

IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS AGENTES
CAUSALES ASOCIADOS A ENFERMEDADES VIRALES DEL TOMATE DE
ÁRBOL (*Solanum betaceum*) EN CULTIVOS DEL MUNICIPIO DE CÓRDOBA
(NARIÑO)

VERÓNICA LUCIA RODRÍGUEZ FUERTE

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
Octubre 2008 – Mayo 2009

IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS AGENTES
CAUSALES ASOCIADOS A ENFERMEDADES VIRALES DEL TOMATE DE
ÁRBOL (*Solanum betaceum*) EN CULTIVOS DEL MUNICIPIO DE CÓRDOBA
(NARIÑO)

VERÓNICA LUCIA RODRÍGUEZ FUERTE

Trabajo de grado modalidad pasantía presentado como requisito parcial para optar
al Título de Biólogo

En el marco del proyecto “Desarrollo de métodos de detección serológica y
molecular del complejo de virus asociado al Mosaico del tomate de árbol en
Colombia”, Contrato 408-2007.

DIRECTOR
MAURICIO MARIN MONTOYA. I.A. Ph.D.
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLIN

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
Octubre 2008 – Mayo 2009

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”.

Artículo 1º del acuerdo No. 32 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Director

Jurado

Jurado

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme en cada uno de los momentos difíciles y guiar mis pasos todos los días de mi vida.

A mis padres y a mi hermanito Germán Darío, por haberme dado el apoyo, las fuerzas y el ánimo en cada momento en el que los necesite, por formarme y ser mi familia, a ustedes les debo todo lo que soy y lo que he conseguido.

A mi Director Mauricio Marín, por todas sus enseñanzas, consejos y todos los conocimientos que me transmitió, por darme la motivación y el haberme permitido aprender tanto de un excelente profesional y como lo es el.

A la Universidad Nacional de Colombia por haberme recibido en sus instalaciones y haber permitido la realización de la pasantía.

A Colciencias, La Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y la Universidad de Nariño por la financiación del proyecto.

A mis jurados, Rodrigo Prieto y Carlos Betancourth, por toda su ayuda y orientación en el desarrollo de este trabajo.

Al programa de Biología y en especial a la profesora Luz Estela Lagos, por su gran colaboración y apoyo en el desarrollo de la pasantía.

A mis compañeras de GENPAT por todas sus sugerencias y apoyo.

A Carito, Fiore e Iván, por el apoyo y cariño a larga distancia que me brindaron.

A Mariluz, Margarita, Jose, Juan Esteban, Mónica, Marcela, Jhon y todas las personas que compartieron conmigo en Medellín, de quienes aprendí muchísimo.

Y a Ti que fuiste y eres mi compañero, mi amigo, mi confidente, mi consuelo, mi apoyo y supiste entenderme aún cuando ni siquiera yo lo hacía. Gracias a Ti Guido.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	14
1. HIPOTESIS	18
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
3. MARCO TEORICO	19
3.1 VIRUS	19
3.2 VIRUS DE PLANTAS	22
3.3 PROBLEMAS VIRALES DEL TOMATE DE ÁRBOL (<i>Solanum betaceum</i>)	23
3.4 GENEROS VIRALES ASOCIADOS AL TOMATE DE ÁRBOL	26
3.4.1 <i>Potyviriidae</i>	26
3.4.2 <i>Luteoviridae</i>	29
3.4.3 <i>Bromoviridae</i>	31
3.4.4 <i>Tobamovirus</i>	32
3.5 METODOS DE DIAGNOSTICO VIRAL	33
3.5.1 ELISA	33
3.5.2 Tissue Blot Imunoassay	33
3.5.3 RT- PCR	34

3.5.4 RT- PCR MULTIPLE	34
3.5.5 RT- PCR en tiempo real	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 SITIO DE MUESTREO	35
4.2 FASE DE CAMPO	35
4.2.1 Descripción de Sintomatologías de origen viral	35
4.3 FASE DE LABORATORIO	35
4.3.1 Detección serológica de los virus asociados a cultivos de S. betaceum	35
4.3.2 Identificación molecular de los virus presentes en los cultivos de tomate de árbol	36
4.3.2.1 Extracción de ARN	36
4.3.2.2 Pruebas de RT- PCR y secuenciación de regiones diagnósticas de los genomas virales	36
4.3.3 Evaluación de la posible transmisión por semilla sexual de los agentes virales detectados	37
4.3.4 Definición de relaciones filogenéticas entre los virus encontrados	38
5. RESULTADOS	39
5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS SINTOMATOLOGIAS DE ORIGEN VIRAL	39
5.2 DETECCIÓN SEROLOGICA DE LOS VIRUS ASOCIADOS A LA “VIROSIS” EN EL CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL	41
5.3 IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE DE LOS VIRUS QUE AFECTAN AL TOMATE DE ÁRBOL EN CÓRDOBA	42
5.3.1 Análisis de secuencias de PVY	43

5.3.2	Análisis de secuencias de PLRV	45
5.4	EVALUACIÓN DE LA TRANSMISIÓN VIRAL A TRAVES DE SEMILLA SEXUAL	46
5.5	DEFINICIÓN DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS VARIANTES VIRALES ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE TOMATE DE ARBOL DE CORDOBA	48
5.5.1	Análisis filogenético PVY	48
5.5.2	Análisis filogenético PLRV	53
6.	ANALISIS DE RESULTADOS	56
6.1	SINTOMAS	56
6.2	IDENTIFICACIÓN MEDIANTE RT-PCR Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES DIAGNÓSTICAS DE LOS GENOMAS VIRALES DE PVY Y PLRV	57
6.3	EVALUACIÓN DE LA POSIBLE TRANSMISIÓN POR SEMILLA SEXUAL DE LOS AGENTES VIRALES DETECTADOS	60
	CONCLUSIONES	62
	RECOMENDACIONES	63
	BILIOGRAFIA	64
	ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Valores de absorbancia obtenidos en las pruebas de ELISA para los virus evaluados en plantas de tomate de árbol.	42
Tabla 2. Procedencia de las muestras en las cuales se obtuvieron productos amplificados de los virus PVY y PLRV.	43
Tabla 3. Secuencias que presentaron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de PVY de Córdoba, Nariño.	44
Tabla 4. Secuencias que presentaron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de PLRV de Córdoba, Nariño.	46
Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos en la prueba de ELISA con anticuerpos para PLRV con muestras de semillas.	47
Tabla 6. Valores de absorbancia de plántulas mantenidas bajo invernadero, para la prueba de ELISA con anticuerpos para PLRV.	48
Tabla 7. Secuencias utilizadas para la elaboración del análisis filogenético de las secuencias de PVY.	49
Tabla 8. Secuencias de referencia obtenidas del Genbank para el análisis filogenético de las secuencias 45col y 46col de PLRV obtenidas de cultivos de tomate de árbol en Córdoba, Nariño.	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Genoma y proteínas funcionales de los potyvirus.	29
Figura 2. Esquema general del genoma de miembros de <i>Polerovirus</i> .	30
Figura 3. Genoma de los miembros de la familia <i>Bromoviridae</i> .	31
Figura 4. Genoma y proteínas de los tobamovirus.	32
Figura. 5A. Estado general de los cultivos de tomate de árbol afectados por “Virosis” en el municipio de Córdoba (Nariño).	39
Figura. 5B. Manchas aceitosas y anillos necróticos en tejido foliar de plantas de tomate de árbol en Córdoba (Nariño).	40
Figura 6: Sintomatología en frutos encontradas en cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño).	41
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de ocho muestras de las veredas San Juan Chico, El Chair, El Cascajo y Guacas del Municipio de Cordoba.	43
Figura 8. Secuencias consenso de A) PVY 45COL y B) PVY 46COL provenientes de cultivos de tomate de árbol en Córdoba, Nariño.	48
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de cuatro muestras de tomate de árbol de la vereda El Chair.	45
Figura 10. Secuencias consenso de PLRV25COL y PLRV46COL	46
Figura 11. Electroforesis de RT-PCR con cebadores específicos para PLRV en muestras de semilla sexual de tomate de árbol.	47
Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de PVY.	50
Figura 13. Árbol filogenético de secuencias del gen CP de PVY	52
Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias de PLRV.	54
Figura 15. Árbol filogenético de secuencias del gen CP de PLRV.	55

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Buffer de extracción para ELISA DE potyvirus 1X	71
Anexo B. Buffer de extracción general para ELISA (GEB) 1X	71
Anexo C. RT- PCR ONE-STEP	71
Anexo D. Cebadores específicos utilizados.	72
Anexo E. Matrices de identidad de las secuencias analizadas	74

RESUMEN

Las enfermedades ocasionadas por agentes virales que afectan a las solanáceas se han convertido en un factor limitante y perjudicial para los cultivos de tomate de árbol presentes en las regiones cultivadoras de Nariño. Estudios previos apuntan a un posible potyvirus y a diferentes virus isométricos como los agentes causales de estas enfermedades. No obstante la información que se tenía de la problemática era insuficiente puesto que las identidades taxonómicas de los virus asociados a la infección no se habían esclarecido completamente. Dicha situación fue abordada en este estudio mediante la evaluación de la incidencia de potyvirus y de otros virus asociados a este cultivo, utilizando pruebas de ELISA a partir de 130 muestras de cuatro cultivos afectados en el municipio de Córdoba, evaluándose también muestras provenientes de semilla sexual. Adicionalmente se determinó la identidad taxonómica del potyvirus y de un polerovirus, a partir de la secuenciación de la región de la cápside viral (CP) de diferentes aislamientos. Los resultados indicaron la presencia de potyvirus en todas las muestras analizadas, y además se determinó que los virus CMV (30.7%), ToMV (54%) y PLRV (70%) presentaban una alta incidencia en los cultivos de la región. El análisis molecular permitió identificar al potyvirus como miembro de la especie PVY, compartiendo niveles de identidad superiores al 92% con cepas obtenidas en cultivos de papa de diferentes países; no obstante el análisis filogenético evidenció la separación de los aislamientos provenientes de Córdoba, agrupándolos en un clado independiente, sin una clara afinidad con ninguna raza de PVY, por lo cual se requiere la secuenciación de regiones más variables del genoma, de manera que sea posible establecer su identidad intraespecífica. Las secuencias CP del polerovirus tuvieron identidades superiores al 99% con cepas de PLRV de papa en diferentes regiones del mundo. De gran interés resultó el hecho de detectar mediante ELISA al virus PLRV en material de semilla sexual de tomate de árbol, siendo necesario evaluar con más detalle dicha situación, dadas las importantes consideraciones epidemiológicas que supondría la transmisión de PLRV a través de este medio. Esta investigación revela la ocurrencia de un complejo viral asociado a la virosis del tomate de árbol en el sur de Colombia y con base en los análisis de secuencias plantea la posible infección cruzada de cepas de PVY y PLRV entre los cultivos de papa y tomate de árbol de la región, lo cual requiere confirmación experimental mediante evaluaciones de patogenicidad cruzada.

ABSTRACT

Diseases caused by viral agents affecting solanaceous plants have become a limiting factor for tree tomato crops growing in Nariño. Previous studies point to a possible potyvirus and different isometric viruses as the causal agents of these diseases. However, the taxonomic identity of these viruses had not been fully clarified. This situation was addressed in this study by evaluating the incidence of potyvirus and other viruses associated with this crop, using ELISA tests from 130 samples of four affected crops in the municipality of Cordoba. This evaluation was also made using seeds obtained from fruits of tomato tree. Additionally, we determined the taxonomic identity of the potyvirus and polerovirus, through sequencing the region of the viral capsid (CP) in different isolates. The results indicated presence of potyvirus in all the samples analyzed, and additionally it was found that viruses CMV (30.7%), ToMV (54%) and PLRV (70%) have a high incidence on crops in the region. The molecular analysis allowed to identify the potyvirus as the species PVY, sharing 93% of identity with strains obtained from potato plants in different countries; however, the phylogenetic analysis showed the separation of isolates from Cordoba, clustering them in an independent clade without a clear affinity to any known strain of PVY, therefore in future it is required sequencing other variable regions of the viral genome in these strains. The CP sequences of polerovirus had over 99% identity with PLRV potato strains in different regions of the world. It was surprising to detect PLRV in seeds of tree tomato, being necessary to evaluate more deeply this finding, because of the important epidemiological aspects that this situation could represents. This research reveals the occurrence of a viral complex associated with tree tomato viral diseases in southern of Colombia and based on sequence analysis raises the possible cross-infection of strains of PVY and PLRV from potato crops and tree tomato in this region, hypothesis that requires experimental confirmation throughout cross-inoculation tests.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los patógenos que causan enfermedades en las plantas, existen gran variedad de nematodos, hongos, bacterias, protozoarios, oomycetes y virus, estos últimos, por ser entes biológicos con una estructura básica de proteínas y ácidos nucleicos, son parásitos obligados muy difíciles de detectar e identificar, por lo cual el estudio completo de su biología requiere de la integración de análisis microscópicos, patológicos, bioquímicos y moleculares.

Las enfermedades de plantas causadas por virus producen síntomas como disminución en el crecimiento, deformación de tejidos, mosaicos foliares, y reducción en la producción, lo que conlleva a grandes pérdidas en el rendimiento y/o de la longevidad de una amplia variedad de cultivos de importancia agrícola. Esta problemática es de especial interés ya que las patologías causadas por los virus, al contrario de las causadas por hongos, bacterias o nematodos, no pueden ser tratadas directamente y de una manera eficiente con sustancias químicas, por lo cual las estrategias empleadas se basan en prevenir que el virus llegue ó se establezca en el cultivo, mediante el manejo biológico o químico de los vectores que los transmiten, el uso de variedades resistentes, el empleo de material libre de virus para las plantaciones y la exclusión, que consiste en evitar la expansión de la enfermedad a lugares donde aún no se ha registrado¹.

En Colombia, los cultivos de solanáceas que se ven más afectados por estos patógenos son el de papa (*Solanum tuberosum*), con el mosaico rugoso o mosaico severo causado por el virus PVY, el virus del enrollamiento foliar (PLRV), el virus del amarillamiento de las venas (PYVV) entre otros, y el de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), con una enfermedad que en forma genérica se denomina "Virosis" y que produce síntomas variados pero cuyos agentes causales aún no han sido plenamente establecidos, aunque existen diferentes reportes que indican que al menos uno de los virus asociados a este cultivo, pertenece a la familia *Potyviridae*^{2, 3}. Estos virus se caracterizan por tener forma de partícula flexuosa helicoidal de 730 x 11 nm, un genoma de ARN monocatenario positivo y diversos mecanismos de transmisión, entre los que se destacan los áfidos y los médios

¹ ADAMS, M. Introduction to plant viruses. 2007. <http://www.dpvweb.net/intro/index.php>.

² BETANCOURTH C, GOYES R, BRAVO DA. 2003. Caracterización biológica de un virus del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Send) en el departamento de Nariño. Fitopatología Colombiana 27: 7-10.

³ AYALA, M. 2009. Caracterización del Potyvirus asociado a la virosis del tomate de árbol en Antioquia. Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Magíster en Ciencias Agrarias. Octubre. 96 p.

mecánicos. Recientemente, además de potyvirus, se han identificado en cultivos de diferentes regiones del país diferentes virus isométricos de los géneros *Polerovirus*, *Cucumovirus* y *Alfamovirus*, entre otros ⁴.

El tomate de árbol se ha convertido en una de las alternativas más viables para reemplazar los cultivos tradicionales que dejan bajos niveles de rentabilidad, y para sustituir los cultivos ilícitos en diversas regiones del país, dadas sus excelentes características organolépticas y su gran aporte nutricional, que lo hacen muy atractivo para la industria de bebidas y alimentos ⁵. En Nariño, 18 municipios cultivan tomate de árbol constituyéndose en uno de los frutales con mayor importancia económica en el departamento. Los principales productores de tomate de árbol son Samaniego, Funes, Contadero y Santacruz, mientras que municipios como Córdoba, El Rosario y Taminango, a pesar de tener una baja producción, se consideran promisorios para la expansión de su siembra, por ser municipios que cuentan con condiciones climáticas y edáficas propicias para su cultivo ⁶. Sin embargo, la fuerte incidencia de las enfermedades virales que se presenta en la actualidad en dichos municipios, es una limitante significativa para el aumento de las áreas destinadas a la siembra de este frutal.

En Colombia la primera enfermedad viral del tomate de árbol se detectó en 1980 en Boyacá con la presencia del virus de la necrosis anular ^{7 8} y en Antioquia con el mosaico del tomate de árbol ⁹. En el departamento de Nariño Betancourth y colaboradores reportaron en el 2003 la presencia de un posible potyvirus que afecta los cultivos de tomate de árbol, caracterizado por la morfología de varilla flexuosa de 800 nm y su transmisión mediante áfidos de la especie *Myzus persicae*; sin embargo su identificación a nivel de especie era incierta y es posible que existan otros tipos de virus asociados a la compleja sintomatología que se presentan en los cultivos del Departamento.

La presencia de mezclas de virus afectando el tomate de árbol se ha reportado en países como Nueva Zelanda y Ecuador, donde se han detectado miembros de las

⁴ JARAMILLO, M. 2009. Análisis serológico y molecular de virus asociados al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Magíster en Ciencias -Biotecnología -. Octubre. 127 p

⁵ MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2006. Observatorio agrocadenas Colombia.

⁶ SECRETARIA DE AGRICULTURA CONSOLIDADO AGROPECUARIO NARIÑO. 2006.

⁷ SÁNCHEZ DE LUQUE, M., DE LA ROTTA C., SUAREZ, A. 1981. Posible virus en tomate de árbol *Cyphomandra betacea* SENDT. ASCOLFI informa 7 (3): 24

⁸ SÁNCHEZ DE LUQUE., C. 1982. Estudios de hospedantes de un nuevo virus en el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt). En: Programa y resúmenes V Congreso Asociación Colombiana de Fitopatología ASCOLFI, XXII Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología. División Caribe, ASP- CD, Cali, Colombia. Julio 12 - 17. p. 41-42.

⁹ TAMAYO, P.J. 1990. Mosaico del tomate de árbol. ASCOLFI Informa.16 (6): 54-55.

familias *Potyviridae*, *Flexiviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Luteoviridae* y *Comoviridae* como agentes causales de las enfermedades virales de este cultivo^{10, 11, 12}.

A pesar de la gran limitante que representan las “Virosis” para el cultivo del tomate de árbol en Colombia, la identificación de las especies virales asociadas a los cultivos en las diferentes regiones del país no se había realizado hasta el momento. Esta situación es claramente inconveniente para el diseño de las estrategias de control de estas enfermedades y requiere ser abordada con celeridad. Apuntando a dicha necesidad, este proyecto tuvo como principal objetivo la determinación de los agentes causales de la “Virosis” del cultivo de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño), apoyándose en el empleo de técnicas serológicas y moleculares. Dicho objetivo se llevó a cabo mediante la descripción de las principales sintomatologías de origen viral que se presentaron en los cultivos del municipio, seguido de la detección serológica mediante la prueba de ELISA de los grupos de virus con genoma de ARN reportados en este cultivo en otros países^{13, 14} y la identificación a nivel de especie de algunos de los agentes causales asociados al cultivo, utilizando la técnica de RT-PCR con cebadores específicos y secuenciación parcial de los genomas virales. Adicionalmente, se evaluó la posible presencia de dichos virus en muestras de semillas sexuales, a través de pruebas de ELISA y RT-PCR. Finalmente se definieron las relaciones filogenéticas entre las variantes del virus predominante en cultivos de tomate de árbol del municipio de Córdoba y las cepas relacionadas cuyas secuencias se encuentran depositadas en el GenBank.

