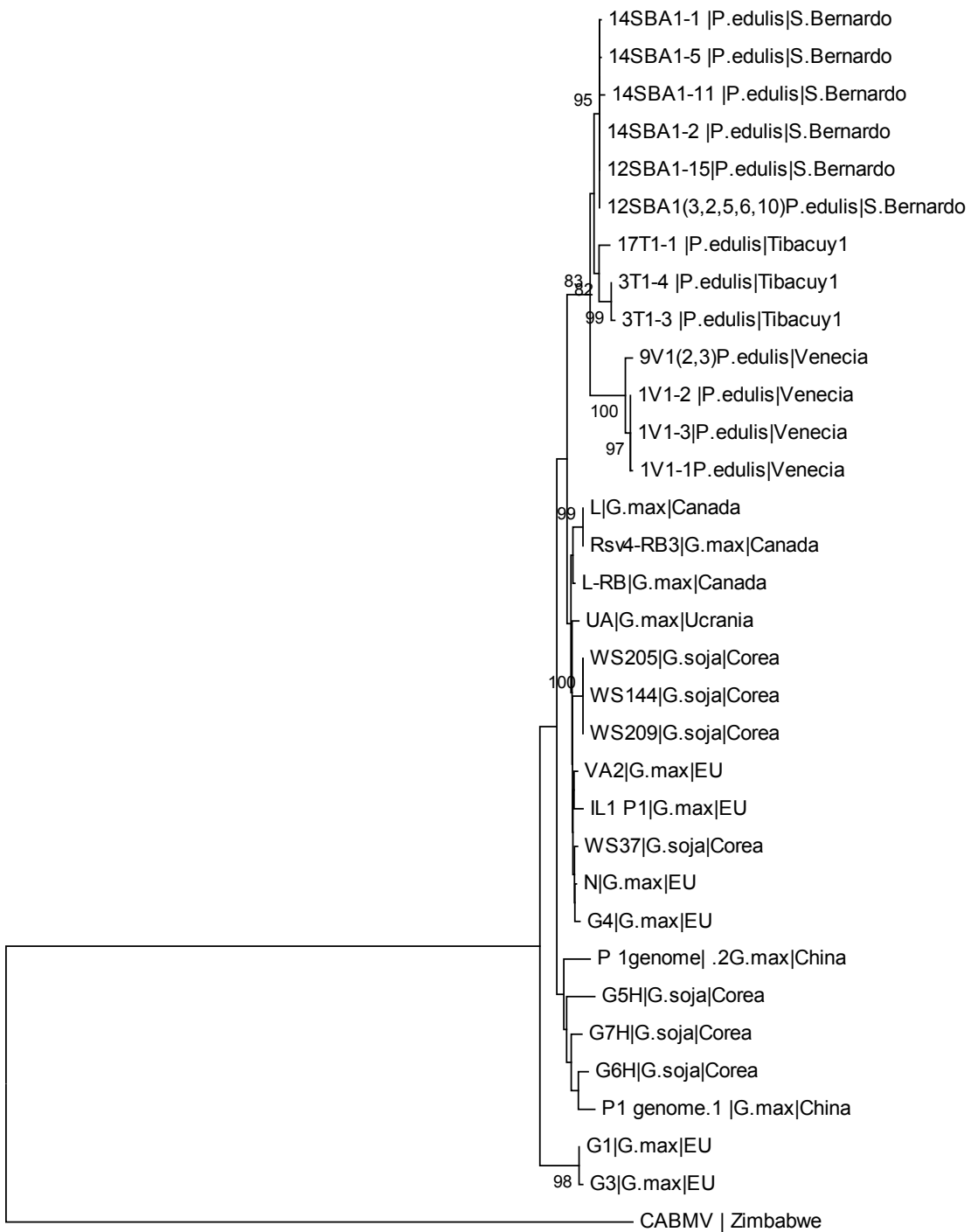
Seo en el 2009 reportó una diversidad nucleotídica mas alta (con respecto a los demás genes) para el gen P1 en aislamientos de *G.max*, lo cual es una ventaja en el momento de analizar patrones de diversidad ya que como se puede observar en este estudio, se logra una buena separación de las poblaciones. Los arboles filogenéticos obtenidos mediante los tres algoritmos a partir de secuencias del gen P1, muestran el agrupamiento de aislamientos asociado a localidad geográfica dentro de un grupo monofilético de Colombia (Cundinamarca). Este gen es tan variable que la distinción de agrupaciones dentro del grupo Colombiano se observan hasta por localidades.

Un trabajo previo mostró que los aislamientos colombianos del SMV, en el cual se estudian relaciones evolutivas a partir de secuencias del gen CI, mostró la definición de clusters con respecto a su origen geográfico y con independencia de la planta hospedera infectada (Camelo García, 2010). Por lo tanto, se recomienda ampliar el análisis de más secuencias de P1 y provenientes de otras especies infectadas por SMV.

Es necesario aclarar que aunque se encontró una muestra de maleza infectada por SMV, mediante RT-PCR de los genes CP y P1, no fue posible secuenciar estos productos debido a su baja concentración de las bandas para la ligación.

Figura 5-3: Árboles filogenéticos del gen P1 de *Soybean mosaic virus* de acuerdo a los siguientes algoritmos: A) máxima verosimilitud, B) Neighbor- joining C) Máxima Parsimonia. Modelo de substitución kimura-2 parámetros. Entre paréntesis los clones con distancia genética entre ellos de 0. Bootstrap de 1000 replicas.





0.1

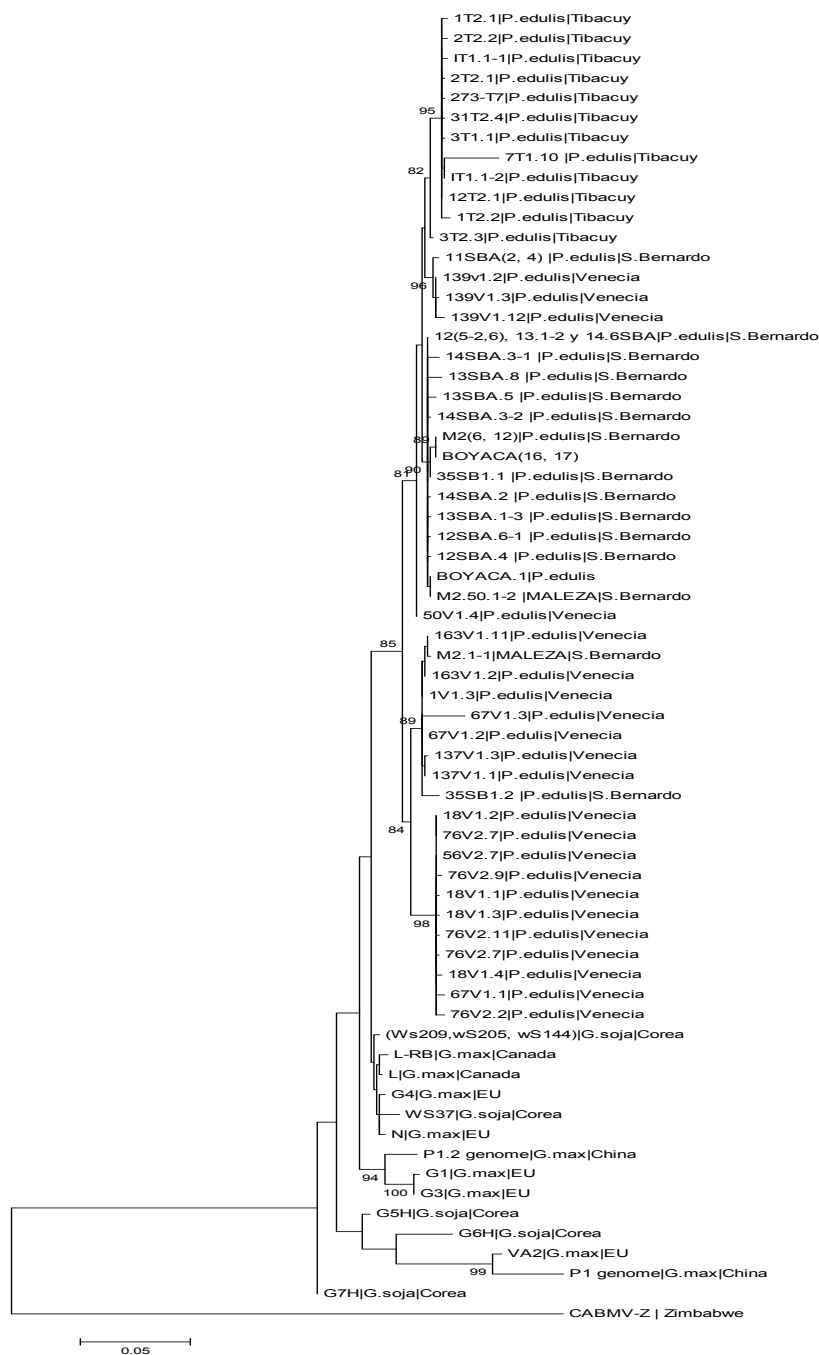
B

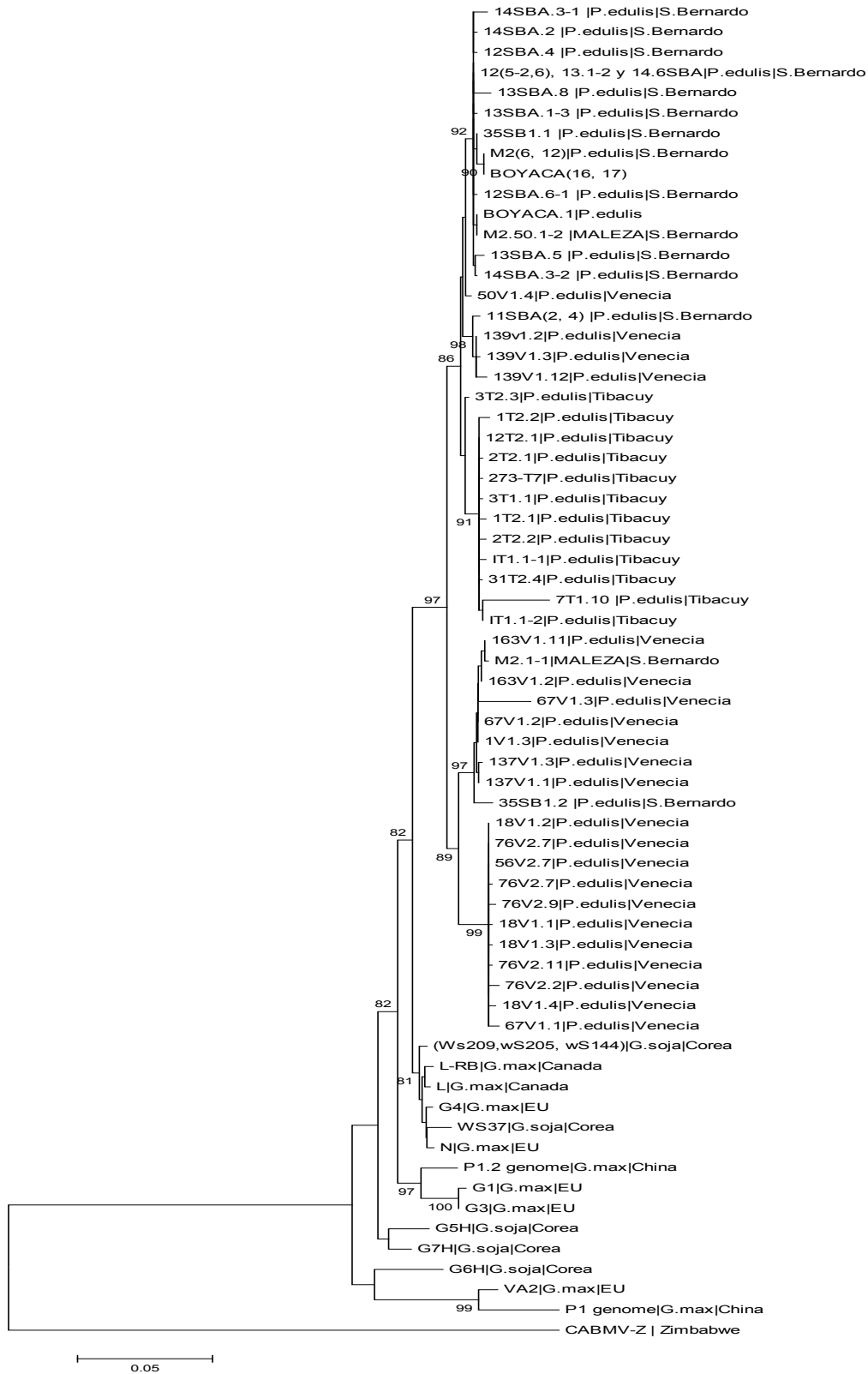


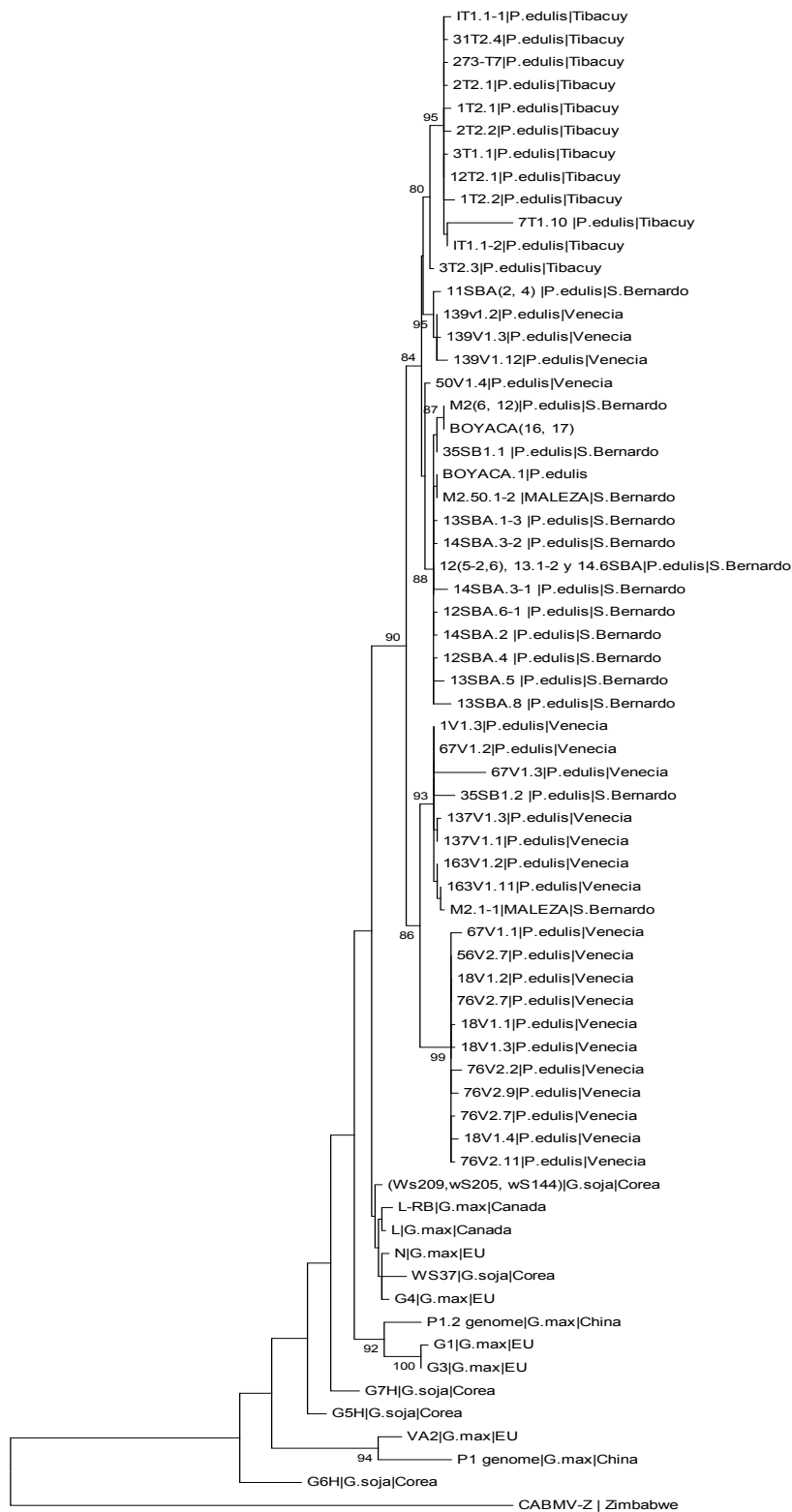
Por otra parte CP es un gen evolutivamente conservado en el genoma SMV infectando Soya, con un valor de diversidad nucleotídica de 0.0085 ± 0.0027 (error estándar) (Seo, J.-K., Ohshima, *et al.*, 2009) Por lo que este un gen es un candidato ideal para la detección de SMV, Otro gen reportado como altamente conservado es CI en el que se le reporto una diversidad nucleotídica del 0.0306 ± 0.0043 por Seo et al, 2009 y del $0,0139 \pm 0,0029$ (\pm error estándar) por Camelo en el 2011 el cual es un gen de 3000pb que traduce a una proteína esencial como son los cuerpos de inclusión.

En este estudio se analizaron secuencias de CP que es un gen que traduce a una proteína de aproximadamente de 927pb. Con ayuda de la matriz de distancia se identificaron las secuencias que reportaban cero y que por lo tanto indicaban que eran exactamente iguales. Estas secuencias fueron agrupadas en una secuencia consenso ya que no aportan información al análisis (Anexo: I distancias CP). Las agrupaciones formadas en los arboles del gen CP a comparación con los de P1, son más sustentadas, debido a que la región cistronica P1 es más variable que CP

Figura 5-4: Árbol filogenético del gen CP de *Soybean mosaic virus* de acuerdo a los siguientes algoritmos: A) máxima verosimilitud, B) Neighbor joining C) Máxima Parsimonia. Modelo de sustitución kimura-2 parámetros. Entre paréntesis los clones con distancia genética entre ellos de 0. Bootstrap de 1000 replicas.







C