En la investigación se encontró como sintomatología predominante la presencia de mosaicos foliares generalmente asociados a la presencia de ampollamientos, deformación de brotes y cambios en la forma y coloración de flores y frutos. Estos síntomas podrían estar acompañados de manchas aceitosas y anillos necróticos, dificultándose en gran medida la asociación de un síntoma particular con los diferentes virus que afectan el cultivo. Las pruebas de ELISA sugieren que miembros de al menos cuatro familias virales están asociados con la “Virosis” del tomate de árbol en el municipio de Córdoba. Dichos resultados se confirmaron parcialmente al amplificar fragmentos del gen de la cápside de los virus PVY

¹⁰ VIZUETE B., INSUASTI M.L., OCHOA J. Y ELLIS, M. Biological and Serological Characterization of Tree Tomato Virus Diseases in Ecuador. INIAP-Ohio State University.

¹¹ OCHOA L, J. Y INSUASTI A, M. 2005. Etiología de las enfermedades virales del tomate de árbol en Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito (Ecuador). Informe Técnico Anual - INIAP (Ecuador). Est. Exp. Santa Catalina. Departamento Nacional de Protección Vegetal estudios agronómicos, fitopatológicos y entomológicos de frutales nativos andinos 1:1-4.

¹² EAGLES R. M, GARDNER R. C, FORSTER R. 1994. Incidence and distribution of six viruses infecting tamarillo (*Cyphomandra betacea*) in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 22: 453-458

¹³ IBID

¹⁴ VIZUETE B., INSUASTI M.L., OCHOA J. Y ELLIS, M., Op. Cit. Pág. 16

(*Potyvirus*) y PLRV (*Polerovirus*), que presentaron altas identidades con cepas provenientes de cultivos de papa de diversas partes del mundo. Una vez obtenidas las secuencias, se realizaron los respectivos análisis filogenéticos, encontrándose que aquellas cepas de PVY de cultivos de tomate de árbol de Córdoba se encontraban en un clado claramente diferenciado de las cepas representando las diferentes razas de esta especie. Por otra parte, el análisis de las secuencias de PLRV, indicó que las cepas de Córdoba de dicho virus, hacían parte de un único grupo que además estuvo conformado por secuencias de PLRV de diferentes cultivos de papa. En cuanto a la evaluación de la presencia de éstos virus en semilla sexual de tomate de árbol, únicamente se logró detectar al PLRV en dicho material, a partir de la amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de 336 pb correspondiente a una porción del gen de la cápside viral.

Este estudio representa un aporte para continuar aumentando la base de información disponible en el país sobre el complejo viral que afecta los cultivos de tomate de árbol y se espera contribuya al diseño de las estrategias de manejo de la enfermedad en Colombia.

Esta investigación hace parte del macroproyecto financiado por Colciencias, la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (DIME) y la Universidad de Nariño: "Desarrollo de métodos de detección serológica y molecular del complejo de virus asociado al Mosaico del tomate de árbol en Colombia, Contrato 408-2007.

1. HIPÓTESIS

La enfermedad denominada “Virosis” del tomate de árbol en los cultivos del municipio de Córdoba (Nariño) es causada por un complejo viral conformado por miembros de diferentes familias que poseen una variada gama de mecanismos de infección y transmisión, lo cual requiere de la integración de diferentes estrategias de manejo que respondan a la naturaleza de tal diversidad de agentes causales.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la identidad de virus asociados al tomate de árbol en los cultivos del municipio de Córdoba (Nariño), mediante el empleo de técnicas serológicas y moleculares.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una descripción detallada de las sintomatologías de origen viral presentes en los cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño).
- Detectar serológicamente mediante el empleo de anticuerpos específicos para los principales grupos de virus, las familias y/o géneros de los agentes causales de la “Virosis” del cultivo del tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño).
- Identificar a nivel de especie los virus que afectan los cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño), mediante la técnica de RT-PCR y secuenciación de regiones diagnósticas de los genomas virales.
- Evaluar la posible transmisión por semilla sexual de los agentes virales detectados.
- Definir las relaciones filogenéticas entre las variantes de los virus asociados a los cultivos de tomate de árbol del municipio de Córdoba y aquellas cuyas secuencias se encuentran depositadas en las bases de datos moleculares.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 VIRUS

Los virus son parásitos submicroscópicos intracelulares obligados, incapaces de crecer o dividirse por sí mismos, debido a que carecen de la información genética que codifica la maquinaria para generar energía metabólica y la síntesis de proteínas¹⁵. Su estructura se compone de una cubierta proteica ó cápside y un ácido nucleico que conforma su genoma. Adicionalmente, algunos virus de plantas pueden tener una cubierta externa formada a partir de bicapas lipídicas procedentes de las células que infectan (membrana celular u organelos)¹⁶.

La cápside de los virus se encuentra formada por subunidades proteínicas idénticas, repetidas numerosas veces, que unidas mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas integran estructuras geométricas de simetría helicoidal o icosaédrica; dicha simetría permite un ensamblaje correcto de la cápside, ejerciendo un papel protector contra factores físicos, químicos o enzimáticos presentes en el medio y que puedan afectar la información genética del virus. El papel protector de la cápside es fundamental en los virus, dada la vulnerabilidad de los ácidos nucleicos que componen los genomas, especialmente de aquellos cuyo genoma es de cadena sencilla, ya que el rompimiento de un enlace fosfodiéster o la modificación en uno solo de los nucleótidos (por acción de nucleasas extracelulares o fuerzas mecánicas), es suficiente para desactivar la partícula viral, impidiéndose así su replicación¹⁷.

La composición estructural de los virus está estrechamente ligada a la maquinaria genética de su hospedero. Debido a la condición de parásitos obligados, los virus solo pueden replicarse dentro de la célula apropiada, requiriendo un correcto reconocimiento huésped-virus¹⁸.

Los genomas virales presentan gran variabilidad estructural, ya que pueden estar constituidos por cadenas dobles o sencillas de ADN ó ARN, en orientación con sentido positivo (+), negativo (-), ó en ambos sentidos (ambisentido); en configuración lineal, circular o segmentada; y con una longitud que va desde 1000 hasta 300.000 bases o pares de bases (dependiendo del número de cadenas), que codifican para un promedio de 4 a 100 genes¹⁹.

¹⁵ CANN , A. J. Principles of molecular virology. Third edition. Elsevier academic press. 2001. 323p.

¹⁶ ADAMS, M. Op. Cit. 13

¹⁷ MATTHEWS R.E.F. Plant Virology third edition. Academic press limited. 1991. 835p.

¹⁸ CANN , A. J. Op. Cit. Pág. 19

¹⁹ SCHAECHTER M., LEDERBERG J. 2004. The desk encyclopedia of microbiology. Elsevier Academic Press.

La clasificación de los virus se fundamenta en la utilización de caracteres como el tipo de ácido nucleico que contienen, las características de la cápside y/o envoltura del virión (cuando está presente), las propiedades fisicoquímicas de la partícula y sus características biológicas (posición taxonómica de sus huéspedes, patología que producen), entre otros. Sin embargo la ausencia de registro fósil, su falta de autonomía para el desarrollo y su probable carácter polifilético, son condiciones que hacen de los virus un grupo difícil de caracterizar y ubicar taxonómicamente. Actualmente, existen dos formas de clasificación de los virus, una propuesta por el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV), que los organiza en órdenes o familias, como el rango taxonómico superior, seguido por subfamilias, géneros, y especies. No obstante dicha clasificación no ha podido agrupar a una gran cantidad de virus y la categoría taxonómica de orden, fue establecida tardíamente, por lo cual la mayoría de las 80 familias aún no han sido adscritas a un orden ²⁰.

Según este tipo de clasificación, las especies virales son catalogadas como un grupo politético de virus que constituyen un linaje replicativo y ocupan un nicho ecológico particular ²¹. Esto implica que los miembros de una especie tienen una gran cantidad de propiedades en común, sin que una de ellas tenga que ser común a todos los miembros de la especie. La principal característica que se tiene en cuenta para asignar un virus a una especie determinada, es el porcentaje de identidad en la secuencia del genoma; sin embargo, cuando el virus tiene una identidad cercana al umbral de dicho criterio, se consideran otros criterios para la clasificación del virus, como el rango de hospederos, patogenicidad, citopatología y propiedades antigénicas ²².

El otro sistema de clasificación de Baltimore es más general y actualmente no tiene validez taxonómica, se basa en la distribución de los virus en siete grupos fundamentales teniendo en cuenta la base química del genoma y el mecanismo de síntesis de ARNm. La siguiente es la clasificación de Baltimore:

Grupo I, genomas de ADN de doble cadena (ds ADN): incluye a los virus que se replican sin un intermediario de ARN. Su conformación puede ser lineal o circular. Su rango de hospederos es muy amplio ya que infectan a bacterias, hongos, animales vertebrados e invertebrados. Su mecanismo de replicación consiste en que una vez el virus entra en la célula sin ser reconocidos por las nucleasas celulares como un genoma extraño, forman ARNm a partir de las ARN polimerasas del hospedero, de manera que luego éste se traduce en los

²⁰ CANN, A. J. Op. Cit. Pág. 21

²¹ VAN REGENMORTEL MHV. 1990. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology* 31: 241-254.

²² KHAN, J.A., DIJKSTRA, J. Handbook of plant virology. Crop science. New York, U.S.A. Food Products Press. 2006. 452p.

ribosomas y da lugar a las proteínas de la cápside y enzimas replicativas, entre otras.

Grupo II, genomas de ADN de cadena sencilla (ss ADN): su genoma está compuesto por una hebra sencilla de ADN de polaridad positiva. Sus hospederos incluyen bacterias, plantas, animales vertebrados e invertebrados. Debido a su polaridad, necesita una cadena negativa para poder transcribir el genoma, por lo tanto al entrar a la célula hospedera, la ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria, creando un ADN bicatenario, a partir del cual se genera un ARNm que lleva la información necesaria para sintetizar las proteínas de la cápside y enzimas replicativas, entre otras.

Grupo III, genomas de ARN de doble cadena (ds ARN): el mecanismo de replicación de los virus de ARN bicatenario radica en la síntesis de ARNm a partir de la hebra negativa del ARN bicatenario, mediante una ARN polimerasa dependiente del ARN y de origen viral. Esta transcriptasa viral, además de ser una enzima, puede ser una proteína estructural, ya que forma parte de la cápside, por ello el virus sólo se replicará si a la célula entra la cápside junto al genoma vírico.

Grupo IV, genomas de ARN de cadena sencilla positiva ((+) ss ARN): denominado así porque el ARN genómico sirve como ARN mensajero. La mayoría de virus que infectan plantas se encuentran en este grupo y también infectan animales vertebrados, invertebrados, hongos y bacterias.

Grupo V, genomas de ARN de cadena sencilla negativa ((-) ss ARN): son virus de ARN monocatenario con polaridad de antimensajero, que una vez dentro de la célula infectada genera un ARN complementario a su genoma, que actúa como ARNm. Sus hospederos incluyen animales vertebrados y plantas.

Grupo VI, genomas de ARN con transcripción reversa (ss ARN-RT): estos virus tienen genomas de ds ADN o ss ARN y su replicación incluye la síntesis de ADN a partir de ARN mediante la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente y usando las enzimas celulares se sintetiza un mensajero capaz de alcanzar el núcleo de las células e insertarse en los cromosomas de las células huésped. Estos virus infectan animales vertebrados, invertebrados y hongos.

Grupo VII, genomas de ADN transcripción reversa (ds ADN-RT): es el grupo más recientemente descubierto y descrito. Tiene un genoma de ADN bicatenario que se expresa formando un mensajero, que se traduce en los ribosomas. En el momento de la encapsidación, es el mensajero el que se encapsida y por retrotranscripción a partir de una transcriptasa reversa, forma de nuevo una molécula de ADN, primero mono y después bicatenaria, que se constituye en el genoma del virus.

3.2. VIRUS DE PLANTAS

De las casi 4000 especies de virus reconocidas por el ICTV, las que cobran mayor importancia a nivel mundial son las causantes de enfermedades humanas y las que afectan animales domésticos y cultivos comerciales importantes agronómicamente. El interés que se presta a estos virus se debe a la rapidez y facilidad con la que se pueden transmitir, extendiéndose a otros cultivos y ocasionando grandes pérdidas económicas. Esto se debe a la gran variedad de rutas por las cuales los virus son transmitidos entre plantas, las cuales incluyen:

- Transmisión por semilla sexual: consiste en la transmisión de la enfermedad por semillas o tejidos vivos de los embriones que se infectan en ambientes contaminados con partículas virales.
- Propagación mediante vectores: existen varios organismos como hongos, bacterias, nematodos, insectos y otros artrópodos, que al llegar a las plantas facilitan el establecimiento de la infección.
- Transmisión mecánica: consiste en la transmisión del virus mediante contacto físico. Puede ocurrir cuando partículas virales que se encuentran en residuos de cosechas, maquinaria, herramientas de trabajo, entran en contacto con plantas susceptibles.
- Transmisión por semilla asexual: consiste en la utilización de órganos de plantas infectadas por virus como propágulos para la generación de un nuevo cultivo.

La transmisión de virus mediante vectores, especialmente insectos, ha cobrado gran importancia, ya que las extensas áreas de monocultivos y el uso inapropiado de plaguicidas, eliminan sus depredadores naturales haciendo que las poblaciones de insectos resistentes se incrementen masivamente, facilitando aún más la transmisión de los virus.

En general, el proceso de replicación de cada virus está determinado por la interacción dinámica entre el virus y su hospedero, existiendo grandes diferencias entre los mecanismos que siguen los virus que infectan animales y los que infectan plantas. En las plantas, el virus ingresa a través de heridas causadas por daños físicos del ambiente o lesiones producidas por los vectores, luego se multiplican en el sitio de infección, induciendo síntomas localizados como manchas necróticas en las hojas. Subsecuentemente, el virus puede dispersarse pasando de célula a célula o mediante el sistema vascular, lo que resulta en una infección sistémica que afecta la totalidad de la planta; sin embargo; los mecanismos específicos de dicho proceso dependen de la replicación y traducción de cada virus y de la información albergada en su genoma²³.

²³ STANGE C. 2006. Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. Ciencia e investigación agraria 33: 3-21.

En el caso de los virus con genoma de ARN monocatenario positivo, la replicación se lleva a cabo mediante su propia ARN polimerasa dependiente de ARN (RpRd) con ayuda de factores del hospedero, que permiten el establecimiento del complejo de replicación. Una vez ocurre esto, se sintetiza la copia negativa complementaria al ARN original, y esta última es utilizada para la traducción, replicación y síntesis de nuevas hebras positivas que formarán parte de los nuevos viriones. En estos procesos la movilidad de los virus dentro de las células es de gran importancia dado que les permite tener acceso a la maquinaria de traducción del hospedero, reubicar la RpRd y traducir eficientemente sus proteínas²⁴.

No obstante el transporte célula a célula representa un obstáculo significativo para la propagación sistémica de la infección, dada la composición de las paredes de las células vegetales. Por esta razón la mayoría de los virus cuentan con proteínas de movimiento especializadas que les permiten pasar a través de canales presentes en la pared celular, llamados plasmodesmos desde células epidérmicas a células del mesófilo, hasta llegar a los haces vasculares. Dentro de estas proteínas, las que juegan un papel muy importante no sólo en el transporte del virus en la planta sino también en la replicación y en las actividades de translocación nuclear, están las proteínas de la cápside viral y las proteínas de inclusión nuclear que varían dependiendo del tipo de genoma que presente el virus²⁵.

3.3 PROBLEMAS VIRALES DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*)

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) se ha considerado como uno de los principales frutales de importancia en Colombia, dadas sus características de sabor, olor, textura, además de su gran aporte de vitaminas A, C y de minerales como el calcio, el hierro y el fósforo. A nivel mundial se cultiva en países como Perú, Chile, Bolivia, Argentina, Brasil, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Jamaica, Puerto Rico y Haití; siendo Colombia y Ecuador los países donde se da una mayor producción. Actualmente el cultivo se ha expandido llegando a países como Zambia, Nueva Zelanda, Sri Lanka, Kenia, Zimbabwe e India, de los cuales se destaca Nueva Zelanda por su producción²⁶.

A pesar de ser un frutal promisorio, el tomate de árbol se ve afectado por un gran número de patógenos entre los que se encuentran hongos, bacterias y virus que disminuyen notablemente su calidad y producción. Las enfermedades virales se han convertido en uno de los principales factores limitantes en la comercialización de este frutal, puesto que al contrario de las enfermedades ocasionadas por

²⁴ MATTHEWS R.E.F. Op Cit. Pág. 19

²⁵ STANGE C. 2006. Op. Cit. Pág. 25

²⁶ MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2006. Op Cit. Pág 15.

hongos o bacterias, éstas no se pueden controlar mediante el uso de plaguicidas, ya que al ingresar el virus a la planta le ocasiona una infección sistémica en la que se ven afectados todos sus órganos incluyendo los frutos.

A nivel mundial, además de Colombia, solo se han reportado enfermedades de etiología viral que afecten al tomate de árbol en Nueva Zelanda y Ecuador. En Nueva Zelanda se han identificado seis virus ²⁷, entre los cuales se encuentran: a) el Virus del mosaico del Tamarillo (TamMV), un virus del género *Potyvirus* que causa síntomas como moteado y bandeamiento de venas en las hojas y manchas oscuras en los frutos ²⁸(Brunt et al., 1996); b) el Virus del mosaico del pepino, que es un cucumovirus (CMV) perteneciente a la familia *Bromoviridae*, con síntomas en hojas y frutos en forma de manchas y anillos; c) el Virus del mosaico del Aucuba de la Papa (PAMV) correspondiente a la familia *flexiviridae*; que es dependiente del TamMV para la transmisión por áfidos; d) el Virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) que causa un mosaico amarillo brillante y bandeado de venas, pero al parecer no afecta el fruto²⁹; e) el Virus del mosaico de Arabis (ArMV), un nepovirus transmitido por nematodos, que ha sido aislado de frutos que exhibían anillos necróticos superficiales y f) el tospovirus del marchitamiento moteado de tomate (TSWV), que también se ha asociado a necrosis del fruto.

Por otra parte, en Ecuador se estudiaron enfermedades virales del tomate de árbol en los valles de la provincia de Pichincha, encontrándose que predominan los virus PLRV, ToRSV, PVY y AMV, mientras que los virus CMV, TMV y TSWV se han identificado anteriormente en otras regiones de este país ³⁰. Vizuete³¹ ha determinado que el PVY es el virus más frecuentemente asociado con todos los síntomas estudiados en el tomate de árbol en la provincia de Pichincha de ese país.

Hasta hace unos años, en Colombia se habían registrado seis enfermedades virales asociadas al tomate de árbol. La primera fue identificada en Boyacá desde inicios de la década de 1980 con una sintomatología de necrosis anular, cuyo agente causal se caracteriza por presentar partículas alargadas y flexuosas de aproximadamente 750 nm de largo, transmisión mecánica a partir de inóculo de frutos enfermos, pero no a partir de hojas afectadas ni del áfido *Myzus persicae*; se cree que este virus hace parte del género *Potyvirus*, no obstante no se han realizado estudios genéticos que lo confirmen. La segunda enfermedad se

²⁷ EAGLES R. M, GARDNER R. C, FORSTER R. Op. Cit. Pág. 16

²⁸ BRUNT A, CRABTRE K, DALLWITZ M.J., GIBSS A.J., WATSON L. Y ZURCHER, E.J. (eds). 1996. Plant virus online: Descriptions and lists from the VIDE Database.

²⁹ FLETCHER, J.D. 1987. New plant diseases records in New Zealand: Additional hosts of alfalfa mosaic virus and cucumber mosaic virus. New Zealand Journal of Agricultural Research 30: 505-506.

³⁰ OCHOA L, J. Y INSUASTI A, M. Op. Cit. Pág.16

³¹ VIZUETE B., INSUASTI M.L., OCHOA J. Y ELLIS, M., Op. Cit. Pág. 16

detectó en el departamento de Putumayo en el valle del Sibundoy en 1989³², la enfermedad se caracterizaba por inducir el amarillamiento general de la planta y causar clorosis de venas, vejigas y ampollas, enrollamiento foliar y reducción del área fotosintética. El virus no se transmite por semilla sexual pero si por los áfidos *M. persicae* y *Macrosiphum sp.* en forma no persistente³³. La tercera enfermedad fue reportada en los municipios de Rionegro y Marinilla (Antioquia) en 1990. Los síntomas correspondían a plantas con mosaicos, ocasionados por la ocurrencia de partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diámetro y para cuya detección se ha desarrollado un anticuerpo policlonal denominado Col7³⁴. Aparentemente este virus no se transmite por semilla sexual pero si de forma mecánica a plantas de tomate de árbol³⁵ y se reporta que su incidencia era muy baja en cultivos del Norte de Antioquia al momento de su detección.

El cuarto problema viral se denominó “Virosis” del tomate de árbol y se detectó a partir de 1991 en el municipio de Santa Rosa de Osos y en 1992 en el Oriente antioqueño³⁶. Los síntomas de esta enfermedad se manifiestan en hojas y frutos y se caracterizan por la presencia de mosaicos, engrosamiento de nervaduras, ampollas y formación de rosetas. En los frutos verdes se presentan manchas moradas que cambian a diferentes tonalidades rojizas con la maduración, además es frecuente encontrar frutos deformes y con daños en la calidad de la pulpa. Aparentemente el virus no se transmite por semilla pero sí mecánicamente y presenta partículas alargadas y flexuosas de aproximadamente 750 nm de largo^{37,38}.

En el Valle del Cauca se reportó una enfermedad de etiología viral asociada a cultivos de tomate de árbol, cuyos síntomas se manifiestan inicialmente con la presencia de un mosaico leve en hojas jóvenes, además hay presencia de vejigas, deformación y enrollamiento de la lamina foliar. A medida que la enfermedad avanza las hojas se presentan más pequeñas, arrugadas y tienden a caerse prematuramente. En la etapa final hay defoliación y las ramas comienzan a secarse de manera descendente. Sus agentes causales fueron detectados

³² SAÑUDO, B. ORELLANA, G. 1989. Un virus afectando tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) en Valle del Sibundoy, Putumayo. ASCOLFI Informa 15(3): 24.

³³ TAMAYO, P.J. 1996. Enfermedades Virales del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav). Sendt.) en Colombia. ASCOLFI Informa 22(2): 26-29.

³⁴ TAMAYO P.J., ZAPATA J.L., SALAZAR L. F. 1999. El mosaico y la virosis del tomate de árbol en el altiplano norte de Antioquia. Revista Fac. Nal. Agronomía Med. 52: 781-785.

³⁵ TAMAYO, P.J. Op. Cit. Pág. 17

³⁶ SALDARRIAGA A, BERNAL JA. 1994. Virus en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt). 5 pp. En: Resúmenes XV Congreso ASCOLFI. Santafé de Bogotá. Agosto 31 - Septiembre 2 de 1994. 150 p.

³⁷ TAMAYO, P.J. Op. Cit. Pág. 27

³⁸ SALDARRIAGA A., BERNAL JA, TAMAYO P. 1997. Virosis del tomate de árbol. En: Enfermedades del cultivo de árbol en Antioquia: Guía de reconocimiento y control. Boletín técnico CORPOICA.

mediante microscopía electrónica encontrando partículas isométricas y flexuosas que se transmiten mecánicamente y por áfidos³⁹.

Finalmente, la sexta enfermedad viral que afecta al tomate de árbol en Colombia, fue reportada por Betancourth et al.⁴⁰ en Nariño, y su sintomatología corresponde a la presencia manchas aceitosas, clorosis, mosaicos; de igual manera presenta distorsiones en color, tamaño y forma de las hojas y frutos. Su agente causal es un virus de morfología de varilla flexuosa, de 800 nm y cuya transmisión se da mediante áfidos de la especie *M. persicae*.

Más recientemente como resultado del proyecto de Colciencias que financia esta investigación, Jaramillo⁴¹ y Ayala⁴² lograron identificar a los virus PLRV, CMV, AMV, ToRSV, ToMV y al menos a dos potyvirus: PVY y una nueva especie denominada Tamarillo leaf malformation virus (TaLMV), como especies virales asociadas a cultivos de tomate de árbol de diferentes regiones del país.

Como se puede observar, en la literatura citada es frecuente asociar los problemas virales de este cultivo con miembros del género *Potyvirus*, aunque representantes de *Polerovirus*, *Cucumovirus* y *Tobamovirus*, también cobran importancia en diferentes regiones. A continuación se describirán las características generales de estos grupos de virus.

3.4. PRINCIPALES GÉNEROS VIRALES ASOCIADOS AL TOMATE DE ÁRBOL

3.4.1. *Potyviridae*

La mayoría de virus que infectan plantas pertenecen al grupo IV de la clasificación de Baltimore, que corresponde al grupo viral con genoma de ARN monocatenario y sentido positivo. Dentro de este grupo uno de las familias que cobra mayor importancia a nivel mundial es la familia *Potyviridae* por su amplia distribución y patogenicidad.

Los potyvirus son un grupo bastante amplio y de gran importancia económica en la agricultura. La familia está constituida por seis géneros: *Bymovirus* (transmitidos por hongos), *Ipomovirus* (transmitidos por moscas blancas), *Macluravirus* y

³⁹ CHÁVEZ B. & VARÓN F. 2001. Enfermedad de etiología viral en cultivos de tomate de árbol. *Epidemiología Agrícola*. P. 39-43.

⁴⁰ BETANCOURTH C, GOYES R, BRAVO DA. Op. Cit. Pág. 13

⁴¹ JARAMILLO, M. 2009. Op. Cit. Pág 15

⁴² AYALA, M. Op. Cit. Pág 13

Potyvirus (transmitidos por áfidos), *Rymovirus* y *Tritimovirus* (transmitidos por termitas)^{43,44}.

La especie tipo de la familia es el *Potato virus Y* (PVY) que se ha considerado como uno de los virus más importantes que afectan plantas de la familia *Solanaceae*, entre ellas los cultivos de papa, tomate, pimentón, tabaco y berenjena. Los síntomas provocados por la infección depende de la variedad de la planta, la raza del virus y a veces del aislamiento, pero usualmente van desde mosaicos, moteados hasta retrasos en el crecimiento y necrosis foliar y/o de tubérculos⁴⁵. PVY existe como un complejo de cepas o aislamientos que pueden distinguirse basándose en su biología en diferentes plantas hospedantes, secuencia del genoma y/ ó propiedades serológicas⁴⁶. Las cepas que se encuentran bien diferenciadas son conocidas como PVY^O (grupo ordinario), PVY^N (grupo de la necrosis venal del tabaco), PVY^C (grupo del rayado). PVY^O y PVY^C se describen en base a reacciones de hipersensibilidad en las variedades de *Solanum tuberosum* que llevan los genes de resistencia *Nytr* y *NC*, respectivamente, PVY^N no provoca una respuesta de resistencia hipersensible en *S. tuberosum*, pero causa necrosis venal en *Nicotiana tabacum*, distinta a la del mosaico suave y rugosidad provocada por cepas de PVY^O y PVY^{C47}. Los aislamientos clasificados serológicamente como PVY^O pero que pueden sobrellevar los genes *Nytr* y *NC* fueron denominados PVY^Z⁴⁸. De otra parte, PVY^{N-Wilga} consiste en un grupo recombinante que presenta fragmentos de secuencias de las cepas PVY^O y PVY^N⁴⁹, siendo más infeccioso que PVY^O pero causando síntomas menos severos en papa que los aislamientos de PVY^N. Otra cepa recombinante corresponde a PVY^{NTN}, estos aislamientos están relacionados serológicamente con PVY^N e induce necrosis venal en tabaco, pero en *S.*

⁴³ SHUKLA DD, WARD CW, BRUNT AA .1994. The Potyviridae. CAB International, Wallingford

⁴⁴ CHEN J., CHEN J., ADAMS M.J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. Archives of Virology 146: 757–766.

⁴⁵ BUKOVINSZKI A., GÖTZ R., JOHANSEN E., MAISS E., BALÁZS E. 2007. The role of the coat protein region in symptom formation on *Physalis floridana* varies between PVY strains. Virus Research 127: 122–125.

⁴⁶ KERLAN, C., 2006. Description of Plant Viruses: Potato virus Y. Association of Applied Biologists, No. 414 (<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>).

⁴⁷ DEBOKX, J.A., HUTTINGA, H., 1981. Potato virus Y. CMI/AAB Descript. Plant Viruses 242, 6

⁴⁸ KOGOVSEK P., GOWB L., POMPE-NOVAK M., GRUDEN K., FOSTER G.D., BOONHAM N., RAVNIKAR M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. Journal of Virological Methods 149: 1–11.

⁴⁹ GLAIS L., TRIBODET M., KERLAN C. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. Archives of Virology 147: 363–378.

tuberosum son causantes de la enfermedad denominada *Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease* (PTNRD) ⁵⁰.

Todos los miembros de este grupo se caracterizan por ser partículas filamentosas con una longitud de 650 a 900 nm y un ancho de 11 a 13 nm. Se encuentran constituidos por una cubierta proteínica de cerca de 2000 subunidades no recubierta con envoltura, con simetría helicoidal, que rodea al genoma lineal de ARN monocatenario mono o bipartita y cuyo número de nucleótidos oscila entre 8500 y 12000 nt, con una cola poli-A en el extremo terminal 3' y una proteína ligada al genoma en su extremo 5' (VPg).

El genoma o los segmentos del genoma, son traducidos en poliproteínas, las cuales son subsecuentemente procesadas por proteasas codificadas por el virus, en proteínas funcionales (Figura 1). Los virus inducen cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células infectadas, formados por la acumulación de proteínas virales ⁵¹.

El genoma de los miembros del género *Potyvirus* codifica para una poliproteína precursora de 350 kDa⁵² que es subsecuentemente procesada en siete proteínas pequeñas [P1, componente asistente (Helper Component); P3, de inclusión cilíndrica (CI); inclusión nuclear A (NIa); inclusión nuclear B (NIb); proteína de cápside (CP) y dos proteínas putativas conocidas como 6K1 y 6K2⁵³, por acción de tres proteasas de origen viral: la proteinasa P1 y la proteinasa del componente asistente (HC-pro), catalizan solo reacciones autoproteolíticas en los extremos C-terminal ^{54,55}. Los clivajes restantes son catalizados mediante mecanismos trans y autoproteolíticos mediados por la proteína de inclusión nuclear (NIa-Pro), un homólogo de la proteinasa del picornavirus 3C ^{56 57}. El procesamiento y función de todas estas proteínas es aún controversial, pero se cree que muchas de ellas son multifuncionales ^{58, 59}.

⁵⁰ KOGOVSEK P., GOWB L., POMPE-NOVAK M., GRUDEN K., FOSTER G.D., BOONHAM N., RAVNIKAR M. Op. Cit. Pág. 27

⁵¹ CHEN J., CHEN J., ADAMS M.J. Op Cit. Pág. 27

⁵² RIECHMANN J.L., LAIN S. Y GARCIA J.A. 1992. Review Article: Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1-16.

⁵³ IBID.

⁵⁴ CARRINGTON JC, FREED DD, SANDERS TC. 1989. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *Journal of Virology* 63: 4459-4463.

⁵⁵ VERCHOT, J., KOONIN, E.V. & CARRINGTON, J.C. 1991. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185: 527-535.

⁵⁶ CARRINGTON JC, DOUGHERTY WG. 1987. Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* 160: 355-362.

⁵⁷ LANGENBERG WG, ZHANG L. 1997. Immunocytochemistry shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology* 118: 243-247.

⁵⁸ RIECHMANN J.L., LAIN S. Y GARCIA J.A. Op. Cit. Pág. 28

⁵⁹ VERCHOT, J., KOONIN, E.V. & CARRINGTON J. C. Op Cit. Pág. 28

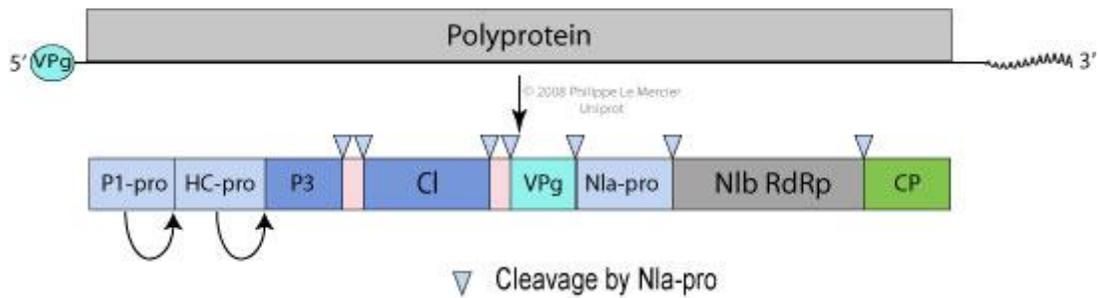


Figura 1. Genoma y proteínas funcionales de los potyvirus.

Fuente: Swiss Institute of Bioinformatics, 2008.

http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/50.html

3.4.2. *Luteoviridae*

Los luteovirus tienen partículas virales icosaédricas de 25-30 nm de diámetro que contienen un genoma de ARN monocatenario positivo de 5300 a 6000 nt. En el caso del género *Polerovirus* son transmitidos únicamente por áfidos, de manera persistente, circulativa y no propagativa. Se agrupan en tres géneros de acuerdo a su organización genómica, estrategias de replicación y mecanismos de expresión: *Luteovirus*, *Polerovirus* y *Enamovirus*. El genoma está dividido en seis marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF0 codifica para la proteína supresora silenciadora, el ORF1 y el ORF2 corresponden a la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), ORF4 codifica para la proteína de movimiento, y los ORF3 y ORF5 para la proteína de la cápside mediante la estrategia de lectura continua (*readthrough*) (Figura 2). Todos los géneros comparten una región conservada en el extremo 3' del genoma, incluyendo los marcos de lectura abiertos de la proteína de la cápside (CP); mientras que en el extremo 5' se han observado diferencias consistentes, con algunos virus presentando una proteína ligada al genoma (VPg)⁶⁰.

⁶⁰ CORRÊA R. L., SILVA T. F., SIMOES A. J. L., BARROSO P.A.V., VIDAL M. S. & VASLIN M.F.S. 2005. Molecular characterization of a virus from the family *Luteoviridae* associated with cotton blue disease. *Archives of Virology* 150: 1357–1367

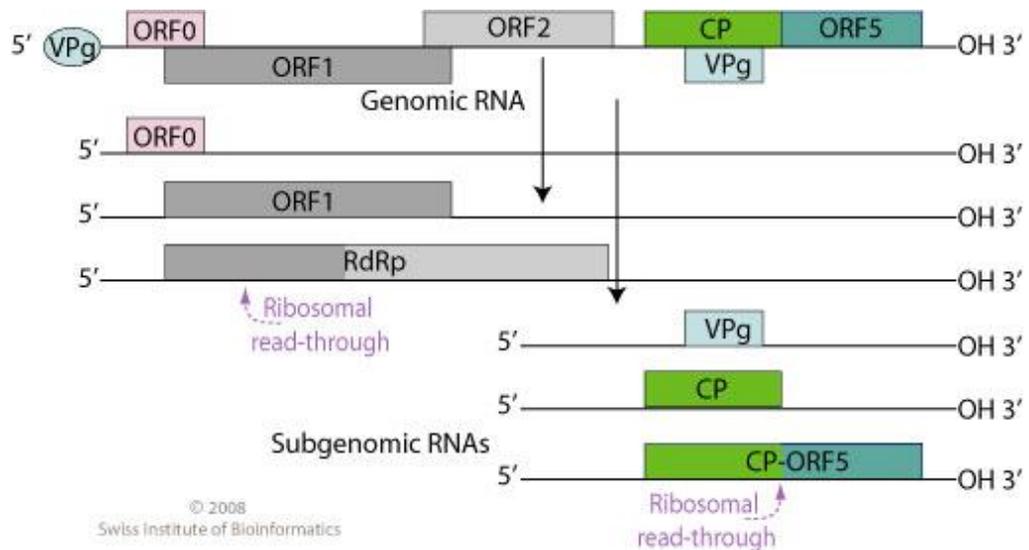


Figura 2. Esquema general del genoma de miembros del género *Polerovirus*.
Fuente. Swiss Institute of Bioinformatics, 2008.
http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/610.html

El virus del género *Polerovirus* se caracterizan por tener un genoma de ARN monocatenario positivo con una longitud total de 5880-5990 nt. El material genético presente dentro de la cápside es usualmente de origen genómico, pero también puede encontrarse ARN subgenómico. La transmisión del virus se da mediante vectores, especialmente áfidos e injertos, no siendo transmitidos por inoculación mecánica, semillas o polen. Sus hospederos son principalmente plantas de la familia *Solanaceae*⁶¹.

⁶¹ BÜCHEN-OSMOND, C. 2006. Index of Viruses - *Tobamovirus*. En: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. (Ed), Columbia University, New York, USA. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/fs_index.htm

3.4.3. *Bromoviridae*

Son partículas de simetría icosaédrica de diámetro de 26-35 nm, contienen un genoma ARN monocatenario positivo y puede ser monomérico, segmentado o tripartita; adicionalmente pueden tener ARNm subgenómico que se deriva del extremo 3' del ARN genómico. Su longitud total es de 7900- 8910 nt, el ARN 1 ha sido completamente secuenciado y tiene 3200- 3644 nt de longitud, el ARN 2 tiene una longitud de 2600-3050 nucleótidos; la longitud del ARN 3 se ha estimado en 2100- 2216 nucleótidos. El ARN 4 que corresponde al ARNm de la cápside, ha sido completamente secuenciado y su longitud es de 800-1000 nucleótidos. El extremo 5' del genoma tiene una caperuza de nucleótidos metilados, mientras que el extremo 3' no cuenta con una cola poli-A y se ha encontrado que tiene secuencias conservadas que oscilan en la mayoría de los virus entre 150- 200 nt de longitud (Figura 3).

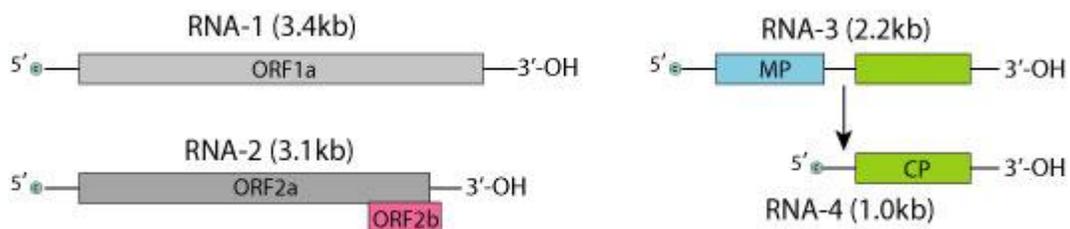


Figura 3. Genoma de los miembros de la familia *Bromoviridae*.

Fuente: Swiss Institute of Bioinformatics, 2008.

http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/31.html

Este grupo se divide en cinco géneros: *Alfamovirus*, *Ilavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* y *Oleavirus*. Los miembros del género *Cucumovirus* tienen un genoma tripartita y un ARN subgenómico, mediante el cual la proteína de la cápside se expresa. Tienen un diámetro de 29 nm y la longitud de su genoma completo es de 8500-8606-8698 nt. Su especie tipo es el Virus del mosaico del pepino CMV (*Cucumber mosaic virus*) y este se caracteriza por infectar plantas de las familias *Cucurbitaceae* y *Solanaceae*, mediante la transmisión por áfidos de forma no persistente y también por medio de semillas. Su genoma tiene cinco ORFs que codifican para diferentes proteínas, en el primero se encuentran los dominios helicasa y metil-transferasa de 111 kDa asociadas a la replicación viral; el segundo ORF codifica para la polimerasa de 97 kDa; el tercer ORF codifica para la proteína 2b, que parece estar involucrada en la virulencia y movimiento de la partícula; el cuarto ORF codifica para una proteína de movimiento involucrada en

el transporte célula a célula; y el quinto ORF que corresponde a la proteína de la cápside de 24 kDa.⁶²

3.4.4. *Tobamovirus*.