El presente estudio permitió encontrar una alta diversidad del gen P1 y CP aportada por las secuencias por los aislamientos SMV colombianos, puesto que se encontraron diversidades mucho mayores a las reportadas previamente (Seo *et al.* 2009). Además se observaron en las matrices de distancia y en los árboles que las secuencias colombianas formaban un clúster independiente.

Tabla 5-4: Diversidad nucleotídica de las secuencias de P1 y CP de *Soybean mosaic virus* reportadas en este estudio y por (Seo, J.-K., Ohshima, *et al.*, 2009)

Región genómica	Diversidad nucleotídica							
	Secuencias de este estudio					Reportado		
	D	dN	dS	dN/dS	d	dN	dS	dN/dS
P1	0,041 ± 0,004	0,04 ± 0,005	0,034 ± 0,006	0,802	0,0211 ± 0,0037	0,0234 ± 0,0030	0,0841 ± 0,0081	0,2788
CP	0,035 ± 0,003	0,016 ± 0,004	0,05 ± 0,005	0,0825	0,0085 ± 0,0027	0,0049 ± 0,0014	0,1478 ± 0,0143	0,0329

d: diversidad nucleotídica estimada por dos parámetros de Kimura; dN y dS: diversidad nucleotídica a posiciones no sinónimas y sinónimas estimada por el método de Pamilo-Bianchi, valores de media ± error estándar (SNAP HIV)

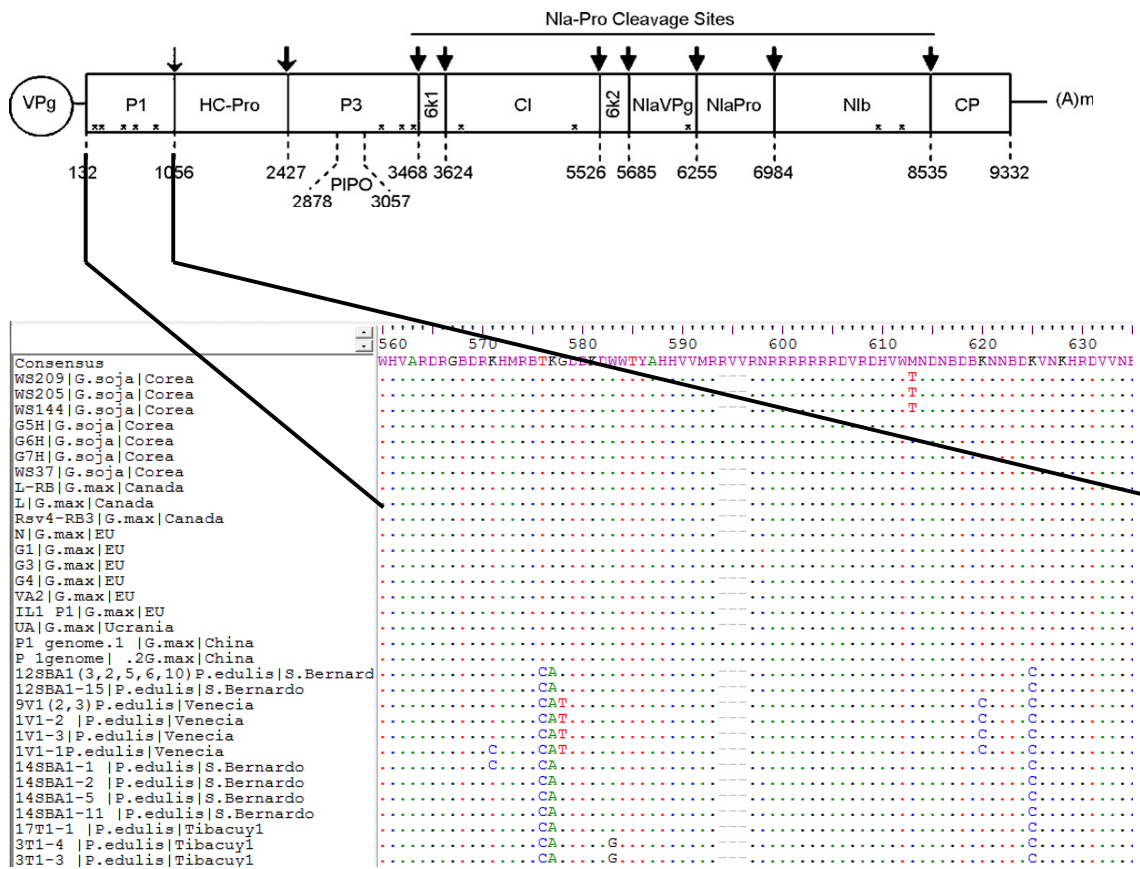
El gen P1 presenta una diversidad genética más alta que CP principalmente porque se presenta una delección de un triplete de nucleótidos que correspondería a la ausencia de un ácido glutámico (Figura 5-5). Esto podría tener implicaciones en la conformación de la proteína P1 sin llegar a ser letal, pues no modifica el marco de lectura. Por el contrario el gen CP no presenta delecciones o inserciones, solo cambios nucleotídicos (Figura 5-5)

P1, P3 y el dominio N-terminal de CP son la regiones genómicas más variables del genoma de potyvirus (Aleman-Verdaguer, 1997). El presente estudio muestra alta diversidad del gen P1 y aumento en el valor de diversidad del CP con respecto al

previamente reportado. Adicionalmente es notable la baja variabilidad entre aislamientos de una misma localidad (matriz de distancias).