Este género de virus, aún no ha sido asignado a una familia. Consisten de varillas rígidas de 70-100 nm y un ancho de 15 a 17 nm, cuya cápside no está envuelta. El genoma es usualmente monomérico o polimérico, no segmentado y contiene una molécula simple de ARN lineal, de sentido positivo. El ácido nucleico encapsidado es principalmente de origen genómico, aunque algunas partículas de algunas especies pueden tener ARNm de origen del huésped o subgenómico. Su longitud total es de 6355 a 6500 nt. El extremo 5' del genoma tiene una caperuza de nucleótidos metilados; el extremo 3' tiene una estructura semejante a tARN (Figura 4). Su especie tipo es el Virus del mosaico del tabaco (TMV); sus hospederos naturales son plantas del Phylum *Magnoliophyta*; clases *Magnoliopsida* o *Liliopsida*; estos virus son transmitidos por insectos del orden *Coleoptera*, por inoculación mecánica, injertos, por contacto entre hospedantes ó por semillas, dependiendo de la especie⁶³.

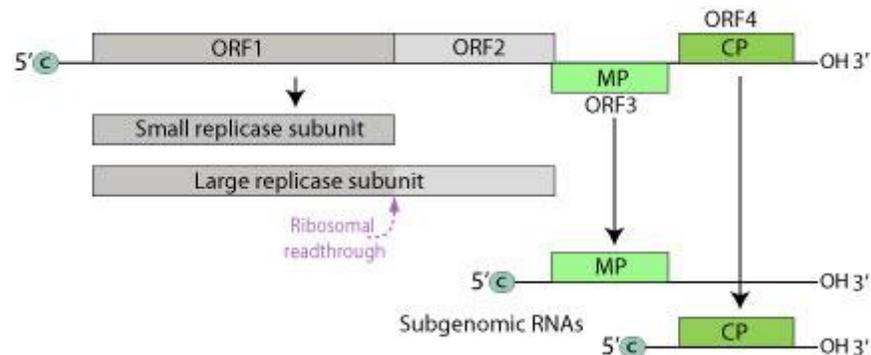


Figura 4. Genoma y proteínas de los tobamovirus.

Fuente: Swiss Institute of Bioinformatics, 2008. http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/51.html

⁶² ADAMS, M. Op. Cit. Pág. 13

⁶³ BÜCHEN-OSMOND, C. Op. Cit. Pág. 30

3.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO VIRAL

Dadas las características físico- químicas y biológicas que presentan los virus, se han desarrollado múltiples técnicas para su diagnóstico basadas en sus componentes proteicos y genómicos.

3.5.1 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Esta técnica es utilizada ampliamente debido a su precisión, simplicidad y bajo costo. Se basa en la capacidad de los animales para producir anticuerpos que reconozcan proteínas, en el caso de los virus, mediante el reconocimiento de la proteína de la cápside. Los anticuerpos son fijados en la superficie de una celda de una placa de microtitulación y se deposita un extracto de la planta. Si el virus de interés está presente en la planta, éste se unirá a los anticuerpos fijados en la superficie. El extracto que no se haya unido es lavado antes de adicionar un segundo anticuerpo que reconoce al primero; este segundo anticuerpo permite la detección indirecta del virus, dado que tiene unida una molécula reportera, usualmente una enzima que reacciona sobre un sustrato originando un cambio en la coloración, que es detectado visualmente por un espectrofotómetro para placas de microtitulación. Este método puede ser usado para evaluar muchas plantas para un sólo virus en una placa, empleando una celda por muestra de planta, o se puede evaluar una sola planta para muchos virus, cargando la placa con diferentes anticuerpos. La mayor limitante de esta técnica es el requerimiento de sueros con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para cada virus, que no tengan una reacción cruzada con proteínas de la planta⁶⁴.

3.5.2 Tissue blot immunoassay (TIBA)

También utiliza anticuerpos producidos contra los virus, pero la savia del tejido vegetal es adicionada a una membrana de nylon o nitrocelulosa y el virus es detectado por una sonda marcada en forma quimioluminiscente o colorimétrica. Este procedimiento es menos laborioso e intensivo que ELISA, es rápido, sensible y simple, al no requerir la extracción del virus. Es de muy bajo costo y adecuado para procesar un número alto de muestras⁶⁵.

⁶⁴ CRAIG, G., STEPHEN, W. WYLIE, J. Y MICHAEL, G., JONES, K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current science* 86: 1604-1607.

⁶⁵ IBID

3.5.3 Transcripción reversa- Reacción en cadena de la Polimerasa (RT- PCR)

Es una técnica muy popular para la detección e identificación de virus de plantas con genomas de ARN. Tiene una gran sensibilidad, y es relativamente de fácil desarrollo. En el caso de los virus de ARN se genera una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN del virus mediante la enzima transcriptasa reversa (RT). Luego, los cebadores oligonucleótidos, flanquean partes del genoma viral y son extendidos por una ADN polimerasa termo estable, en una serie de pasos de desnaturalización, alineamiento y extensión que incrementan exponencialmente el molde de ADN. Una vez termina el proceso, el amplicon es visualizado en geles de agarosa. Adicionalmente, una gran ventaja de este método es que los amplicones pueden ser secuenciados proporcionando información útil para su comparación con las bases de datos moleculares. El aspecto fundamental de la metodología consiste en el adecuado diseño de los cebadores, según se requiera la detección de una cepa o todos los miembros de un género en particular. La mayor ventaja de RT-PCR es su sensibilidad, aunque puede llevar a falsos positivos, como resultado de contaminación, por lo cual la utilización de controles negativos es esencial. Adicionalmente, esta técnica puede tener el problema de la inhibición de la acción enzimática por efecto de diferentes sustancias presentes en los extractos de ácidos nucleicos, generando falsos negativos. Actualmente existen variaciones de la técnica básica para incrementar su sensibilidad, modificar su especificidad o permitir la automatización de la detección.

3.5.3 RT-PCR múltiple

Varias especies o cepas virales son detectadas en una única reacción por combinación de cebadores oligonucleótidos específicos para diferentes virus. Es muy importante que los amplicones sean de diferente tamaño y que no haya reacción cruzada entre ellos.

3.5.4 RT- PCR en tiempo real

Este tipo de RT-PCR utiliza dos cebadores que flanquean la secuencia de interés, y una sonda marcada con fluorocromos en medio de ellos. Al extenderse los cebadores, la sonda es liberada y ocurre la fluorescencia. La ventaja de este método es que no necesita ningún procedimiento para visualizar el producto de la reacción, además que permite la cuantificación del molde a partir del cual ocurrió la amplificación, previa elaboración de una curva estándar de referencia ⁶⁶.

⁶⁶ IBID. Pág. 33

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. SITIO DE MUESTREO

Las muestras de plantas de tomate de árbol con sintomatologías virales fueron colectadas en las veredas San Juan Chico, El Chair y Guacas del Municipio de Córdoba (Nariño), que se encuentra ubicado a los 00° 51' 18" latitud Norte y 77° 31' 16" longitud Oeste, a una distancia de 90 Km de la ciudad de Pasto y a una altura de 2.800 m.s.n.m. Tiene una temperatura media de 12°C y precipitación media anual 1.020 mm. Limita al Norte y Oriente con Puerres y con el departamento de Putumayo, al Sur con Potosí y al Occidente con Ipiales⁶⁷.

4.2. FASE DE CAMPO

4.2.1 Descripción de las principales sintomatologías de origen viral presentes en los cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño).

Se visitaron cinco cultivos de tomate de árbol ubicados en el municipio de Córdoba, con el fin de tomar 30 muestras en cada uno, consistentes de cuatro hojas jóvenes de plantas con síntomas de "Virosis". Se realizó una caracterización detallada de las sintomatologías encontradas teniendo en cuenta el tejido foliar, frutos, flores y estado general de las plantas afectadas (presencia de enanismos, defoliaciones, escobas de bruja etc). Las muestras fueron almacenadas y rotuladas en bolsas plásticas y transportadas al laboratorio de Biología celular y molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, cubiertas con papel toalla y almacenadas dentro de sobres de aluminio para evitar su deterioro⁶⁸.

4.3. FASE DE LABORATORIO

4.3.1 Detección serológica de los virus asociados a los cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño), utilizando pruebas de ELISA.

Para determinar los virus a detectar serológicamente se tuvo en cuenta lo reportado por Vizúete et al.⁶⁹ en Ecuador, quien registró la presencia de los virus PLRV, ToRSV, PVY y CMV, así como otros reportes realizados en Nueva Zelanda

⁶⁷ SITIO OFICIAL DE CÓRDOBA EN NARIÑO (<http://www.cordoba-narino.gov.co>) Consulta: Noviembre de 2008.

⁶⁸ BETANCOURTH, Comunicación personal.

⁶⁹ VIZUETE B., INSUASTI M.L., OCHOA J. Y ELLIS, M., Op. Cit. Pág. 16

y Colombia que indican la presencia de TSWV, AMV y al menos un *Potyvirus* sin identificar.

Inicialmente se formaron muestras compuestas (*bulk*), tomando partes de las hojas de la misma muestra. Se tomaron fracciones de los bulk de hojas/semillas de cada muestra y se pesaron 100 mg de tejido afectado, posteriormente se maceró el tejido con el buffer de extracción 1X (Anexos A y B) para realizar la prueba de ELISA mediante el uso de anticuerpos específicos para los virus PLRV, Potyvirus, CMV, ToRSV, AMV y TSWV, adquiridos en la compañía AGDIA (Indiana, EEUU). En total se evaluaron 13 bulk, correspondientes a las 30 muestras de 4 lotes (3 bulk/lote; 10 muestras/bulk) y 10 muestras del quinto lote. Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia). Cada prueba incluyó un control positivo (suministrado por el fabricante en forma liofilizada) y un control negativo (buffer de extracción). Los pozos considerados con reacción positiva fueron aquellos en los cuales la lectura de absorbancia a 405 nm tuvo un valor mínimo del doble de la lectura obtenida en el control negativo⁷⁰.

4.3.2 Identificación molecular del virus presente en los cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño) mediante la técnica de RT-PCR y secuenciación de regiones del genoma viral.

4.3.2.1 Extracción de ARN

Una vez detectada la presencia de los virus mediante ELISA, se llevo a cabo la extracción de ARN total, para lo cual se empleo el kit RNeasy plant mini kit (QIAGEN, California, USA), macerando 100 mg de tejido foliar/semilla con nitrógeno líquido y utilizando 450 µL de buffer RLT y 10 µL de B-mercaptoetanol, para evitar la oxidación de la muestra. Posteriormente se siguió el protocolo del fabricante hasta obtener ARN, el cual fue resuspendido en 30 µL de agua destilada estéril libre de ARNasas.

4.3.2.2 Pruebas de RT-PCR y secuenciación de regiones diagnósticas de los genomas virales

Las reacciones de RT-PCR se realizaron con el kit QIAGEN OneStep RT-PCR (Anexo C) (California, EEUU) e incluyeron 5 µL de ARN total, 0,6 µM de cada cebador específico para la amplificación de una región diagnóstica de la cápside de cada virus (Anexo D), 1X de Buffer QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 400 µM de dNTPs y 2 µL de mezcla de enzimas QIAGEN (transcriptasa reversa Omniscript, transcriptasa reversa Sensiscript y Polimerasa de ADN HotStarTaq). El programa de amplificación utilizado consta de una fase inicial de síntesis de la primera cadena a 50°C por 30 min, seguido de la activación de la Taq polimerasa

⁷⁰ MATTHEWS R.E.F. Op Cit. Pág. 19

HotStar a 95°C por 15 min y 35 ciclos a 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1,30 min y una extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% suplementado con 4 µL de bromuro de etidio (10mg/mL) y fueron visualizados utilizando un transiluminador UV (Biometra, Göttingen, Alemania). Su tamaño se verificó comparando con el marcador de peso molecular Generuler 100 pb DNA ladder (Fermentas).

La purificación de los amplicones de los virus que tuvieron el tamaño esperado, se realizó mediante el kit PCR-purification (Qiagen) para su posterior secuenciación en la compañía Macrogen (Corea del Sur).

4.3.3 Evaluación de la posible transmisión por semilla sexual de los agentes virales detectados.

Se evaluaron cuatro lotes de tomate en el municipio de Córdoba. Se tomaron por cada lote cuatro muestras de frutos maduros sanos de tomate de árbol (cuatro tomates por muestra), que no presentaban sintomatología de “Virosis” y adicionalmente una quinta muestra sintomática, que se tomó como referencia para los análisis posteriores. Se extrajeron las semillas y se sometieron a un proceso de fermentación durante tres días, seguido de un lavado con abundante agua y secado a temperatura ambiente. Luego, las semillas se sometieron a un tratamiento para eliminar contaminantes externos a la semilla y acelerar su proceso de germinación. Para esto se realizó un lavado con jabón antibacterial y dos gotas de Tween-20 por 15 min, seguido de un enjuague con abundante agua, un segundo lavado con hipoclorito de sodio al 12% y dos gotas de Tween-20 por 15 min, y un enjuague con abundante agua. Finalmente, se dejaron las semillas en suspensión en una solución de ácido giberélico (ProGibb, Bogotá) al 1% durante 24 h a 4°C ⁷¹.

De cada lote de semilla se pesaron 100 mg, procediéndose a su maceración con el fin de realizar pruebas de ELISA para los virus PLRV, Potyvirus, CMV, ToRSV, AMV y TSWV, siguiendo la metodología antes descrita.

Adicionalmente, las semillas restantes, se pusieron a germinar, con el fin de obtener plántulas que nuevamente se evaluaron mediante la técnica de ELISA para detectar la presencia de posibles virus que pudieran ser transmitidos a través de la semilla. Estas evaluaciones se realizaron bajo invernadero, en cubículos cubiertos con malla anti-áfido y en una región (Medellín) donde no se presentan cultivos de papa ni de tomate de árbol, que pudieran servir de fuente de inóculo potencial de vectores virulíferos.

⁷¹ BETANCOURTH. Op. Cit. Pág. 35

Finalmente, con base en los resultados aportados por el análisis de ELISA, se llevo a cabo la amplificación mediante RT- PCR de las regiones diagnósticas del gen de la cápside de los virus detectados, siguiendo las indicaciones mencionadas para las pruebas en tejido foliar.

4.3.4 Definición de relaciones filogenéticas entre las variantes del virus predominantes en cultivos de tomate de árbol del municipio de Córdoba y secuencias relacionadas depositadas en el Genbank.

Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante el software BioEdit 6.0.6, construyéndose secuencias consenso y confirmándose su identidad con genes virales por comparación con las bases de datos moleculares, mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>). Esta información permitió realizar comparaciones de los niveles de identidad entre las regiones secuenciadas de las cepas virales que afectan los cultivos de tomate de árbol en Córdoba (Nariño) y aquellas reportadas en el GenBank para otros cultivos y países. Para esto se alinearon las secuencias mediante el software Clustal W y la matriz generada se utilizó para obtener un árbol filogenético mediante el método de Máxima parsimonia utilizando el software PAUP 4.0b10⁷². El soporte de la topología interna de los dendrogramas fue determinado por análisis de bootstrap con base en 1000 remuestreos⁷³.

⁷² SWOFFORD D. L. 1998. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version: 4. Sunderland, USA: Sinauer Associates.

⁷³ FELSENSTEIN J .1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791

5. RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS SINTOMATOLOGÍAS DE ORIGEN VIRAL PRESENTES EN LOS CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL EN EL MUNICIPIO DE CÓRDOBA (NARIÑO).

Se realizó un muestreo en cinco fincas cultivadas con tomate de árbol en el municipio de Córdoba, correspondientes a las veredas de Guacas y El Chair. Se encontró una sintomatología basal predominante, que corresponde a mosaicos foliares con ampollamientos, deformación de brotes y cambios en la apariencia (color, consistencia, forma) de flores y frutos. Estos síntomas estuvieron además acompañados por la presencia de manchas aceitosas en la superficie foliar y la formación de anillos necróticos en las hojas. Un síntoma generalizado en estados más avanzados de la infección de plantas de tomate de árbol, fue la defoliación y reducción en el crecimiento de las plantas, aunque otros factores bióticos y abióticos también pudieran ser corresponsables de dichos cuadros sintomáticos (Figuras 5A, 5B y 6).

Fig. 5A. Estado general de los cultivos de tomate de árbol afectados por "Virosis" en el municipio de Córdoba (Nariño).



Fig. 5B. Manchas aceitosas y anillos necróticos en tejido foliar de plantas de tomate de árbol en Córdoba (Nariño).



Fig. 6: Sintomatología en frutos encontrada en cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño).



5.2 DETECCIÓN SEROLÓGICA DE LOS PRINCIPALES VIRUS ASOCIADOS A LA “VIROSIS” DEL CULTIVO DEL TOMATE DE ÁRBOL EN EL MUNICIPIO DE CÓRDOBA (NARIÑO).

Las pruebas de ELISA revelaron que la incidencia de Potyvirus en los 13 bulk de muestras bajo análisis fue del 100 %, obteniéndose valores de absorbancia mucho mayores que el doble del control negativo. En cuanto a PLRV se observó una incidencia del 70%, mientras que ToMV y CMV presentaron frecuencias de detección de del 54% y 30,7 %, respectivamente. Con la utilización de los anticuerpos adquiridos en la compañía Agdia, no fue posible detectar los virus ToRSV ni TSWV en ninguna de las muestras analizadas. En la tabla 1 se presentan los valores de absorbancia para los bulk de muestras realizados en cada lote.

Tabla 1. Valores de absorbancia obtenidos en las pruebas de ELISA para los virus evaluados en plantas de tomate de árbol. Las celdas resaltadas corresponden a las muestras que resultaron positivas bajo el criterio de dos veces el valor del control negativo

Vereda	Lote	Potyvirus	PLRV	CMV	ToMV	ToRSV	TSWV
Chair	AI	0,848	0,721	0,16	0,075	0,115	0,098
	AII	0,637	0,589	0,143	0,068	0,102	0,099
	AIII	1,401	0,485	0,282	0,066	0,11	0,075
San Juan Chico	BI	3,497	0,224	0,108	0,072	0,094	0,092
	BII	3,332	0,506	0,099	0,061	0,092	0,089
	BIII	1,809	0,32	0,122	0,068	0,096	0,091
	CI	1,82	0,532	0,196	0,13	0,096	0,095
	CII	1,488	0,184	0,123	0,16	0,096	0,106
	CIII	2,604	0,465	0,127	0,148	0,101	0,092
Guacas	DI	0,507	0,106	0,381	0,154	0,089	0,094
	DII	2,129	0,084	0,162	0,152	0,088	0,101
	DIII	1,063	0,073	0,295	0,151	0,102	0,095
	EI	1,221	0,079	0,125	0,131	0,101	0,125
	C+	3,369	0,285	3,369	0,681	0,182	0,162
	C-	0,086	0,078	0,086	0,062	0,078	0,078
	Doble C -	0,172	0,156	0,172	0,124	0,156	0,156

5.3 Identificación a nivel de especie los virus que afectan los cultivos de tomate de árbol en el municipio de Córdoba (Nariño).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con las pruebas de ELISA se evaluaron las muestras en pruebas de RT-PCR con juegos de cebadores para los virus: PVA, PVY (Potyvirus), PLRV, ToRSV y ToMV. Además se evaluaron cebadores para el virus PVX que afecta el cultivo de la papa y podría también presentarse en tomate de árbol y del virus AMV, reportado en este cultivo en otros países (Vizueté, 1990; Eagles, 1994). Estas pruebas permitieron obtener los amplicones del tamaño esperado para PLRV y PVY, en cuatro muestras diferentes pertenecientes a las veredas: San Juan Chico, El Chair y Guacas del municipio de Córdoba (Tabla 2)

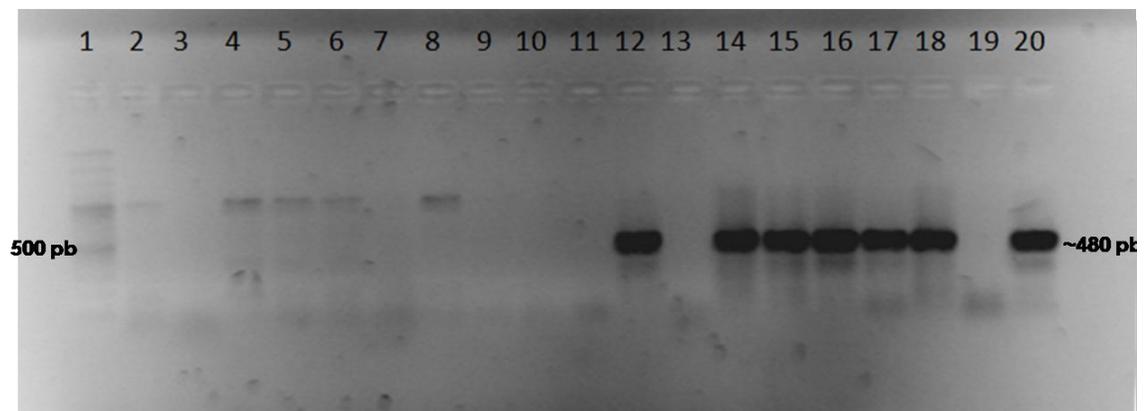
Tabla 2. Procedencia de las muestras en las cuales se obtuvieron productos amplificados de los virus PVY y PLRV.