Se han reportado diferentes variaciones de secuencias en el extremo N-terminal del gen CP llamadas intrasecuencias o intervariedades de SMV infectando *Pinellia ternata*, lo que genera en los árboles filogenéticos el agrupamiento de aislamientos en relación con hospedero y por regiones geográficas (Sun, *et al.*, 2008).

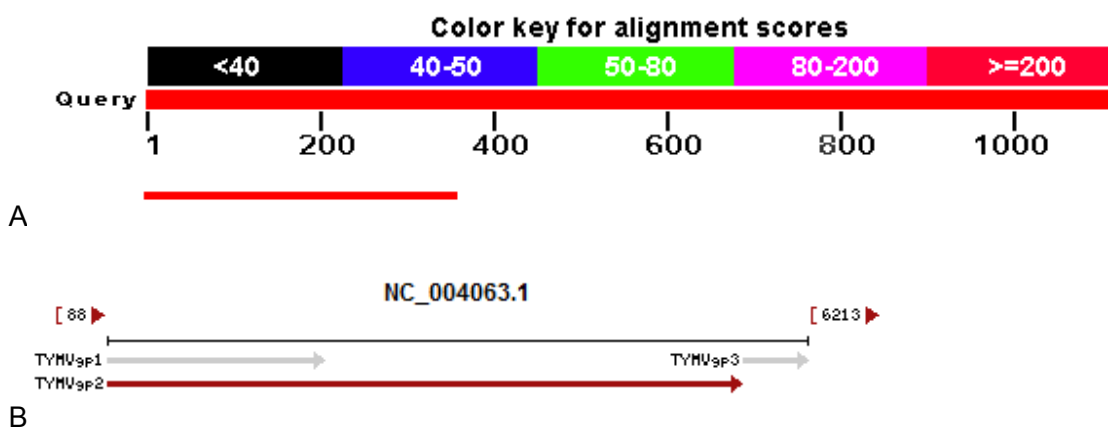
Aunque el presente trabajo no evaluó la presencia de áfidos en las plantaciones de gulupa, es un hecho que estos insectos cumplen un importante papel en la transmisión del SMV de manera no persistente. *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* constituyen un cuello de botella durante la transmisión horizontal de *Cucumber mosaic virus*, ya que contenían menos mutantes que el inoculo original (Ali *et al.*, 2006). Este es solo un ejemplo de la importancia de vectores virales sobre la estructura genética poblaciones de virus de RNA .

Figura 5-5: Secuencias del gen P1, presentando delección/inserción en la posición 593.

El aislamiento 12T2 presentó una secuencia inusual en el gen CP porque alinea con *Passion fruit yellow mosaic virus* con una identidad máxima del 89% con un porcentaje de cubrimiento de la longitud del 25% (Figura 5-6 a). Con respecto al fragmento amplificado con primers P1, presenta una identidad del 70% y un porcentaje de cubrimiento del 36% con *Turnip yellow mosaic virus* (Figura 5-6 b). *Passion Fruti yellow mosaic virus* solo tiene una secuencia reportada en Gen Bank procedente de un aislamiento de Cali Colombia (Morales, *et al.*, 2002). Estos virus pertenecen al género Tymovirus con genoma RNA de cadena sencilla. Para considerar la hipótesis de que el genoma del aislamiento 12T2 ha desarrollado un evento recombinación es necesario obtener más secuencias tanto del aislamiento colombiano como depositadas en GenBank para estas especies. Otro aislamiento del mismo cultivo y del mismo muestreo (9T2) presentó las mismas características, el amplificado con primer P1 tiene una alineamiento con *Passion fruit yellow mosaic virus* con un porcentaje de identidad del 89

% y de cubrimiento del 32%. El amplificado de CP de 9T2 alinea con *Turnip yellow mosaic virus* con un porcentaje de identidad máximo del 70% con un porcentaje de cubrimiento del 56%

Figura 5-6: Alineamientos encontrados por Blastn para el aislamiento 12T2 A. Primers CP con *Passion fruit yellow mosaic virus* B. Amplificado con primers P1 con *Turnip yellow mosaic virus*



(NCBI, *et al.*, 2009)

Infección de *Passiflora* spp. Con *Passion fruit yellow mosaic virus* (PaYMV) ha sido solo reportado en Brasil y Colombia (Fischer & Rezende, 2008). Las plantas infectadas exhibían características como mosaico amarillo, nervadura amarilla y arrugamiento en las hojas. (Crestani, *et al.*, 1986). Allí se describieron diferentes *Passifloraceas* que fueron inoculadas mecánicamente con PaYMV y presentaron los mismos síntomas.

Según Morales *et al.* en el 2002 los aislamientos Colombianos fueron transmitidos a tres especies de *Physalis*. Este virus (PaYMV) es transmitido por un insecto *Diabrotica speciosa*, transmitido mecánicamente y no por semillas, y se encuentra reportada infectando *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Su genoma es de RNA cadena sencilla aproximadamente de 2 Kb, es unipartita, su replicación se realiza en asociación con los cloroplastos. Su proteína de corte se traduce posiblemente en el citoplasma (Brunt, A., *et al.*, 1986). Por otra parte *Turnip yellow mosaic virus* es un tymovirus que infecta *Brassica* spp y *Cardamine lilaciana* produciendo aclareamiento de la vena y intomas de mosaico, entre las especies susceptibles se encuentra *Glycine max* y entre las no

susceptibles se encuentra *Phaseolus vulgaris* y *Chenopodium quino*.(Brunt, A. A., et al., 1996)

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La detección por medio de técnicas serológicas (ELISA), permitió evaluar la incidencia de *Soybean mosaic virus* en los cultivos de gulupa de Cundinamarca. En algunos casos se detectaron muestras positivas para potyvirus y no para SMV. Esto sugiere la presencia de otros potyvirus en los cultivos de gulupa.

La incidencia del SMV en plantaciones de gulupa aumento de 65,64% a 85,33% en Venecia, y de 24,05% a 51,89% en Tibacuy. Factores ambientales como temperatura y humedad relativa pueden modificar la incidencia de *Soybean mosaic virus* en cultivos de gulupa.

Análisis de reconstrucción evolutiva a partir de secuencias de P1 y CP del SMV reveló la diferenciación de clusters asociados a origen geográfico. Dentro del clúster de aislamientos colombianos de SMV se presentaron subgrupos relacionados con las localidades de origen.

Las secuencias de los genes P1 y CP de los aislamientos colombianos de SMV exhiben diferencias nucleotídicas que aumentan los valores de diversidad previamente reportados.