Muestra original	Código de muestra secuenciada	Procedencia	Virus detectado
V1- 8C5	25col	Vereda San Juan Chico	PLRV
8C1	28col	Vereda San Juan Chico	PLRV
C2AN	45col	Vereda el Chair	PVY
C4MA	46col	Guacas	PVY

5.3.1 Análisis de secuencias de PVY.

Se obtuvieron bandas del peso esperado de 480 pb para el virus PVY en siete muestras (figura 7), de las cuales dos fueron confirmadas como pertenecientes a una porción del gen de la cápside viral mediante su secuenciación (figura 8). Una vez establecidas las secuencias consenso, su comparación con cepas de referencia de este virus obtenidas del GenBank y procedentes de diferentes lugares del mundo (Japón, Estados Unidos, China, Corea del Sur y Reino Unido), permitieron definir niveles de identidad superiores al 92% (Tabla 3).

Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa de ocho muestras de las veredas San Juan Chico, El Chair, El Cascajo y Guacas del Municipio de Córdoba. Productos de PCR con cebadores para PVY. 12: C1ANPVY, 13: C1MAPVY, 14: C2ANPVY, 15: C2MAPVY, 16: C3ANPVY, 17: C3MAPVY, 18: C4ANPVY, 20: C4MAPVY. Las muestras enviadas para secuenciación corresponden a los pozos 14 y 20.



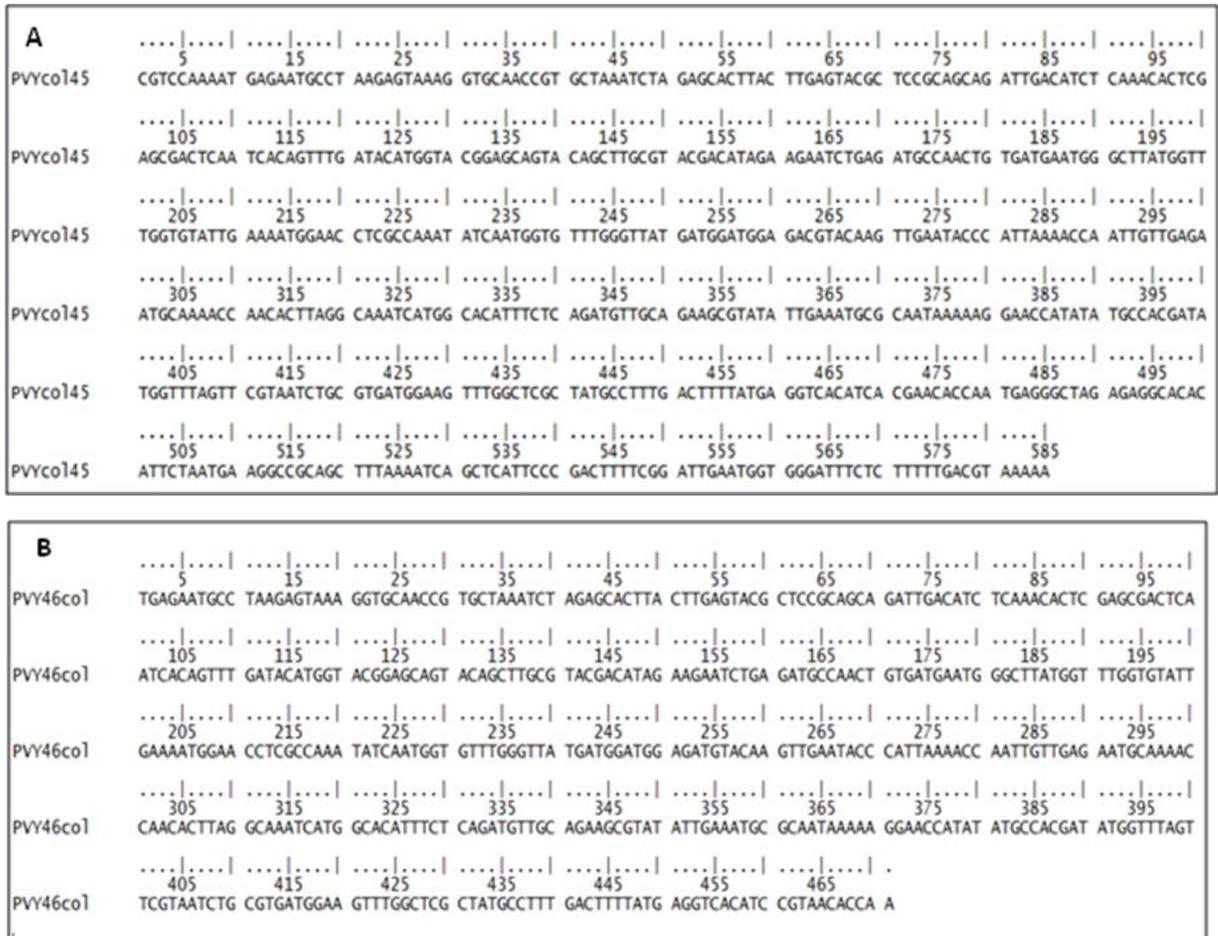


Fig. 8 Secuencias consenso de A) PVY 45COL y B) PVY 46COL provenientes de cultivos de tomate de árbol en Córdoba, Nariño.

Tabla 3. Secuencias que presentaron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de PVY de Córdoba, Nariño.

45COL				46COL			
Procedencia	cod. GB	Raza	% de identidad	Procedencia	cod. GB	Raza	% de identidad
Japón1	AB331548.1	NTN	92%	Corea del sur	EU885418.1		92%
Japón2	AB331517.1	NTN	92%	Reino Unido3	AJ585342.1	NTN	92%
EE.UU1	AY884984.1	NA-N/NTN	92%	Japón1	AB331548.1	NTN	92%
China	FJ766534.1	-	92%	Japón2	AB331517.1	NTN	92%
Japón3	AB331549.1	NTN	92%	Japón4	AB295478.1	N	92%
Reino Unido1	EF027861.1	N	92%	EE.UU1	AY884984.1	NA-N/NTN	92%
Reino Unido2	EF027859.1	N	92%	EE.UU2	FJ204166.1	NTN	92%

A

PLRV25COL	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95
	TCGCGCTAAC	AGAGTTCAGC	CAGTGGTTAT	GGTCACGGCC	CCTGGGCAAC	CCAGGCGCCG	AAGACGCAGA	AGAGGAGGCA	ATCGCCGCTC	AAGAAGAACT
PLRV25COL	105	115	125	135	145	155	165	175	185	195
	GGAGTTCGCC	GAGGACGAGG	CTCAAGCGAG	ACATTCGTGT	TTACAAAGGA	TAACCTCGTG	GGCAACTCCC	AAGGAAGTTT	CACCTTCGGG	CCGAGTCTAT
PLRV25COL	205	215	225	235	245	255	265	275	285	295
	CAGACTGTCC	GGCATTCAAG	GATGGAATAC	TCAAGGCCTA	CCATGAGTAT	AAGATCACAA	GTATCTTACT	TCAGTTCGTC	AGCGAGGCGCT	CTCCACCTC
PLRV25COL	305	315	325	335						
	CGCCGGCTCC	ATCGCTTATG	AGTTGGACCC	CCATTGC						

Al alinearse las secuencias obtenidas de las muestras 8C1 y 8C5 con las depositadas en el Genbank se obtuvieron porcentajes de identidad del 98% y 99% con cepas de PLRV procedentes de Irán, China, Filipinas, República Checa e India, entre otros (Tabla 4).

Tabla 4: Secuencias que presentaron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de PLRV

Procedencia	cod. GI	cod. GB	% de identidad
Shiraz, Irán	218664703	FJ481107.1	99%
	332748	M89926.1	99%
Yunnan, China 1	226934645	FJ859021.1	98%
Jordán, Filipinas	194031744	EU073862.1	98%
Jordán, Filipinas	194031742	EU073861.1	98%
República Checa	189418907	EU717545.1	98%
India	23395256	AF539791.1	98%
Canada	222301	D13954.1	98%
Australia	222300	D13953.1	98%
Clon	222290	D13753.1	98%
China 2	118198312	EF063711.1	98%

5.2 EVALUACIÓN DE LA POSIBLE TRANSMISIÓN POR SEMILLA SEXUAL DE LOS AGENTES VIRALES DETECTADOS.

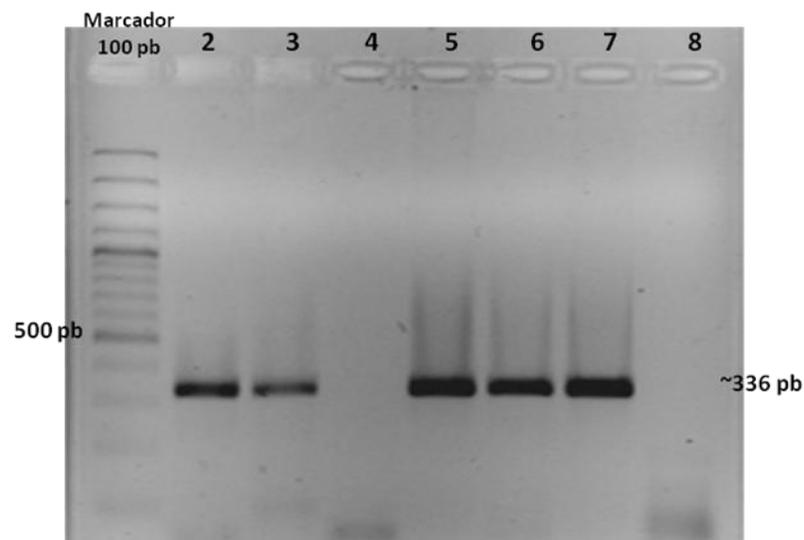
Se evaluaron semillas procedentes de cuatro lotes del municipio de Córdoba con pruebas de ELISA para los virus AMV, CMV, ToMV, ToRSV, TSWV, PLRV y Potyvirus. Estas pruebas registraron resultados positivos únicamente para el virus PLRV en semillas sexuales obtenidas de plantas con síntomas de “Virosis”

(muestras 5) de tres lotes. Al confirmar dicho resultado mediante RT-PCR, se logró obtener los amplicones esperados en dichas muestras (Figura 11).

Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos en la prueba de ELISA con anticuerpos para PLRV. Las celdas resaltadas corresponden a las muestras que resultaron positivas para el virus PLRV.

L1M1	0,14	L2M1	0,118	L3M1	0,154	L4M1	0,11
L1M2	0,128	L2M2	0,114	L3M2	0,137	L4M2	0,22
L1M3	0,124	L2M3	0,129	L3M3	0,171	L4M3	0,215
L1M4	0,128	L2M4	0,116	L3M4	0,119	L4M4	0,115
L1M5	0,539	L2M5	0,273	L3M5	3,228	L4M5	0,114
C+	0,686	C-	0,128	Doble C-	0,256		

Fig. 11 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de RT-PCR con cebadores específicos para PLRV en muestras de semilla sexual de tomate de árbol. 2: muestras semillas La Unión, Antioquia; 3: muestra semillas Putumayo (L4M3); 4: muestra semillas Putumayo (L4M5); 5: muestra semilla Nariño (L1M5); 6: muestra semilla Nariño (L2M5); 7: muestra semilla Nariño (L3M5); 8: Control negativo.



Una vez germinadas las semillas se sometieron a un periodo de crecimiento en invernadero durante 2 meses, al cabo de este tiempo se tomó el tejido foliar de las plántulas evaluadas y se sometió a la prueba de ELISA, sin encontrar ninguna muestra con reacción positiva para PLRV (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de absorbancia de plántulas mantenidas bajo invernadero, para la prueba de ELISA con anticuerpos para PLRV.

L1Sanas I	0,234	L2 sanas II	0,127	L3 sanas II	0,199	L4 sanas II	0,238
L1 sanas II	0,225	L2 sanas III	0,232	L3 sanas III	0,201	L4 sanas III	0,249
L1M5 I	0,178	L2M5 I	0,248	L3M5 I	0,203	L4 sanas IV	0,25
L1M5 II	0,175	L2M5 II	0,225	L3M5 II	0,234	L4M5 I	0,248
L2 sanas I	0,179	L3 sanas I	0,198	L4 sanas I	0,229		
C+	1,827	C-	0,129	Doble C-	0,258		

5.3 DEFINICIÓN DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS VARIANTES VIRALES ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL DE CÓRDOBA.

6.5.1 Análisis filogenético para PVY.

Para el análisis filogenético de las secuencias de PVY se tomaron las siete secuencias que tuvieron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias de Córdoba 45 y 46 Col y adicionalmente se incluyeron secuencias de las cepas de referencia de las razas de PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN} y de aislamientos afectando cultivos de papa en el departamento de Antioquia (Gil et al., 2009) (Tabla 7). Como grupo externo de análisis se estableció el potyvirus BYMV (*Bean Yellow Mosaic Virus*) (Figura 12).

El análisis filogenético realizado teniendo en cuenta la región que codifica para la proteína de la cápside se basó en 480 caracteres, de los cuales 280 fueron constantes, 120 variables no informativos y 80 informativos; los índices de consistencia, retención y homoplasia fueron de 0,806, 0,783 y 0,194. El dendrograma resultante indicó una clara separación entre los aislamientos de PVY provenientes de Córdoba y las otras secuencias de PVY incluidas como referencia, separación soportada por valores de bootstrap del 100% (Figura. 13). Por otra parte, las secuencias de PVY provenientes de cepas afectando cultivos de papa en Antioquia, se agruparon en un clado que contenía aislamientos de las razas PVY^N y PVY^{NTN}.

Tabla 7. Secuencias utilizadas para la elaboración del análisis filogenético de las secuencias de PVY.

Procedencia	cod. GB	Aislamiento/ Raza	Hospedero	Autores
Argentina	X14136	PVY-O-Am/O	<i>S.tuberosum</i>	Boonham et al., 2002
Suiza	AJ223595	0854-O/O	-	Boonham et al., 2002
Polonia	Z70239	PVY-O-LW/O	<i>S.tuberosum</i>	Boonham et al., 2002
Canadá	U09509	PVY O-139/ O	<i>S. tuberosum</i>	Ogawa & Tomitaka, 2007
Chile	X68221	PVY-Chi/-	-	Boonham et al., 2002
Japón4	AB295478.1	SYR-D9/N	<i>N. tabacum cv. samsun</i>	Chinkh, 2009
Reino Unido1	EF027861.1	V983545/N	-	Gow & Glober, 2006
Reino Unido2	EF027859.1	S-RB/N	-	Gow & Glober, 2006
Japón1	AB331548.1	NTNH091/NTN	<i>S. tuberosumcv. Danshaku</i>	Ogawa & Tomitaka, 2007
Japón2	AB331517.1	NTNH090/NTN	<i>S. tuberosumcv. Danshaku</i>	Ogawa & Tomitaka, 2007
Japón3	AB331549.1	NTNH090/NTN	<i>S. tuberosumcv. Danshaku</i>	Ogawa & Tomitaka, 2007
EE.UU1	AY884984.1	RRA/NA-N/NTN	-	-
Reino Unido3	AJ585342.1	NIB NTN/NTN	<i>S.tuberosum</i>	Barker & Doblak, 2004
EE.UU2	FJ204166.1	HR1/NTN	-	Hu & Meacham, 2009
Col13	-	ENA Son PVY	<i>S. tuberosum</i>	Gil et al., 2009
Col17	-	EF Uni pur	<i>S. tuberosum</i>	Gil et al., 2009
BYMV	EU082122	BYMV	<i>Lupinus luteus</i>	Wylie & Jones, 2008

Los índices de retención consistencia y homoplasia, muestran la confiabilidad del árbol construido, y la baja probabilidad de que las asociaciones mostradas en el sean producto de convergencias o paralelismo.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FVYco145  ACGTCCAAAATGAGAAATGCCTAAGAGTAAAGGTGCAACCGTGCTAAATCTAGAGCATTACTTGAGTACGCTCCGCAGCAG
FVY46co1  .....
FVY-0 ARG      .....C.GA.C.G.A.T.G..C..C..CT...A...G..C...T...A..A..A
FVY-0 CANADA   .....C..A..C..G..A..G..T...G...T...A...G...T...A..A..A
FVY-0 POLONIA  .....C..A..C..G..A...CT...A...G...T...A..A..A
FVY-0 SUIZA    .....C..A..C..G..A...CT...A...G...T...A..A..A
FVY CHILE NEC  .....A.....C.CA.C...A...A..G..CT...A...C...T..C..A...
FVY-NJAPON4    .....C.....T...T.G.A...C...T...A...A
FVY-N RU1      .....C.....G...T.A...T.G.A...C...T...A...A
FVY-N RU2      .....C.....G...T.A...T.G.A...C...T...A...A
FVY-NA-N/NTN EE.UU1  .....C.....G...T.A...T.G.A...C...T...A...A
FVY-NTN EE.UU2  .....C.....T.A...T.G.A...C...T...A...A
FVY-NTNJAPON1  .....C.....G...T.A...T.G.A...C...T...A...A
FVY-NTN JAPON2  .....C.....G...T.A...T.G.A...C...T...A...A
FVY-NTN JAPON3  .....C.....G...T.A...T.G.A...C...T...A...A
FVY-NTN RU3    .....C.....T.A...T.G.A...C...T...A...A
13Co1PVY      .....C.....T.A...T.G.A...C...T...A...A
17Co1 PVY     .....C.....G...T.A...T...A...G..C...T...A...A
BYMV          G..AGGA...C..A..AT..T..C...T..GGT..AAAG..TA...C...T...C...G..G..A..TAAC..A..CA...

```

```

      110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FVYco145  GAGCGACTCAATCACAGTTTGATACATGGTACGGAGCAGTACAGCTTGCGTACGACATAGAAGAATCTGAGATGCCAACTG
FVY46co1  .....
FVY-0 ARG      ..G..A.....G...T.AG..G..G.G.A.G..A.....G.C..A.....
FVY-0 CANADA   ..G..A.....G...T.AG..G..G.G.A.G..A.....G..A.....
FVY-0 POLONIA  ..G..A.....G...T.AG..G..G.G.A.G..A.....G..A.....
FVY-0 SUIZA    ..G..A.....G...T.AG..G..G.G.A.G..A.....G..A.....
FVY CHILE NEC  .....A.....G...T.A...G.GAG...A.....GG...A.....
FVY-NJAPON4    .....A.....G...T.A...G...A...A.....G...A...A.....
FVY-N RU1      .....A.....T.A...A...A...A.....G...A...A.....
FVY-N RU2      .....A.....T.A...A...A...A.....G...A...A.....
FVY-NA-N/NTN EE.UU1  .....A.....T.A...A...A...A.....G...A...A.....
FVY-NTN EE.UU2  .....A.....G...T.A...G...A...A.....G...A...A.....
FVY-NTNJAPON1  .....A.....T.A...A...A...A.....G...A...A.....
FVY-NTN JAPON2  .....A.....T.A...A...A...A.....G...A...A.....
FVY-NTN JAPON3  .....A.....T.A...A...A...A.....G...A...A.....
FVY-NTN RU3    .....A.....G...T...G...A...A.....G...A...A.....
13Co1PVY      .....A.....G...T.A...G...A...A.....G...A...A.....
17Co1 PVY     .....A.....T.A...A...A...A.....G...A...A.....
BYMV          T...A..A...G.....AG.G...AAT.GT..CA...AA...T..GG.T..G..T..AC.A...GG..T.A

```