6.2 Recomendaciones

Continuar con el estudio entomológico del comportamiento de áfidos en los cultivos de gulupa, lo cual ayudaría al entendimiento de la transmisión y su papel en la estructura de poblaciones del SMV

Ampliar estudios de detección de infección por SMV en malezas asociadas al cultivo de gulupa.

A. Anexo: Elisa potyvirus kit Bioreba

1. Homogenizar las muestras en radio de 1:50 (w/v) con buffer de extracción (PTA) frescamente diluido. Resuspender los controles liofilizados en 2.5 ml del buffer de extracción. Distribuir los extractos y controles en porciones de 200µl en cada pozo.

Duplicar los pozos por muestra testada.

Cubrir con parafilm e incubar toda la noche a 4°C.

2. Lavar 4 veces con PBST.
3. Diluir IgG 1:1000 en buffer conjugado (para esto se toman 20 µl en 20 ml de buffer conjugado). Cubrir cada pozo con 200 µl con este anticuerpo e incubar a 2h a 37°C.
4. Lavar 4 veces con PBST (1x).
5. Diluir el anticuerpo antimouse AP 1:1000 en buffer conjugado y dispensar 200 µl por pozo. Cubrir el plato como se describió e incubar a 2h por 37°C.
6. Lavar 4 veces con PBST.
7. Adicionar 200 µl de p-NPP por pozo e incubar por 30-120 min a temperatura ambiente. Esta solución se prepara disolviendo 1 tableta de 20 mg en 20 ml de buffer substrato.
8. Leer los resultados a 405 nm. NOTA: leer cada media hora y escoger la mejor curva

B. Anexo: DAS-ELISA SMV Agdia

1. Preparar una caja húmeda por contener el plato, para ello se le colocó una toalla absorbente con agua.
2. Diluir el anticuerpo de cubrimiento 1:200 en buffer de cubrimiento (50 μ l en 10 ml).
3. Colocar 100 μ l del preparado del anticuerpo de captura en cada pozo.
4. Incubar el plato por no más de 24 horas a 4°C
5. Lavar el plato con PBST 1X. 3 veces.
6. Preparar las muestras en una proporción de 1:10 en buffer de extracción, de tal forma que se adicione 100 μ l en cada pozo y por duplicado de cada muestra.
7. Incubar el plato por 2 hora en temperatura ambiente en la caja húmeda.
8. Lavar el plato 7 veces con PBST 1X y rápidamente eliminar la solución
9. Preparar la enzima conjugada en una proporción 1:200 en buffer ECI (buffer conjugado para la enzima) para adicionar 100 μ l en cada pozo e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
10. Preparar la solución PNP 15 minutos antes de adicionarla al plato. Disolver una tableta de 5ml de solución de PNP a una concentración de 1mg/ml en una solución de buffer substrato.
11. Lavar el plato 8 veces con 1X PBST.
12. Adicionar la solución de PNP 100 μ l por pozo.
13. Incubar el plato en una caja húmeda por 60 minutos.
14. Evaluar los resultados a 405nm.

C. Anexo: Extracción con trizol® (modificado)

1. Procesamiento de muestras:

- Las muestras recolectadas consisten en 4 o 5 ramas por plantas
- Se toman nervaduras y corteza verde, se cortan en pequeños pedazos y se llevan a un mortero.
- Se agrega nitrógeno líquido y se macera hasta obtener una consistencia polvosa.

2. Homogenización:

- Pesar 100mg de muestra y agregar 1 ml de Trizol®
- Invertir el tubo varias veces

3. Separación:

- Mantener las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos
- Adicionar 200 µl de cloroformo.
- Agitar suavemente por 15 segundos
- Mantener por 2-3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente

4. Precipitación de RNA:

- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo
- Adicionar 500 µl de isopropanol.
- Invertir el tubo suavemente.
- Mantener a temperatura ambiente por 10 minutos.

5. Lavado:

- Remover el sobrenadante

- Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75%
- Mezclar con vortex
- Centrifugar a 7500g por 5 minutos a temperatura ambiente
- Desechar el sobrenadante
- Secar el pellet
- 6. Redisolver:
 - Resuspender en 50 μ l de agua destilada estéril
 - Incubar por 10 min a 56-60°C en baño serológico

D. Anexo: 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. Si 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 LiCl2 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 50 µl 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

- H₂O 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

- H₂O 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

- H₂O 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 ₂ SO ₃	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 β -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.

E. Anexo: RT-PCR Retrotranscripción

Reactivo	Ci	Cf
Buffer	5x	1x
DTT	0.1M	10mM
Primer reverse	25 μ M	0.5 μ M
dNTPS	25mM	0.5mM
RNAse OUT	40U/ μ l	0.4 U/ μ l
M-MLV	200U/ μ l	4U/ μ l
H2O	-	-
RNA	-	-

Procedimiento

1. Agregar en un tubo eppendorf de 200 μ l, 5 μ l de RNA.
2. Denaturar a 95 C por 5 minutos
3. Llevar inmediatamente a hielo por 3 minutos.
4. Agregar 20 μ l l de la mezcla de reacción RT (preparada de acuerdo a la tabla anterior).
5. Ejecutar en el termociclador el siguiente programa:
 - 90 minutos a 37°C
 - 10 minutos a 70°C
 - ∞ a 4°C

F. Anexo: PCR Reacción

1. Adicionar en un tubo eppendorf de 200 μ l, 5 μ l de cDNA.
2. Agregar 20 μ l de la mezcla de reacción PCR

Reactivo	Ci	Cf
Buffer	10x	1x
MgCl ₂	50mM	2,5mM
Primer reverse	25 μ M	0,5 μ M
Primer forward	25 μ M	0,5 μ M
dNTP	25mM	0,5mM
<i>Taq</i> DNA polimeras	5U/ μ l	0,04U/ μ l
H ₂ O	-	
cDNA	-	

CP-SMV

5 minutos a 94°C
35x 30'' a 94°C
1 `a 52 °C
1 `a 72°C
15 minutos a 72 °C

P1-SMV

5 minutos a 94°C
35x 30'' a 94°C
1 `a 52 °C
1 `a 72°C
15 minutos a 72 °C

G. Anexo: Gel electroforesis 1,5% agarosa

1. Agregar en un erlenmeyer, 1,5 g de agarosa y 100 ml de TAE 1X. Disolver calentando.
2. Adicionar 4 μl de bromuro de etidio (0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y homogenizar la mezcla.
3. Servir en la mezcla y dejar que gelifique.
4. Sembrar las muestras dentro de los pozos, mezclando $\sim 5 \mu\text{l}$ de los productos de PCR con $\sim 5 \mu\text{l}$ de buffer carga 2X. En el primer pozo sembrar 1 μl del marcador de peso (100 bp DNA ladder de Invitrogen.)
5. Correr el gel en la cámara de electroforesis horizontal con TAE 1X, a 60V durante 60 -90 minutos.
6. Al finalizar el tiempo de corrido, retirar el gel y visualizar en el documentador Gel DocTM XR (Bio-Rad) con luz ultravioleta.
7. Fotografiar y guardar la imagen en el equipo.