```

      210     220     230     240     250     260     270     280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FVYco145  TTGGTGTATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATATCAATGGTGGTGGTTATGATGGATGGAGACGTACAAGTTGAATACCC
FVY46co1  .....
FVY-0 ARG      .....C.....G.....C..A.....GA.T.A.....
FVY-0 CANADA   .....C.....G.....C..A.....GA.T.A.....G...
FVY-0 POLONIA  .....C.....G.....C..A.....GA.T.A.....G...
FVY-0 SUIZA    .....C.....G.....C..A.....GA..A.....G...
FVY CHILE NEC  .....C.....C.....C..A.....GA.T.A.....
FVY-NJAPON4    .....C.....C.....C..A.....T.A.....C...
FVY-N RU1      .....C.....C.....A.....T.A.....C...
FVY-N RU2      .....C.....C.....A.....T.A.....C...
FVY-NA-N/NTN EE.UU1  .....C.....C.....A.....T.....C...
FVY-NTN EE.UU2  .....C.....C.....C..A.....T.A.....C...
FVY-NTNJAPON1  .....C.....C.....A.....T.A.....C...
FVY-NTN JAPON2  .....C.....C.....A.....T.A.....C...
FVY-NTN JAPON3  .....C.....C.....A.....T.A.....C...
FVY-NTN RU3    .....C.....C.....C..A.....T.A.....C...
13Co1PVY      .....C.....C.....C..A.....T.A.....C...
17Co1 PVY     .....C.....T.....C.....A.T.A.....C...
BYMV          G...C..A...C..C..A..AGG.G..T.AC.A...AA..ACA.....G.A...G..GAC...

```

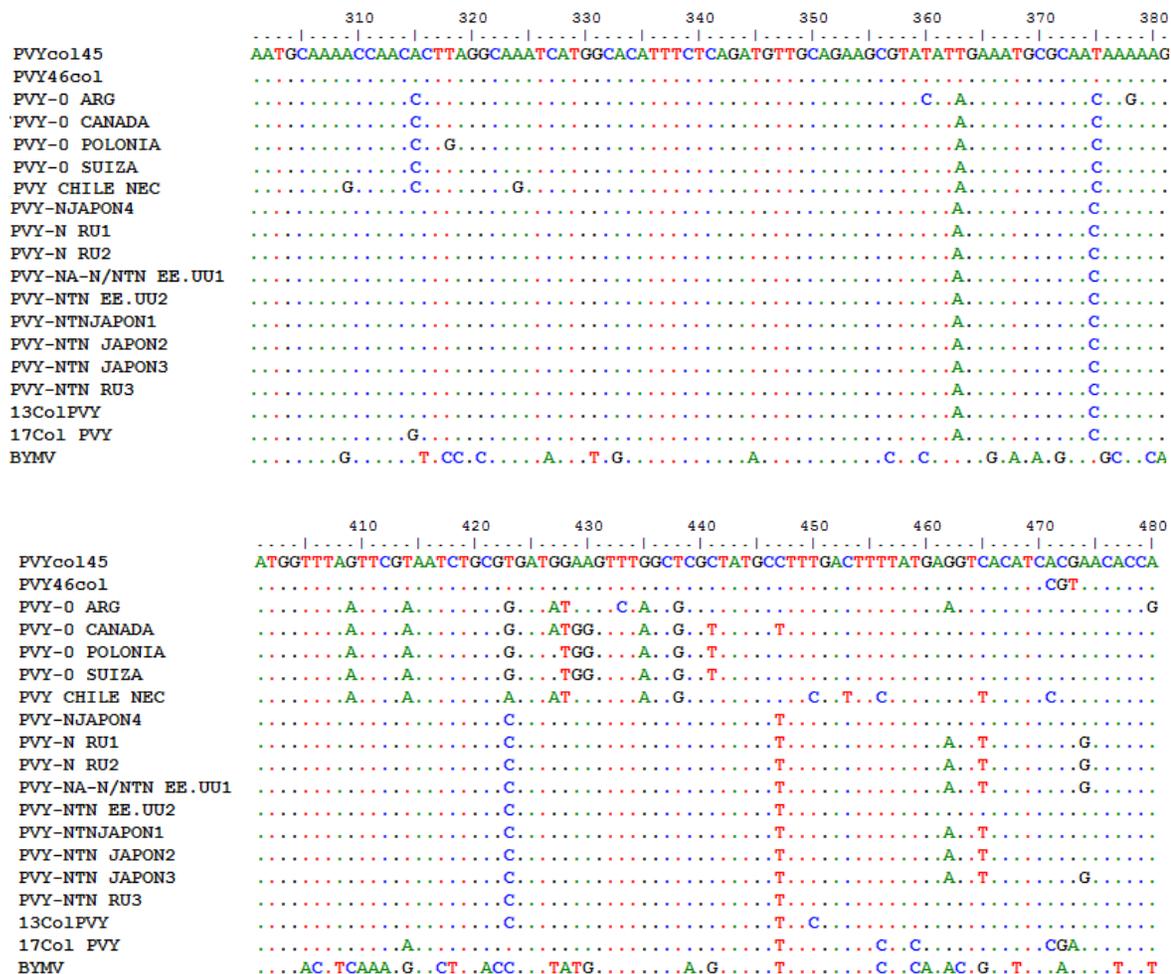


Fig. 12. Alineamiento múltiple de secuencias de PVY empleando el algoritmo Clustal W. Los puntos indican las identidades entre las secuencias.

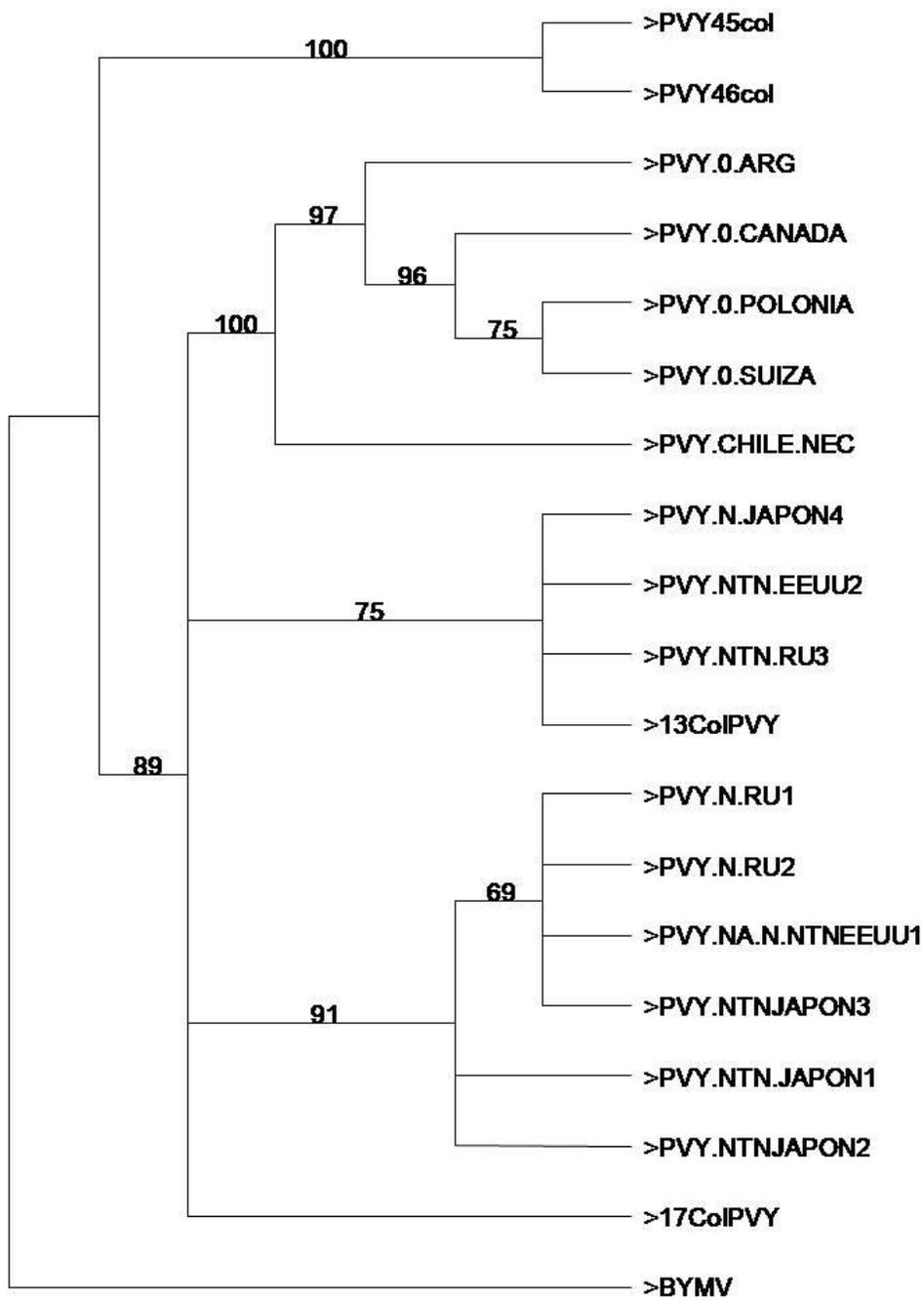


Fig. 13 Árbol filogenético basado en secuencias del gen de la cápside viral de cepas de PVY de Colombia y otros lugares del mundo. Los valores de bootstrap se presentan sobre las ramas.

6.5.2 Análisis filogenético para PLRV

Para el análisis de las secuencias PLRV 25 COL y 28 COL se emplearon las 11 secuencias del Genbank que presentaron el mayor porcentaje de identidad con las muestras de este estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencias obtenidas del Genbank utilizadas como referencia para el análisis filogenético de las secuencias de PLRV obtenidas de cultivos de tomate de árbol en Córdoba (Nariño).

Procedencia	cod. GB	Aislamiento	Hospedero	Autores
Shiraz, Irán	FJ481107.1	Shiraz	S. <i>tuberosum</i>	Heydarnejad & Pooramini, 2009
	M89926.1	Clon LR7	-	Griffin, J.D. et al, 1992
Yunnan, China 1	FJ859021.1	Yunnan 123	S. <i>tuberosum</i>	Zhang & Dong, 2007
Jordán, Filipinas1	EU073862.1	G20	S. <i>tuberosum</i>	Odeh & Anfoka, 2008
República Checa	EU717545.1	Virubra	S. <i>tuberosum</i>	Pichova & Cerovska, 2009
India	AF539791.1	-	-	Chakrabarti, S.K. et al, 2002
Canada	D13954.1	Canadá	ClonPLP93	Keese & Martin, 1990
Australia	D13953.1	Australia	-	Keese & Martin, 1990
Cuba	AF453393	Cu87	-	Guyader & Giblot, 2002
Perú	AF453392	CIP01	-	Guyader & Giblot, 2002
Francia	NC_003491.1	2ITB/BYMV	-	Richards, K., 2002

El análisis filogenético se realizó con base en 340 caracteres, de los cuales 245 fueron constantes, 88 variables pero no informativos y 7 informativos. Se obtuvieron valores de 0,960, 0,800 y 0,040 para los índices de consistencia, retención y homoplasia, respectivamente.

El dendrograma generado agrupó en un solo clado, soportado por un valor de bootstrap del 100%, a todos los aislamientos de PLRV, independientemente de su país de origen o cultivo de procedencia (papa ó tomate de árbol) (Figura 15). Sin embargo, debido a los bajos niveles de variación que presentaron dichas secuencias, las ramas internas de dicho clado presentaron bajos valores de bootstrap. El clado principal estuvo bien diferenciado del grupo externo BMVYV (*Beet mild yellowing virus*), otro virus perteneciente al género *Polerovirus*.

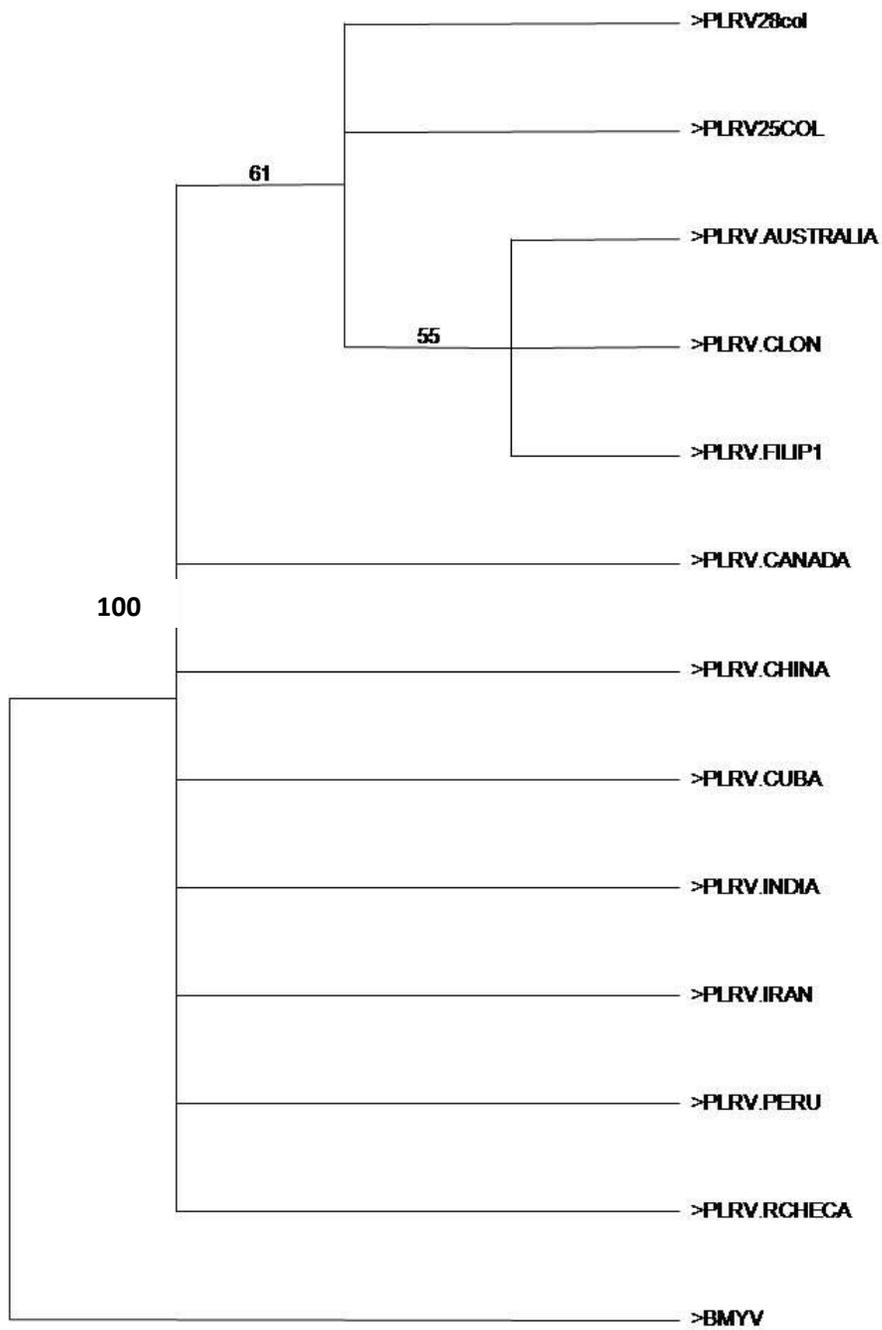


Fig. 15. Árbol filogenético basado en secuencias del gen de la cápside viral de cepas de PLRV de Colombia y otros lugares del mundo.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 SÍNTOMAS

Al analizarse las muestras foliares procedentes de cultivos de tomate de árbol en Córdoba (Nariño), se observaron diversas patologías que incluyen la reducción en crecimiento de las plantas, distorsión en la forma de las hojas y de los brotes, mosaicos diversos, ampollamientos, manchas cloróticas y necróticas y amarillamiento de la superficie foliar, entre otros; todos éstos característicos de las infecciones virales⁷⁴ y previamente reportados en *S. betaceum* por varios autores del país^{75,76,77,78,79, 80} y otros lugares del mundo^{81, 82, 83}.

Betancourth et al. en el 2003 reportaron la sintomatología de manchas aceitosas afectando cultivos de tomate de árbol en Ipiales (Nariño) y a partir de observaciones de microscopía electrónica determinaron la presencia de partículas flexuosas de 800nm probablemente asociadas a especies del género *Potyvirus*. En el presente estudio las muestras fueron evaluadas serológicamente con anticuerpos específicos para diferentes virus, lográndose confirmar la presencia de potyvirus en este cultivo, los que además resultaron con una incidencia del 100% en las muestras bajo análisis. Adicionalmente, las pruebas de ELISA permitieron detectar la presencia de los virus PLRV, ToMV y en menor grado de CMV en dichas muestras, situación que confirma que la enfermedad denominada en términos genéricos como "Virosis" del tomate de árbol es causada por un complejo viral, que presenta al menos un potyvirus además de diferentes virus isométricos de los géneros *Polerovirus* y *Cucumovirus* y de un tobamovirus (ToMV). Resultados similares fueron recientemente encontrados por Jaramillo⁸⁴ para cultivos de Antioquia, Cundinamarca y Boyacá, y por Ochoa & Insuasti⁸⁵ en Ecuador.

⁷⁴ CANN , A. J. Op. Cit. Pág. 19

⁷⁵ SALDARRIAGA A., BERNAL JA, TAMAYO P. Op. Cit. Pág. 25

⁷⁶ BETANCOURTH C, GOYES R, BRAVO DA. Op. Cit. Pág. 13

⁷⁷ CRUZ L.F. 2005. Identificación de virus en *Solanum betaceum*. 2005. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. 48p.

⁷⁸ CUSPOCA J. 2007. Evaluación de virus en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. 43p

⁷⁹ JARAMILLO, M. Op. Cit. Pág 15.

⁸⁰ AYALA, M. Op. Cit. Pág. 13

⁸¹ OCHOA L, J. Y INSUASTI A, M. Op. Cit. Pág.16

⁸² VIZUETE B., INSUASTI M.L., OCHOA J. Y ELLIS, M., Op. Cit. Pág. 16

⁸³ EAGLES R. M, GARDNER R. C, FORSTER R. Op. Cit. Pág. 16

⁸⁴ JARAMILLO, M. Op. Cit. Pág 15.

⁸⁵ OCHOA L, J. Y INSUASTI A, M. Op. Cit. Pág.16

Un hecho para destacar es la presencia de altas poblaciones de áfidos y mosca blanca en los cultivos visitados, lo cual es un factor fundamental para la propagación de las enfermedades virales, puesto que son los principales vectores de transmisión de una amplia gama de virus, entre ellos, los pertenecientes a los géneros *Potyvirus*, *Polerovirus* y *Cucumovirus*^{86, 87, 88}. En este sentido, de gran interés resulta el trabajo recientemente reportado por Martínez⁸⁹, quien basado en análisis de secuencias de la región del gen mitocondrial Citocromo oxidasa (COI), logró identificar a las especies de áfidos: *Aphis gossypii* y *Macrosiphum euphorbiae* como frecuentemente asociadas a los cultivos de tomate de árbol en Colombia, encontrando además mediante pruebas de ELISA, la presencia de partículas virales del género *Potyvirus* y de la especie PLRV en individuos de *A. gossypii* obtenidos en cultivos de Nariño y Antioquia, mientras que el virus CMV se detectó en ambas especies de áfidos en cultivos del departamento de Nariño.

6.2 IDENTIFICACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES DIAGNÓSTICAS DE LOS GENOMAS VIRALES DEL VIRUS PVY Y PLRV.

Los resultados arrojados por las pruebas de ELISA indicaron una alta incidencia de al menos cuatro géneros virales de tres familias diferentes (*Potyviridae*, *Luteoviridae*, *Bromoviridae*) en los cultivos de tomate de árbol de Córdoba (Nariño). Con el fin de corroborar la identidad taxonómica de los virus detectados serológicamente, se realizaron pruebas de RT-PCR, lográndose amplificar fragmentos del gen que codifica para la proteína de la cápside de los virus PVY y PLRV, pero no para CMV.

Las secuencias 45COL y 46COL obtenidas de cepas aisladas de hojas sintomáticas de *S. betaceum*, pudieron ser identificadas como pertenecientes a dicha región del genoma, dado que presentaron identidades superiores al 90% con cepas de diferentes razas de PVY. De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que la cápside es una proteína viral involucrada en la mayoría de procesos del ciclo de vida de los virus, como asistencia en la replicación del genoma, movimiento entre células y transmisión mediante vectores, la secuencia nucleotídica que codifica para dicha proteína presenta regiones altamente

⁸⁶ GUYADER S. & DUCRAY D. 2002. Sequence analysis of Potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *Journal of General Virology* 83: 1799–1807.

⁸⁷ BETANCOURTH C, GOYES R, BRAVO DA. Op. Cit. Pág. 13

⁸⁸ MATTHEWS R.E.F. Op Cit. Pág. 19

⁸⁹ MARTÍNEZ J. E., ZULUAGA C., ÁLVAREZ J. A., LAGOS L.E., MARÍN M. 2009. Detección serológica y molecular de virus en áfidos asociados a Cultivos de tomate de árbol con síntomas de virosis en Antioquia, Cundinamarca y Nariño. Memorias XXIX Congreso Nacional De Fitopatología y Ciencias Afines. Medellín.

conservadas así como variables (responsables de la especificidad de la transmisión y de los hospederos de los virus), y su comparación con secuencias homólogas permiten la identificación taxonómica de la mayoría de virus que afectan a plantas⁹⁰.

Los criterios para la identificación taxonómica de los virus se basan en el porcentaje de identidad en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que forman diferentes proteínas. En el caso de los potyvirus, un criterio válido para la demarcación de especies dentro de la familia *Potyviridae* corresponde al porcentaje de identidad superior al 76% en la secuencia nucleotídica que codifica para la cápside; esto cuando no se cuenta con toda la secuencia del genoma viral⁹¹.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se podría afirmar que las secuencias 45 y 46 COL pertenecen al virus PVY, aunque no es posible definir su afinidad a nivel de razas, pues el análisis filogenético no agrupó a dichas cepas con las de referencia de las razas N, NTN y O, requiriéndose en el futuro la secuenciación de regiones más variables como la de la proteína P1, que en estudios anteriores han permitido la identificación de cepas de PVY^N y PVY^O⁹² ó del genoma viral completo, de tal forma que sea posible la ubicación de los sitios de recombinación reportados para cepas como PVY^{NTN} y PVY^{N: Wilga}^{93, 94}.

PVY es la especie tipo del género *Potyvirus* y es uno de los virus con genoma más variable dando origen a las diversas razas que lo conforman (O, N, C, NTN, N: Wilga)⁹⁵, debido a esto, existe gran diversidad en la secuencia nucleotídica y aminoacídica de miembros de la misma raza, haciendo que su diferenciación sea muy complicada. En el presente estudio se evidencia una clara relación entre los aislamientos provenientes del municipio de Córdoba y las secuencias de PVY obtenidas del Genbank, no obstante se observa que forman un agrupamiento independiente al constituido por secuencias de las razas O, N y NTN, pese a las

⁹⁰ CALLAWAY A., GIESMAN-COOKMEYER D., GILLOCK E. T., SIT T. L., LOMMEL S. A. 2001. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* 39:419–60.

⁹¹ ADAMS M. J., ANTONIW J. F. , FAUQUET C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* 150: 459–479.

⁹² NIE X. & SINGH R. P. 2002. Probable geographical grouping of PVYN and PVY^{NTN} based on sequence variation in P1 and 5-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY^{NTN}. *Journal of Virological Methods* 103: 145–156.

⁹³ BOONHAM N., WALSH K., HIMMS M., PRESTON S., NORTH J. Y I. BARKER. 2002. Biological and sequence comparisons of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology* 51: 117–126

⁹⁴ KOGOVSEK P., GOWB L., POMPE-NOVAK M., GRUDEN K., FOSTER G.D., BOONHAM N., RAVNIKAR M. Op. Cit. Pág. 30

⁹⁵ GLAIS L., TRIBODET M., KERLAN C. 2002. Op. Cit. Pág. 27

altas identidades obtenidas con cepas de PVY^N y PVY^{NTN} de diferentes partes del mundo (Anexo E). Dicha separación puede deberse a los múltiples eventos de recombinación que presentan los genomas de los miembros de la especie PVY, como ha sido reportado previamente en varios estudios^{96,97, 98}. Así por ejemplo, Boonham et al.⁹⁹, en 2002 realizaron un análisis filogenético con secuencias del extremo 5' de la CP y del extremo 3' del gen de la proteína P1 de diferentes aislamientos de PVY O, N y NTN, y encontraron que varios de ellos se agruparon de manera diferente de acuerdo a la secuencia que fue utilizada para el análisis. Esto indica la necesidad de avanzar en la secuenciación del genoma completo de las cepas de PVY obtenidas en este estudio a partir de plantas de tomate de árbol, tal como se indicó anteriormente, de tal manera que puedan abordarse importantes preguntas epidemiológicas como la posible patogenicidad cruzada de dicho virus entre solanáceas que comparten los agroecosistemas andinos de Colombia como papa, tomate de mesa, tomate de árbol, lulo y uchuva.

Por otra parte, los análisis moleculares también lograron confirmar la identidad del virus PLRV como un miembro del complejo viral afectando el cultivo de tomate de árbol de Córdoba (Nariño). Este virus es uno de los más frecuentemente encontrados en cultivos de papa en todo el mundo^{100, 101} siendo caracterizado respecto a la severidad de los síntomas que ocasiona y a sus hospedantes principales en: la raza principal de papa, Tobacco yellow top virus, Tomato yellow top strain¹⁰² y *Capsicum yellows virus*¹⁰³.