H. Anexo: Clonación

PURIFICACION

1. Se adiciona 3 Volúmenes del peso del buffer del gel solubilization
2. Se adiciona 1 Volumen de Isopropanol.
3. Se centrifuga a 12000 g por 1 min.
4. Se elimina el sobrenadante..
5. Se adiciona 600µl a la columna wash buffer (W1)
6. Se centrifuga 2min a 12000g.
7. Se adiciona buffer elución 50µl en la columna en tubos 1,5ml
8. Se incuba por 30 min.
9. Centrifugar 12000g a 1 min
10. Se almacena a -20°C

LIGACION

- Producto ADN purificado..... 4µl
- Solución salt 1µl
- H₂O Hasta 5µl
- Topovector 1µl

La mezcla de ligación se realiza en tubos de PCR se centrifuga, todo se hace por separado y se dej a 4°C toda la noche

Luego se prepara 2 disoluciones por cada muestra. 4x20=8 por cada uno me gasto 20ml por caja

1. Se adiciona ampicilina par llegar a una concentración final de 1µl/ml a un medio de agar solido, antes de servir y . **X-Gal. 40mg/ml**

TRANSFORMACION

- El vial de células se descongelan en hielo.
- Se adiciona 2µl de producto de ligación a un vial con células competentes.
- Se mezcla en forma circular dando giros.
- Incubar en hielo por 30 min
- Choque térmico 42°C, 30 segundos (baño maría) Inmediatamente pasar a hielo
- Agregar 250 µl de medio líquido 2XYT sin ampicilina.
- Incubar en agitador orbitador orbital 37°C – 60 min. A 225rpm
- Sembrar en el medio solido pro duplicado, las células de paso anterior
- Dejar enfriar a temperatura ambiente para que se adhiera
- Incubar a 37°C toda la noche.
-

EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO

Minipreparación

1. En un tubo tapa rosca medir 3ml de medio y colocarlos con una pipeta de 5ml. Medio (l) con ampicilina de (50µg/ml) para 1µg/ml)
2. Marcar los clones con un circulo. Se toman 10 clones de cada caja, son totalmente blancas

3. Picar las colonias con palillo estéril con pinzas y dejar el palillo en el tubo y se flamea y se cierra.
4. Dejar en agitador orbital 220 rpm 37°C toda la noche en gradilla
5. Transferir a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifuga a 12000 rpm x 2 min, boto el sobrenadante, y adiciono la otra mitad y centrifugo.
6. Almacenar a -20°C toda la noche o todo el fin de semana.
7. Agregar el pellet 210µl de STET y resuspender hasta disolver el pellet con vortex diruptor por 5 a 10min Adiciono 15µl liozima (10µg/µl).
8. 50 segundos en ebullición en biker con H2O
9. Centrifugar 20 min a 14000 rpm (25 min a 13000 rpm)
10. Remover el pellet.
11. Adicionar 150µl de acetato de amonio 7,5 M. Ph7 y 600µl de Etanol
12. Guardar -20°C tod la noche o -80°C 2h
13. Centrifugar 20 minutos a 13000 rpm
14. Eliminar sobrenadante, secar pellet
15. Resuspender en 50µl de H2O MQ estéril y aumento a 60°C en baño maria por 10 min.
16. Almacenar a -20°C

PURIFICACION

1. Tomar 50µl (en los mismos tubos) de MINIPREP (DNA plasmidico)
2. Adicionar 0,2µl de RNAasa A (nevera -20°C o 40°C)
3. Incubar 37°C durante 2 horas a baño maría

4. Aumentar o completar el volumen a 200µl de H₂O MQ
5. Agregar 200µl de H₂O MQ
6. Mezclar con vortex por 20 segundos
7. Centrifugar 12000 rpm por 7 min
8. Tomar la fase acuosa y colocó en un tubo nuevo de 1.5ml
9. Adicionar 2 vol. de Etanol 95% y 1/10 de volumen Acetato de Sodio 3M
10. Mantener a -20°C durante toda la noche.
11. Centrifugar a 12000 rpm x 15 minutos.
12. Eliminar sobrenadante y se lava con etanol al 70% 800µl
13. Centrifugar a 1200 rpm x 15 min
14. Descartar sobrenadante y secar el pellet
15. Resuspender en H₂O estéril en un volumen menor.

Bibliografía

- Adams, M. J., & Antoniw, J. F. DPVweb: a comprehensive database of plant and fungal virus genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl 1), D382-D385.
- Agrios, G. (2001). *Fitopatología*. Mexico: UTEHA-Noriega.
- Albiach-Martí, M. R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M. E., Shanker, S., et al. (2000). Sequences of Citrus Tristeza Virus Separated in Time and Space Are Essentially Identical. *Journal of Virology*, 74(15), 6856-6865.
- Antoniw, J., & Adams, M. (noviembre 2011). Descriptions of Plant Viruses. Retrieved Mayo 17 2010, 2010, from <http://www.dpvweb.net/index.php>
- Arif, M., & Hassan, S. (2002). Evaluation of Resistance in Soybean Germplasm to Soybean Mosaic Potyvirus under Field Conditions *Journal of Biological Sciences*, 2, 601-604.
- Austin L, H. (2009). Small effective population sizes and rare nonsynonymous variants in potyviruses. *Virology*, 393(1), 127-134.
- Benschler, D., Pappu, S. S., & C.L.Niblett. (1996). A strain of Soybean Mosaic Virus Infecting *Passiflora* spp. in Colombia. *Plant Dis.*, 80, 258-262.
- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A., Watson, L., & Zurcher, a. E. (1986). Plant Viruses Online. Retrieved 23 Noviembre de 2011: <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/refs.htm#bosqib86>
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Zurcher, E. J. (1996). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Retrieved mayo 3, 2010, from <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Camelo García, V. M. (2010). *Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de Gulupa (Passiflora edulis Sims) en la región del Sumapáz (Cundinamarca) / Detection and identification of pathogenic viruses Gulupa crops (Passiflora edulis Sims) in the region of Sumapaz (Cundinamarca)*. Unpublished Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- Crestani, O., Kitajuma, E., & Lin MT, M. V. (1986). Passion fruit yellow mosaic virus, a new Tymovirus found in Brazil. *Phytopathology*, 76.
- Chang, S., Puryear & Cairney. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter* 11, 113-116.
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). Passiflora: a review update. [doi: 10.1016/j.jep.2004.02.023]. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23.

- Domier, L. L., Shaw, J. G., & Rhoads, R. E. (1987). Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology*, 158(1), 20-27.
- Eggenberger, A. L., Hajimorad, M. R., & Hill, J. H. (2008). Gain of Virulence on Rsv1-Genotype Soybean by an Avirulent Soybean mosaic virus Requires Concurrent Mutations in Both P3 and HC-Pro. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 931-936.
- Fischer, I., & Rezende, J. (2008). Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technology*, 19.
- Gagarinova, A., Babu, M., Stromvik, M., & Wang, A. (2008). Recombination analysis of Soybean mosaic virus sequences reveals evidence of RNA recombination between distinct pathotypes. *Virology Journal*, 5(1), 143.
- Gagarinova, A. G., Babu, M., Poysa, V., Hill, J. H., & Wang, A. (2008). Identification and molecular characterization of two naturally occurring Soybean mosaic virus isolates that are closely related but differ in their ability to overcome Rsv4 resistance. *Virus Research*, 138(1-2), 50-56.
- García-Arenal, F., Fraile A., and Malpica, J.M.. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 39: 157-186
- Gómez, C., Dueñas, J., Garzón, M. Medina, J., Moreno, Z. Perdomo, C., Pizarro, J., Villarreal, A. (2006). Perfil del mercadeo de bienes agropecuarios y agroindustriales en Alemania. *Perfil de Mercadeo*, 27.
- Harlow E., & Lane D. (1988): Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory
- Herbario nacional Colombiano. (2006). Instituto de ciencias Naturales.
- Hernández, A., & Bernal, R. (2000). Lista de especies de passifloraceae de Colombia. *NBiot colombiana*, 0003.
- Hooks, C. R. R., & Fereres, A. (2006). Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses: A review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus Research*, 120(1-2), 1-16.
- Jayaram, C., Hill, J. H., & Miller, W. A. (1992). Complete nucleotide sequences of two soybean mosaic virus strains differentiated by response of soybean containing the Rsv resistance gene. *Journal of General Virology*, 73(8), 2067-2077.
- Jimenez N., Y. (2006). *EL CULTIVO DE LA GULUPA Passiflora edulis SIMS*. Unpublished Universitario Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Lebart, L., Monriveau, A., & Warwick, K. (1984). *Multivariate descriptive statistical analysis* (Vol. 1). New York.
- Liu, X., Jin, J., Wang, G., & Herbert, S. J. (2008). Soybean yield physiology and development of high-yielding practices in Northeast China. *Field Crops Research*, 105(3), 157-171.
- Lu, X., Robertson, A. E., Byamukama, E., & Nutter, F. W. (2010). Prevalence, Incidence, and Spatial Dependence of Soybean mosaic virus in Iowa. *Phytopathology*, 100(9), 931-940.