La raza que afecta papa, está a su vez dividida en tres linajes filogenéticos: el linaje II corresponde a cepas exclusivamente del continente Australiano, mientras que los linajes I y III están conformados por cepas de diferentes regiones geográficas que no presentan diferencias en su eficiencia de transmisión por áfidos o grado de virulencia en papa¹⁰⁴. No obstante, sus diferencias de origen

⁹⁶ OGAWA T., TOMITAKA Y., NAKAGAWA A., OHSHIMA K. 2008. Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research* 131: 199–212

⁹⁷ KOGOVSEK P., GOWB L., POMPE-NOVAK M., GRUDEN K., FOSTER G.D., BOONHAM N., RAVNIKAR M. Op. Cit. Pág. 30

⁹⁸ REVERS F., GALL L., CANDRESSE T., LE ROMANCER M., DUNEZ J. 1996. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology* 77: 1963-1965

⁹⁹ BOONHAM N., WALSH K., HIMS M., PRESTON S., NORTH J. Y I. BARKER. Op. Cit. Pág. 58.

¹⁰⁰ SINGH R.P., KURZ J., BOITEAU G. & G. BERNARD. 1995. Detection of *Potato leafroll virus* in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *Journal of Virological Methods* 55: 133-143.

¹⁰¹ NIE X., SINGH R.P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *Journal of Virological Methods* 91: 37–49.

¹⁰² THOMAS. 1984. International Committee on Taxonomy of Viruses.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>

¹⁰³ GUNN Y PARES, 1990 . International Committee on Taxonomy of Viruses.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>

¹⁰⁴ GUYADER S. & DUCRAY D. Op. Cit. Pág. 57

geográfico no están reflejadas en el incremento de variabilidad genética, como ha ocurrido con otros virus; por el contrario PLRV es uno de los virus conocidos cuyos genomas son más conservados ¹⁰⁵. Dicha situación es evidente en el presente trabajo, puesto que el dendrograma generado agrupó en un sólo clado a todas las secuencias de PLRV provenientes de diferentes países, las que a su vez compartieron altas identidades con las secuencias de PLRV provenientes de cultivos de tomate de árbol en Córdoba (Anexo E). Un análisis adicional que se requiere realizar para evaluar la uniformidad en las secuencias de las cepas de Córdoba de PLRV bajo estudio, corresponde a la secuenciación de los los ORF 0 y 1, que según Guyader & Ducray¹⁰⁶ en el 2002, son más variables que aquellos que codifican para la proteína de la cápside (ORF 3) y para la proteína de movimiento (ORF4).

6.3 EVALUACIÓN DE LA POSIBLE TRANSMISIÓN POR SEMILLA SEXUAL DE LOS AGENTES VIRALES DETECTADOS.

La transmisión de virus a través de la semilla sexual en plantas es un método que involucra un número relativamente bajo de virus, entre los cuales se encuentran 118 especies pertenecientes a los géneros *Potyvirus*, *Nepovirus*, *Ilarvirus* y *Comovirus*, principalmente ¹⁰⁷. PLRV es uno de los principales agentes infecciosos que ocasionan enfermedades virales en cultivos de solanáceas en el mundo, siendo su principal mecanismo de transmisión los áfidos en forma persistente, circulativa y no propagativa, no obstante no se ha reportado hasta el momento en ningún cultivo la transmisión de este virus a través de semilla sexual ¹⁰⁸. Por esta razón resultó muy impactante el hecho que en este trabajo, mediante la técnica de ELISA se detectará la presencia de PLRV en semillas de *S. betaceum*, confirmándose además su identidad a partir de pruebas de RT-PCR, al obtenerse un amplicón de 336 pb, cuya naturaleza viral fue confirmada posteriormente mediante secuenciación y pruebas del tipo Dot-blot por Álvarez et al.¹⁰⁹. No obstante después del proceso de germinación y crecimiento de las plántulas no se observó presencia de PLRV en las muestras evaluadas por ELISA. Esta situación

¹⁰⁵ KEESE P., MARTIN R. R., KAWCHUK L. M., WATERHOUSE P. M., GERLACH W. L. 1990. Nucleotide sequences of an Australian and a Canadian isolate of potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates. *Journal of General Virology* 71: 719-724.

¹⁰⁶ GUYADER S. & DUCRAY D. Op. Cit. Pág. 57

¹⁰⁷ ASTIER, S., ABOUY, J., MAURY, Y. ROBAGLIA, C. LECOQ, H. 2007. *Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus, Ecology*. Science Publisher. 472 p

¹⁰⁸ BRAULT et al. 2005. ICTVdB Management. (2006). 00.039.0.02.006. *Potato leaf roll virus*. En: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

¹⁰⁹ ÁLVAREZ J.A., RODRÍGUEZ V., LAGOS L. E., GUITÉRREZ P. A., COTES J. M & MARÍN M. M. Incidencia de virus en semilla sexual de tomate de árbol procedente de tres departamentos de Colombia. Junio 2 de 2009. 29 Congreso Nacional de Fitopatología y Ciencias Afines. Medellín, Colombia

se ha manifestado en algunas infecciones virales, que pueden causar síntomas de la enfermedad en semillas, pero que no necesariamente se correlacionan con su habilidad para la transmisión del virus a la planta ^{110,111}, dado que únicamente infectan los tejidos maternos de las semillas, afectando la megospora de la célula madre en estados tempranos de desarrollo¹¹²; sin embargo, estos resultados plantean interesantes preguntas científicas que requieren ser abordadas con más detalle, razón por la cual Álvarez et al.,¹¹³ ha realizado una investigación detallada sobre la posible transmisión del PLRV en semilla sexual de tomate de árbol, con resultados iniciales que posiblemente presentan a este medio como uno de los métodos de dispersión del PLRV en cultivos de tomate de árbol.

¹¹⁰ HULL, R. 2004. Mathew's Plant virology. Fourth Edition. Elsevier Academic Press, USA. 1001 p.

¹¹¹ ASTIER, S., ABOUY, J., MAURY, Y. ROBAGLIA, C. LECOQ, H. Op. Cit. Pág 60.

¹¹² MAUDE, R.B. 1996. Seedborne diseases and their control. CAB international. 279 p.

¹¹³ ÁLVAREZ J.A., RODRÍGUEZ V., LAGOS L. E., GUITÉRREZ P. A., COTES J. M & MARÍN M. M. Op. Cit. Pág.60

CONCLUSIONES

- La enfermedad denominada en campo como “Virosis del tomate de árbol” en el municipio de Córdoba, Nariño es causada principalmente por un complejo viral constituido por miembros de los géneros *Potyvirus* (PVY), *Cucumovirus* (CMV), *Tobamovirus* (ToMV) y *Polerovirus* (PLRV). No obstante no se descarta la posibilidad de ocurrencia de otros virus asociados a la enfermedad, que no hayan podido ser identificados mediante las técnicas de ELISA y RT- PCR empleadas en esta investigación.
- PVY fue identificado como uno de los potyvirus asociado a “Virosis” de tomate de árbol. El análisis filogenético no reveló una asociación evidente entre los aislados provenientes de cultivos de tomate de árbol de Córdoba y alguna de las razas de PVY reportadas por la literatura.
- PLRV fue el segundo virus que pudo ser identificado mediante RT- PCR y secuenciación, presentando una alta identidad con cepas obtenidas de cultivos de papa de Colombia y de otros países del mundo.
- A partir de los resultados obtenidos de las pruebas de ELISA y de RT- PCR, se confirmó la presencia del virus PLRV en semilla, lo cual resultó muy sorprendente, por cuanto este virus es reconocido por su falta de transmisibilidad por semilla sexual en diversos cultivos, razón por la cual es necesario confirmar dichos resultados mediante pruebas biológicas.

RECOMENDACIONES

Este es el primer estudio de identificación a nivel molecular de los virus que actualmente afectan el cultivo de tomate de árbol en Nariño, pese a que esta enfermedad se ha constituido en una de las de mayor incidencia y severidad en el departamento. Debido a esto es necesario continuar con los estudios que permitan alcanzar un nivel de información suficiente para el diseño de estrategias de manejo y prevención de la enfermedad en regiones cultivadoras donde aún no se ha manifestado.

Es necesaria la secuenciación completa de los genomas virales o de secuencias más variables de los virus que se presenten en los cultivos de tomate de árbol, para poder esclarecer los niveles de variación intraespecífica de los virus encontrados, especialmente de PVY.

La detección del virus PLRV en semilla sexual de tomate de árbol, amerita emprender diversos estudios sobre la transmisibilidad de dicho virus por este medio, por cuanto los polerovirus son reconocidos en la disciplina de virología vegetal por su transmisión persistente por áfidos, injertos, semilla asexual pero no por semilla sexual.

BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ J.A., RODRÍGUEZ V., LAGOS L. E., GUITÉRREZ P. A., COTES J. M & MARÍN M. M. Incidencia de virus en semilla sexual de tomate de árbol procedente de tres departamentos de Colombia. Junio 2 de 2009. 29 Congreso Nacional de Fitopatología y Ciencias Afines. Medellín, Colombia

ADAMS, M. Introduction to plant viruses. 2007. <http://www.dpvweb.net/intro/index.php>

ADAMS M. J., ANTONIW J. F. , FAUQUET C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* 150: 459–479.

ASTIER, S., ABOUY, J., MAURY, Y. ROBAGLIA, C. LECOQ, H. 2007. Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus, Ecology. Science Publisher. 472 p

AYALA, M. 2009. Caracterización del Potyvirus asociado a la virosis del tomate de árbol en Antioquia. Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Magister en Ciencias Agrarias. Octubre. 96 p.

BETANCOURTH C, GOYES R, BRAVO DA. 2003. Caracterización biológica de un virus del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Send) en el departamento de Nariño. *Fitopatología Colombiana* 27: 7-10.

BLAS, BORJA, M.J., SAIZ, M. Y ROMERO, J. 1994. Broad Spectrum Detection of Cucumber Mosaic Virus (CMV) Using The Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology* 141: 323-329.

BOONHAM N., WALSH K., HIMS M., PRESTON S., NORTH J. Y I. BARKER. 2002. Biological and sequence comparisons of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology* 51: 117–126

BRAULT. 2005. ICTVdB Management. (2006). 00.039.0.02.006. *Potato leaf roll virus*. En: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

BRUNT A, CRABTRE K, DALLWITZ M.J., GIBSS A.J., WATSON L. Y ZURCHER, E.J. (eds). 1996. Plant virus online: Descriptions and lits from the VIDE Database.

- BÜCHEN-OSMOND, C. 2006. Index of Viruses - *Tobamovirus*. En: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. (Ed), Columbia University, New York, USA. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm
- BUKOVINSZKI A., GÖTZ R., JOHANSEN E., MAISS E., BALÁZS E. 2007. The role of the coat protein region in symptom formation on *Physalis floridana* varies between PVY strains. *Virus Research* 127: 122–125.
- CALLAWAY A., GIESMAN-COOKMEYER D., GILLOCK E. T., SIT T. L., LOMMEL S. A. 2001. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* 39:419–60.
- CANN , A. J. Principles of molecular virology. Third edition. Elsevier academic press. 2001. 323p.
- CARRINGTON JC, DOUGHERTY WG. 1987. Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* 160: 355-362.
- CARRINGTON JC, FREED DD, SANDERS TC. 1989. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *Journal of Virology* 63: 4459-4463.
- CHÁVEZ B. & VARÓN F. 2001. Enfermedad de etiología viral en cultivos de tomate de árbol. *Epidemiología Agrícola*. P. 39-43.
- CHEN J., CHEN J., ADAMS M.J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146: 757–766.
- CHU, F.H., CHAO, C.H., CHUNG, M.H., CHEN, C.C., Y YEH, S.D. 2001. Completion of the genome sequence of Watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91:361-368.
- CORRÊA R. L., SILVA T. F., SIMOES A. J. L., BARROSO P.A.V., VIDAL M. S. & VASLIN M.F.S. 2005. Molecular characterization of a virus from the family *Luteoviridae* associated with cotton blue disease. *Archives of Virology* 150: 1357–1367
- CRAIG, G., STEPHEN, W. WYLIE, J. Y MICHAEL, G., JONES, K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current science* 86: 1604-1607.
- CRUZ L.F. 2005. Identificación de virus en *Solanum betacea*. 2005. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. 48p.

CUSPOCA J. 2007. Evaluación de virus en tomate de árbol (*Solanum betacea*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. 43p

DEBOKX, J.A., HUTTINGA, H., 1981. Potato virus Y. CMI/AAB Descript. Plant Viruses 242, 6

EAGLES R. M, GARDNER R. C, FORSTER R. 1994. Incidence and distribution of six viruses infecting tamarillo (*Cyphomandra betacea*) in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 22: 453-458

FELSENSTEIN J .1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791

FINETTI-SIALER, M., DI FRANCO, A., PAPANICE, M. A. Y GALLITELLI, D. 2007. Tomato necrotic yellows induced by a novel strain of Alfalfa mosaic virus. Journal of Plant Pathology 79:115-120.

FLETCHER, J.D. 1987. New plant diseases records in New Zealand: Additional hosts of alfalfa mosaic virus and cucumber mosaic virus. New Zealand Journal of Agricultural Research 30: 505-506.

GLAIS L., TRIBODET M., KERLAN C. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. Archives of Virology 147: 363–378.

GUYADER S. & DUCRAY D. 2002. Sequence analysis of Potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. Journal of General Virology 83: 1799–1807.

HU X., MEACHAM T., EWINGA L., GRAY S.M., KARASEVA A.V. 2009. A novel recombinant strain of Potato virus Y suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. Virus Research 143: 68–76.

HULL, R. 2004. Mathew's Plant virology. Fourth Edition. Elsevier Academic Press, USA. 1001 p.

HSU, Y.C., YE H, T.J. Y CHANG, Y.C. 2005. A new combination of RT-PCR and reverse dot blot hybridization for rapid detection and identification of potyviruses. Journal of Virological Methods 128: 54-60.

ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>. ICTVdB Management (2006). 00.039.0.02. Polerovirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

JACOBI, V., BACHAND, G.D., HAMELIN, R.C. Y CASTELLO, J.D. 1998. Development of a multiplex immunocapture PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *Journal of Virological Methods* 74: 167–178.

JARAMILLO, M. 2009. Análisis serológico y molecular de virus asociados al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Magister en Ciencias -Biotecnología -. Octubre. 127 p.

KHAN, J.A., DIJKSTRA, J. Handbook of plant virology. Crop science. New York, U.S.A. Food Products Press. 2006. 452p.

KERLAN, C., 2006. Description of Plant Viruses: Potato virus Y. Association of Applied Biologists, No. 414 (<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>).

KEESE P., MARTIN R. R., KAWCHUK L. M., WATERHOUSE P. M., GERLACH W. L. 1990. Nucleotide sequences of an Australian and a Canadian isolate of potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates. *Journal of General Virology* 71: 719-724.

KOGOVSEK P., GOWB L., POMPE-NOVAK M., GRUDEN K., FOSTER G.D., BOONHAM N., RAVNIKAR M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods* 149: 1–11.

LANGENBERG WG, ZHANG L. 1997. Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology* 118: 243-247.

MARTÍNEZ J. E., ZULUAGA C., ÁLVAREZ J. A., LAGOS L.E., MARÍN M. 2009. Detección serológica y molecular de virus en áfidos asociados a Cultivos de tomate de árbol con síntomas de virosis en Antioquia, Cundinamarca y Nariño. Memorias XXIX Congreso Nacional De Fitopatología y Ciencias Afines. Medellín.

MASON, G., ROGGERO, P. Y TAVELLA, L. 2003. Detection of Tomato spotted wilt virus in its vector *Frankliniella occidentalis* by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 109:69-73

MATTHEWS R.E.F. Plant Virology third edition. Academic press limited. 1991. 835p.

MAUDE, R.B. 1996. Seedborne diseases and their control. CAB international. 279 p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2006. Observatorio agrocadenas Colombia. (<http://www.agrocadenas.gov.co>) Consulta: Octubre de 2008.

NIE X., SINGH R.P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. Journal of Virological Methods 91: 37–49.

NIE X. & SINGH R. P. 2002. Probable geographical grouping of PVYN and PVY^{NTN} based on sequence variation in P1 and 5-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY^{NTN}. Journal of Virological Methods 103: 145–156.

OCHOA L, J. Y INSUASTI A, M. 2005. Etiología de las enfermedades virales del tomate de arbol en Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito (Ecuador). Informe Técnico Anual - INIAP (Ecuador). Est. Exp. Santa Catalina. Departamento Nacional de Protección Vegetal estudios agronómicos, fitopatológicos y entomologicos de frutales nativos andinos 1:1-4.

OGAWA T., TOMITAKA Y., NAKAGAWA A., OHSHIMA K. 2008. Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. Virus Research 131: 199–212

ORILIO A. F., DUSI A. N. & MADEIRA N. R. 2008. Characterization of a member of a new Potyvirus species infecting arracacha in Brazil. Archives of Virology 154:181–185.

REVERS F., GALL L., CANDRESSE T., LE ROMANCER M., DUNEZ J. 1996. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. Journal of General Virology 77: 1963-1965.

RIECHMANN J.L., LAIN S. Y GARCIA J.A. 1992. Review Article: Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology 73: 1-16.

RIZOS, H., GUNN, L.V., PARES R.D. Y GILLINGS M.R. 1992. Differentiation of Cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73: 2099-2103.

SALDARRIAGA A, BERNAL JA. 1994. Virus en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt). 5 pp. En: Resúmenes XV Congreso ASCOLFI. Santafé de Bogotá. Agosto 31 - Septiembre 2 de 1994. 150 p.

SALDARRIAGA A., BERNAL JA, TAMAYO P. 1997. Virosis del tomate de árbol. En: Enfermedades del cultivo de árbol en Antioquia: Guía de reconocimiento y control. Boletín técnico CORPOICA.

SAMUITIENE, M., ZITIKAITE, I., NAVALINSKIENE, M. Y VALIUNAS, D. 2003. Identification of tomato ringspot nepovirus by RT-PCR. *Biologija* 4: 35-38.

SÁNCHEZ DE L., C. 1982. Estudios de hospedantes de un nuevo virus en el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt). En: Programa y resúmenes V Congreso Asociación Colombiana de Fitopatología ASCOLFI, XXII Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología. División Caribe, ASP- CD, Cali, Colombia. Julio 12 - 17. p. 41-42.

SÁNCHEZ DE LUQUE, M., DE LA ROTTA C., SUAREZ, A. 1981. Posible virus en tomate de árbol *Cyphomandra betacea* SENDT. *ASCOLFI informa* 7 (3): 24.

SAÑUDO, B. ORELLANA, G. 1989. Un virus afectando tomate de árbol (*cyphomandra betacea*) en Valle del Sibundoy, Putumayo. *ASCOLFI Informa* 15(3): 24.

SCHAECHTER M., LEDERBERG J. 2004. The desk encyclopedia of microbiology. Elsevier Academic Press.

SCHUBERT J., FOMITCHEVA V. Y SZTANGRET-WINIEWSKA J. 2007. Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *Journal of Virological Methods* 140: 66-74.

SHUKLA DD, WARD CW, BRUNT AA .1994. The Potyviridae. CAB International, Wallingford

SITIO OFICIAL DE CÓRDOBA EN NARIÑO (<http://www.cordoba-narino.gov.co>) Consulta: Noviembre de 2008.

SINGH R.P., KURZ J., BOITEAU G. & G. BERNARD. 1995. Detection of *Potato leafroll virus* in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *Journal of Virological Methods* 55: 133-143.

SECRETARIA DE AGRICULTURA CONSOLIDADO AGROPECUARIO NARIÑO. 2006. Consulta: Noviembre de 2008.

STANGE C. 2006. Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. Ciencia e investigación agraria 33: 3-21.

SWOFFORD D. L. 1998. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version: 4. Sunderland, USA: Sinauer Associates.

TAMAYO, P.J. 1990. Mosaico del tomate de árbol. ASCOLFI Informa.16 (6): 54-55.

TAMAYO, P.J. 1996. Enfermedades Virales del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav).Sendt.) en Colombia. ASCOLFI Informa 22(2): 26-29.

TAMAYO P.J., ZAPATA J.L., SALAZAR L. F. 1999. El mosaico y la virosis del tomate de árbol en el altiplano norte de Antioquia. Revista Fac. Nal. Agronomía Med. 52: 781-785.

VERCHOT, J., KOONIN, E.V. & CARRINGTON, J.C. 1991. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. Virology 185: 527-535.

VAN REGENMORTELM MHV. 1990. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. Intervirology 31: 241-254.

VIZUETE B., INSUASTI M.L., OCHOA J. Y ELLIS, M. Biological and Serological Characterization of Tree Tomato Virus Diseases in Ecuador. INIAP-Ohio State University.

XU, H. Y NIE, J. 2006. Identification, characterization, and molecular detection of Alfalfa mosaic virus in potato. Phytopathology 96: 1237-1242.

ANEXOS

Anexo A. Buffer de extracción para ELISA DE Potyvirus 1X

Carbonato de sodio	1.56g
Bicarbonato de sodio	2.93g
Sodio azida	0.2g
Polyvinilpirrolidona (PVP MW 24- 40000)	20.0g
Agua	1000 ml

Anexo B. Buffer de extracción general para ELISA (GEB) 1X

Sulfito de sodio (anhidro)	1.3g
Polyvinilpirrolidona (PVP MW 24- 40000)	20.0g
Sodio azida	0.2g
Powdered egg (chicken) albumin, grade II	2.0g
Tween- 20	20.0g
Agua	1000 ml

Se debe ajustar el pH a 7.4 y mantener a 4° C.

Anexo C. RT- PCR ONESTEP

Reactivo	Cantidad para 1 muestra (µL)
ARN	5 µL
Primer 1	0.6 µL
Primer 2	0.6 5 µL
1X	Buffer QIAGEN OneStep RT-PCR
dNTPs	400 µL
Mezcla de enzimas: transcriptasa reversa Omniscript, transcriptasa reversa Sensiscript y Polimerasa de ADN HotStarTaq	2 µL

Programa de amplificación	
Síntesis de la primera cadena	50 °C por 30 minutos
Activación de la Taq polimerasa HotStar	95°C por 15 minutos
Amplificación	35 ciclos a 94 °C por 1 minutos, 52 a 58 °C por 1 minutos (dependiendo de los cebadores), 72°C por 1,30 minutos
Extensión final	10 minutos a 72 °C.

Anexo D. Cebadores específicos utilizados

<i>Virus</i>	<i>Cebadores</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Amplicón</i>	<i>Temperatura de Annealing</i>	<i>Referencia</i>
AMV	F	5'-CCA TCA TGA GTT CTT CAC AAA AG-3'	351 pb	58°C	Xu y Nei, 2006
	R	5'-TCG TCA CGT CAT CAG TGA GAC-3'	351 pb	58°C	
	F2	5'-ATC ATG AGT TCT TCA CAA AAG AA-3'	669 pb	58°C	Xu y Nei, 2006
	R2	5'-TCA ATG ACG ATC AAG ATC GTC-3'	669 pb	58°C	
	CPAMV1	5'-TTC AAT TAC TTC CAT CAT GAG TTC TTC AC-3'		52°C	Finetti <i>et al.</i> , 2007
	CPAMV2	5'-AGG ACT TCA CTT GAC C-3'		52°C	
CMV	FCP	5'-GAT CCG CTT CTT CTC CGC GAG-3'	ARN-2 820 pb, ARN3 870 pb	52°C	Rizos <i>et al.</i> , 1992
	RCP	5'-GCC GTA AGC TGG ATG GAC- 3'	ARN-2 820 pb, ARN3 870 pb	52°C	
	CMV-spainF:	5'-GTAGACATCTGTGACGCGA-3'	510 pb	54°C	Blas <i>et al.</i> 1994
	CMV-spainR:	5'- GCGCGAAACAAGCTTCTTATC-3'	510 pb	54°C	
PLRV	F	5'-CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC-3'	336 pb	54°C	Singh <i>et al.</i> , 1995
	R	5'-GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT-3'	336 pb	54°C	
	Can1	5'-ACA AAA GAA TAC CAG GAG AAA TTG C-3'	950 pb	54°C	Keese <i>et al.</i> , 1990
	Can 2	5'- GAC CTA CTA GTA TGG AGA TAT C-3'	950 pb	54°C	
	Can 3	5'- TAT CTC CAT ACT AGT AGG TC-3'	1000 pb	54°C	Keese <i>et al.</i> , 1990
	Can 4	5'- GCA GCC TGT AGA TTC AGG C-3'	1000 pb	54°C	
<i>Potyvirus</i>	PNBF1	5'-GG(GCT) AA(CT) AAT AGT GG(AGCT) CAA CC-3'	1200 pb	53°C	Hsu <i>et al.</i> , 2005
	PN1BF5	5'-GCC AGC CCT CCA CCG T(AGCT)G T(AGCT)G A(CT)AA-3')	1100 pb	53°C	
	PCPR1	5'-GGG GAG GTG CCG TTC TC(AGT) AT(AG) CAC CA-3'	1200 pb	53°C	
PVY	F	5'-ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC-3'	480 pb	53°C	Nie y Singh, 2001
	R	5'-TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT-3'	480 pb	53°C	

PVA	F	5'-GTT GGA GAA TTC AAG ATC CTG G-3'	255 pb	52°C	Singh <i>et al.</i> , 1995
	R	5'-TTT CTC TGC CAC CTC ATC G-3'	255 pb		
ToMV	1	5'-TGG GCC CCA ACC GGG GGT-3'	549 pb	52°C	Jacobi <i>et al.</i> , 1998.
	3	5'-TTC AAC AGC AGT TCA GCG AG-3'	549 pb	52°C	
	5	5'-CTC CAT CGT TCA CAC TCG TTA CT-3'	508 pb	53°C	Jacobi <i>et al.</i> , 1998.
	6	5'-GAT CTG TCA AAG TCT GAG AAA CTT C-3'	508 pb	53°C	
ToRSV	U1	5'-GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC-3'	499 pb	55°C	Samuitiene <i>et al.</i> , 2003
	D1	5'-TCC GTC CAA TCA CGC GAA T-3'	499 pb	55°C	
TSWV	F	5'-GCC ATT GTT CTC CGG AAG ATT CAG-3'		55°C	Mason <i>et al.</i> 2003
	R	5'-CAA CCC TAG TTA ATT TCG TTG GTG-3'		55°C	
	NF	5'-CGG GAT CAG AGC AAT TGT GTC A-3'	1000 pb	53°C	Chu <i>et al.</i> , 2001
	NR	5'-GCG AGC TCT TAA CAC ACT AAG CAA GCA C-3'		53°C	
	GL3637	5'-CCT TTA ACA GTD GAA ACA T-3'	810 pb	52°C	Chu <i>et al.</i> , 2001
	GL4435C	5'-CAT DGC RCA AGA RTG RTA RAC AGA-3'	810 pb	52°C	

Anexo E.

Matrices de identidad de las secuencias analizadas, utilizadas en los árboles filogenéticos. A) Matriz para PVY, B) matriz para PLRV.

Seq->	45col	46col	ARG ^o	CAN ^o	POL ^o	SUI ^o	CHI ^{NEC}	JAP4 ^N	RU1 ^N	RU2 ^N	E.U1 ^{NTN}	E.U2 ^{NTN}	JAP1 ^{NTN}	JAP2 ^{NTN}	JAP3 ^{NTN}	RU3 ^{NTN}	13Col	17Col	BYMV
45col	ID	0.991	0.877	0.883	0.889	0.891	0.883	0.929	0.927	0.927	0.929	0.927	0.929	0.929	0.927	0.931	0.925	0.916	0.662
46col	0.991	ID	0.872	0.879	0.885	0.883	0.883	0.925	0.922	0.922	0.925	0.922	0.925	0.925	0.922	0.927	0.920	0.922	0.658
ARG ^o	0.877	0.872	ID	0.950	0.950	0.952	0.918	0.908	0.902	0.902	0.900	0.906	0.904	0.904	0.902	0.902	0.904	0.900	0.641
CAN ^o	0.883	0.879	0.950	ID	0.981	0.983	0.925	0.918	0.912	0.912	0.910	0.916	0.914	0.914	0.912	0.912	0.914	0.918	0.652
POL ^o	0.889	0.885	0.950	0.981	ID	0.993	0.922	0.912	0.906	0.906	0.904	0.910	0.908	0.908	0.906	0.910	0.908	0.912	0.647
SUI ^o	0.891	0.883	0.952	0.983	0.993	ID	0.925	0.914	0.908	0.908	0.906	0.912	0.910	0.910	0.908	0.908	0.910	0.914	0.650
CHI ^{NEC}	0.883	0.883	0.918	0.925	0.922	0.925	ID	0.910	0.908	0.908	0.906	0.912	0.910	0.910	0.908	0.908	0.914	0.910	0.645
JAP4 ^N	0.929	0.925	0.908	0.918	0.912	0.914	0.910	ID	0.981	0.981	0.979	0.997	0.983	0.983	0.981	0.993	0.995	0.958	0.668
RU1 ^N	0.927	0.922	0.902	0.912	0.906	0.908	0.908	0.981	ID	1.000	0.997	0.983	0.997	0.997	1.000	0.979	0.981	0.960	0.666
RU2 ^N	0.927	0.922	0.902	0.912	0.906	0.908	0.908	0.981	1.000	ID	0.997	0.983	0.997	0.997	1.000	0.979	0.981	0.960	0.666
E.U1 ^{NA- N/NTN}	0.929	0.925	0.900	0.910	0.904	0.906	0.906	0.979	0.997	0.997	ID	0.981	0.995	0.995	0.997	0.977	0.979	0.958	0.664
E.U2 ^{NTN}	0.927	0.922	0.906	0.916	0.910	0.912	0.912	0.997	0.983	0.983	0.981	ID	0.985	0.985	0.983	0.995	0.997	0.960	0.666
JAP1 ^{NTN}	0.929	0.925	0.904	0.914	0.908	0.910	0.910	0.983	0.997	0.997	0.995	0.985	ID	1.000	0.997	0.981	0.983	0.962	0.668
JAP2 ^{NTN}	0.929	0.925	0.904	0.914	0.908	0.910	0.910	0.983	0.997	0.997	0.995	0.985	1.000	ID	0.997	0.981	0.983	0.962	0.668
JAP3 ^{NTN}	0.927	0.922	0.902	0.912	0.906	0.908	0.908	0.981	1.000	1.000	0.997	0.983	0.997	0.997	ID	0.979	0.981	0.960	0.666
RU3 ^{NTN}	0.931	0.927	0.902	0.912	0.910	0.908	0.908	0.993	0.979	0.979	0.977	0.995	0.981	0.981	0.979	ID	0.993	0.956	0.662
13col	0.925	0.920	0.904	0.914	0.908	0.910	0.914	0.995	0.981	0.981	0.979	0.997	0.983	0.983	0.981	0.993	ID	0.958	0.664
17Col	0.916	0.922	0.900	0.918	0.912	0.914	0.910	0.958	0.960	0.960	0.958	0.960	0.962	0.962	0.960	0.956	0.958	ID	0.666
BYMV	0.662	0.658	0.641	0.652	0.647	0.650	0.645	0.668	0.666	0.666	0.664	0.666	0.668	0.668	0.666	0.662	0.664	0.666	ID

A)

B)

Seq->	PLRV28col	PLRV25COL	AUSTRALIA	CANADA	CHINA	CLON	CUBA	FILIP1	INDIA	IRAN	PERU	RCHECA	BMVY
PLRV28col	ID	0.994	0.988	0.988	0.988	0.991	0.985	0.988	0.988	0.991	0.976	0.988	0.747
PLRV25COL	0.994	ID	0.988	0.988	0.988	0.991	0.985	0.988	0.988	0.991	0.976	0.988	0.747
AUSTRALIA	0.988	0.988	ID	0.982	0.982	0.991	0.985	0.988	0.982	0.985	0.976	0.982	0.750
CANADA	0.988	0.988	0.982	ID	0.994	0.985	0.991	0.982	1.000	0.991	0.988	0.994	0.755
CHINA	0.988	0.988	0.982	0.994	ID	0.985	0.991	0.982	0.994	0.991	0.982	0.994	0.750
CLON	0.991	0.991	0.991	0.985	0.985	ID	0.982	0.991	0.985	0.988	0.973	0.985	0.744
CUBA	0.985	0.985	0.985	0.991	0.991	0.982	ID	0.979	0.991	0.994	0.991	0.997	0.750
FILIP1	0.988	0.988	0.988	0.982	0.982	0.991	0.979	ID	0.982	0.985	0.970	0.982	0.741
INDIA	0.988	0.988	0.982	1.000	0.994	0.985	0.991	0.982	ID	0.991	0.988	0.994	0.755
IRAN	0.991	0.991	0.985	0.991	0.991	0.988	0.994	0.985	0.991	ID	0.985	0.997	0.750
PERU	0.976	0.976	0.976	0.988	0.982	0.973	0.991	0.970	0.988	0.985	ID	0.988	0.747
RCHECA	0.988	0.988	0.982	0.994	0.994	0.985	0.997	0.982	0.994	0.997	0.988	ID	0.750
BMVY	0.747	0.747	0.750	0.755	0.750	0.744	0.750	0.741	0.755	0.750	0.747	0.750	ID