- Matthews, R. E. F., & Hull, R. (2002). *Matthews' plant virology* (4th ed.). San Diego: Academic Press.
- Mlotshwa, S., Verver, J., Sithole-Niang, I., Van Kampen, T., Van Kammen, A., & Wellink, J. (2002). The genomic sequence of cowpea aphid-borne mosaic virus and its similarities with other potyviruses. *Archives of Virology*, 147(5), 1043-1052.
- Mora Hernández, R. (2011). *Análisis epidemiológico de roña en gulupa (Passiflora edulis Sims.) en la región del Sumapaz, Colombia*. Unpublished Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- Morales, F. J., Lozano, I., CastaÑO, M., Arroyave, J., Velasco, A. C., & Varon, F. (2002). Partial Characterization of a Tymovirus Infecting Passion Fruit in Colombia, South America. *Journal of Phytopathology*, 150(4-5), 292-296.
- NCBI, NLM, & NIH. (2009). BLAST. *National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine* Retrieved 20-October del 2011, 2011, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/glance/contact_info.html
- Ocampo, P., Coppens, J., Restrepo, M., & Jarvis, A. (2007). Diversity of Colombian Oassiloraceae: Biography and an update list ofr consevation. *Biota Colombiana*, 45.
- Parrado, R. (2010). Cultivo de San Bernardo. Cundinamarca, Colombia.
- Penyin (2009)
- Peña, D. (2002). *Análisis de datos multivariantes* (Vol. 1). Madrid, España.
- Pérez, O., Coppens, J., Restrepo, M., & Jarvis, A. (2007). Diversity of Colombian Oassiloraceae: Biography and an update list ofr consevation. *Biota Colombiana*, 45.
- Pinzón, I. M. d. P., Fischer, G., & Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana*, 25, 83-95.
- Quevedo, E. (1989). *Análisis de la floración y fructificación bajo tres sistemas de soporte en la gulupa*. . Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Restrepo-Hartwig, M. A., & Carrington, J. C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology*, 66(9), 5662-5666.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seo, J.-K., Lee, H.-G., & Kim, K.-H. (2009). Systemic gene delivery into soybean by simple rub-inoculation with plasmid DNA of a<i>Soybean mosaic virus</i>-based vector. *Archives of Virology*, 154(1), 87-99.
- Seo, J.-K., Ohshima, K., Lee, H.-G., Son, M., Choi, H.-S., Lee, S.-H., et al. (2009). Molecular variability and genetic structure of the population of Soybean mosaic virus based on the analysis of complete genome sequences. [doi: 10.1016/j.virol.2009.07.007]. *Virology*, 393(1), 91-103.
- Seo, J. K., Lee, H. G., Choi, H. S., Lee, S. H., & Kim, K. H. (Marzo 2009). Infectious in vivo Transcripts from a Full-length Clone of Soybean mosaic virus Strain G5H. *The Plant Pathology Journal*, v. 25(1) p. 54-61.

- Sun, H., ShenTu, S., Xue, F., Duns, G., & Chen, J. (2008). Molecular characterization and evolutionary analysis of <i>soybean mosaic virus</i> infecting <i>Pinellia ternata</i> in China. *Virus Genes*, 36(1), 177-190.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., et al. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. [10.1093/emboj/cdg74]. *EMBO J*, 22(3), 633-640.
- Ulmer, T., & MacDougal, J. M. (2004). *Passiflora. Passionflowers of the World*.

LICENCIAS DE SOFTWARE

SADIE

GNU GENERAL PUBLIC LICENSE Version 2, June 1991 Copyright (C) 1989, 1991 Free Software Foundation, Inc. 59 Temple Place, Suite 330, Boston, MA 02111-1307 USA Everyone is permitted to copy and distribute verbatim copies of this license document, but changing it is not allowed. Preamble The licenses for most software are designed to take away your freedom to share and change it. By contrast, the GNU General Public License is intended to guarantee your freedom to share and change free software--to make sure the software is free for all its users. This General Public License applies to most of the Free Software Foundation's software and to any other program whose authors commit to using it (Some other Free Software Foundation software is covered by the GNU Library General Public License instead.) You can apply it to your programs, too. When we speak of free software, we are referring to freedom, not price. Our General Public Licenses are designed to make sure that you have the freedom to distribute copies of free software (and charge for this service if you wish), that you receive source code or can get it if you want it, that you can change the software or use pieces of it in new free programs; and that you know you can do these things. To protect your rights, we need to make restrictions that forbid anyone to deny you these rights or to ask you to surrender the rights. These restrictions translate to certain responsibilities for you if you distribute copies of the software, or if you modify it. For example, if you distribute copies of such a program, whether gratis or for a fee, you must give the recipients all the rights that you have. You must make sure that they, too, receive or can get the source code. And you must

show them these terms so they know their rights. We protect your rights with two steps: (1) copyright the software, and (2) offer you this license which gives you legal permission to copy, distribute and/or modify the software. Also, for each author's protection and ours, we want to make certain that everyone understands that there is no warranty for this free software. If the software is modified by someone else and passed on, we want its recipients to know that what they have is not the original, so that any problems introduced by others will not reflect on the original authors' reputations. Finally, any free program is threatened constantly by software patents. We wish to avoid the danger that redistributors of a free program will individually obtain patent licenses, in effect making the program proprietary. To prevent this, we have made it clear that any patent must be licensed for everyone's free use or not licensed at all. The precise terms and conditions for copying, distribution and modification follow. GNU GENERAL PUBLIC LICENSE TERMS AND CONDITIONS FOR COPYING, DISTRIBUTION AND MODIFICATION 0. This License applies to any program or other work which contains a notice placed by the copyright holder saying it may be distributed under the terms of this General Public License. The "Program", below, refers to any such program or work, and a "work based on the Program" means either the Program or any derivative work under copyright law: that is to say, a work containing the Program or a portion of it, either verbatim or with modifications and/or translated into another language (Hereinafter, translation is included without limitation in the term "modification".) Each licensee is addressed as "you". Activities other than copying, distribution and modification are not covered by this License; they are outside its scope. The act of running the Program is not restricted, and the output from the Program is covered only if its contents constitute a work based on the Program (independent of having been made by running the Program). Whether that is true depends on what the Program does.

1. You may copy and distribute verbatim copies of the Program's source code as you receive it, in any medium, provided that you conspicuously and appropriately publish on each copy an appropriate copyright notice and disclaimer of warranty; keep intact all the notices that refer to this License and to the absence of any warranty; and give any other recipients of the Program a copy of this License along with the Program. You may charge a fee for the physical act of transferring a copy, and you may at your option offer warranty protection in exchange for a fee.
2. You may modify your copy or copies of the Program or any

portion of it, thus forming a work based on the Program, and copy and distribute such modifications or work under the terms of Section 1 above, provided that you also meet all of these conditions: a) You must cause the modified files to carry prominent notices stating that you changed the files and the date of any change. b) You must cause any work that you distribute or publish, that in whole or in part contains or is derived from the Program or any part thereof, to be licensed as a whole at no charge to all third parties under the terms of this License. c) If the modified program normally reads commands interactively when run, you must cause it, when started running for such interactive use in the most ordinary way, to print or display an announcement including an appropriate copyright notice and a notice that there is no warranty (or else, saying that you provide a warranty) and that users may redistribute the program under these conditions, and telling the user how to view a copy of this License (Exception: if the Program itself is interactive but does not normally print such an announcement, your work based on the Program is not required to print an announcement.) These requirements apply to the modified work as a whole. If identifiable sections of that work are not derived from the Program, and can be reasonably considered independent and separate works in themselves, then this License, and its terms, do not apply to those sections when you distribute them as separate works. But when you distribute the same sections as part of a whole which is a work based on the Program, the distribution of the whole must be on the terms of this License, whose permissions for other licensees extend to the entire whole, and thus to each and every part regardless of who wrote it. Thus, it is not the intent of this section to claim rights or contest your rights to work written entirely by you; rather, the intent is to exercise the right to control the distribution of derivative or collective works based on the Program. In addition, mere aggregation of another work not based on the Program with the Program (or with a work based on the Program) on a volume of a storage or distribution medium does not bring the other work under the scope of this License. 3. You may copy and distribute the Program (or a work based on it, under Section 2) in object code or executable form under the terms of Sections 1 and 2 above provided that you also do one of the following: a) Accompany it with the complete corresponding machine-readable source code, which must be distributed under the terms of Sections 1 and 2 above on a medium customarily used for

software interchange; or, b) Accompany it with a written offer, valid for at least three years, to give any third party, for a charge no more than your cost of physically performing source distribution, a complete machine-readable copy of the corresponding source code, to be distributed under the terms of Sections 1 and 2 above on a medium customarily used for software interchange; or, c) Accompany it with the information you received as to the offer to distribute corresponding source code (This alternative is allowed only for noncommercial distribution and only if you received the program in object code or executable form with such an offer, in accord with Subsection b above.) The source code for a work means the preferred form of the work for making modifications to it. For an executable work, complete source code means all the source code for all modules it contains, plus any associated interface definition files, plus the scripts used to control compilation and installation of the executable. However, as a special exception, the source code distributed need not include anything that is normally distributed (in either source or binary form) with the major components (Cuadrado i Benítez et al., iler, kernel, and so on) of the operating system on which the executable runs, unless that component itself accompanies the executable. If distribution of executable or object code is made by offering access to copy from a designated place, then offering equivalent access to copy the source code from the same place counts as distribution of the source code, even though third parties are not compelled to copy the source along with the object code.

4. You may not copy, modify, sublicense, or distribute the Program except as expressly provided under this License. Any attempt otherwise to copy, modify, sublicense or distribute the Program is void, and will automatically terminate your rights under this License. However, parties who have received copies, or rights, from you under this License will not have their licenses terminated so long as such parties remain in full compliance.

5. You are not required to accept this License, since you have not signed it. However, nothing else grants you permission to modify or distribute the Program or its derivative works. These actions are prohibited by law if you do not accept this License. Therefore, by modifying or distributing the Program (or any work based on the Program), you indicate your acceptance of this License to do so, and all its terms and conditions for copying, distributing or modifying the Program or works based on it.

6. Each time you redistribute the Program (or any work based on the Program), the recipient automatically receives a license from the original licensor to copy, distribute

or modify the Program subject to these terms and conditions. You may not impose any further restrictions on the recipients' exercise of the rights granted herein. You are not responsible for enforcing compliance by third parties to this License. 7. If, as a consequence of a court judgment or allegation of patent infringement or for any other reason (not limited to patent issues), conditions are imposed on you (whether by court order, agreement or otherwise) that contradict the conditions of this License, they do not excuse you from the conditions of this License. If you cannot distribute so as to satisfy simultaneously your obligations under this License and any other pertinent obligations, then as a consequence you may not distribute the Program at all.

SPAD 7.0 Licencia Facultad de Matemáticas. Universidad nacional de Colombia. Sede Bogota. <http://www.estadistica.unal.edu.co/>.

Universidad Nacional de Colombia

Carrera 45 No 26-85 - Edificio Uriel Gutierréz

Bogotá D.C. – Colombia

ARGIS

Información de instalación

Nombre del producto: ArcGIS Desktop 10

Versión de lanzamiento: 10.0

Versión del producto: 10.0.0.2414

Carpeta de instalación: C:\Archivos de programa\ArcGIS\Desktop10.0\

Instalado por: Geomatica

Fecha de instalación: 29/07/2010

Hora de instalación: 7:56:38

Imagen de instalación: \\Geomatica10\disco\Desktop\

Usuario actual: Geomatica

Carpeta de datos de la aplicación: C:\Documents and Settings\Geomatica\Datos de programa

Carpeta temporal de sistema: C:\DOCUME~1\GEOMAT~1\CONFIG~1\Temp\

Información de Service Pack

ArcGIS Service Pack: 0 (build 0)

Instalador de ArcGIS Service Pack: N/A

Fecha de instalación de ArcGIS Service Pack: N/A

Hora de instalación de ArcGIS Service Pack: N/A

Estado de ArcGIS Service Pack: N/A

Información de variable de entorno del Administrador de licencias

ARCGIS_LICENSE_FILE: N/A

LM_LICENSE_FILE: 1700@geomatica12

R

R version 2.13.0 (2011-04-13)

Copyright (C) 2011 The R Foundation for Statistical Computing

ISBN 3-900051-07-0

Platform: i386-pc-mingw32/i386 (32-bit)

R es un software libre y viene sin GARANTIA ALGUNA.

Usted puede redistribuirlo bajo ciertas circunstancias.

Escriba 'license()' o 'licence()' para detalles de distribución.

R es un proyecto colaborativo con muchos contribuyentes.

Escriba 'contributors()' para obtener más información y 'citation()' para saber cómo citar R o paquetes de R en publicaciones.

Escriba 'demo()' para demostraciones, 'help()' para el sistema on-line de ayuda, o 'help.start()' para abrir el sistema de ayuda HTML con su navegador.

Bioedit

License Agreement for BioEdit v7.1.3:

BioEdit v7.1.3

copyright (c) 1997-2011, Tom Hall

***** By choosing to install this software you are accepting the terms of this license. If you do not want to accept these

terms, you must not install the software *****

Terms of license:

BioEdit is offered free of charge. BioEdit distributes some government (NCBI, *et al.*) software and is not to be distributed for money by any person for any reason. This installation also contains programs written by other authors and those programs are subject to the copyrights and licenses specified by their authors. Permission is granted to anyone to redistribute BioEdit free of charge, provided that original files are distributed unaltered, but redistribution of applications included in the apps folder may require permission from authors of accessory applications (see accessory application list in the readme file for author information).

** The author makes no guarantee as to the fitness or suitability of this software for any purpose. BioEdit is offered as is and no responsibility will befall the author for any problems caused by or correlated with the use of this software, including, but not limited to, damages, non-suitability, misuse, data loss, or wasted time. **

-