

DETECCIÓN DE VIRUS ASOCIADOS AL MATERIAL DE SIEMBRA DE TOMATE DE ÁRBOL EN COLOMBIA

DETECTION OF VIRUSES ASSOCIATED TO PLANTING MATERIAL OF TAMARILLO IN COLOMBIA

DETECÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE MUDAS DE TOMATE DE ÁRVORE NA COLÔMBIA

JOHN ALEJANDRO ÁLVAREZ¹, JOSÉ MIGUEL COTES², MAURICIO MARÍN³

PALABRAS CLAVE:

Cápside, ELISA, PLRV, *Solanum betaceum*, Transmisión por semilla.

KEYWORDS:

Capsid, ELISA, PLRV, Seed transmission, *Solanum betaceum*

PALAVRAS-CHAVE:

Capsídeo, ELISA, PLRV, *Solanum betaceum*, Transmissão por sementes

RESUMEN

La virosis del tomate de árbol es uno de los problemas más limitantes de este cultivo en Colombia. Esta investigación evaluó como posible fuente de inóculo la semilla de frutos colectados en campo, así como en material de vivero de Antioquia, Cundinamarca, Nariño y Putumayo y en plántulas germinadas bajo condiciones de invernadero. Estas evaluaciones se realizaron mediante pruebas de ELISA y estuvieron complementadas con la secuenciación del gen de la cápside de los virus detectados más frecuentemente. Para la semilla de frutos colectados en campo se observó una alta incidencia de potyvirus (16%), PLRV (26%) y la presencia en al menos una muestra de los virus AMV, CMV y ToMV. No se encontraron los virus TSWV y ToRSV. La detección en plántulas de vivero indicó la presencia de PLRV (24%), potyvirus (35%), ToRSV (22%) y CMV (0,6%) en las muestras analizadas. En las plántulas obtenidas en los ensayos de invernadero, nuevamente se detectaron PLRV y potyvirus. Estos resultados plantean la posibilidad de considerar la transmisión por semilla de virus en este cultivo y representan el primer reporte mundial de transmisión por semilla de PLRV.

ABSTRACT

The Tamarillo virus disease is one of the most limiting problems of this crop in Colombia. In this research we evaluated, as a source of inoculum, seeds from fruits collected in the field, as well as nursery stocks from Antioquia, Cundinamarca, Nariño and Putumayo, and seedlings germinated under greenhouse conditions. These assessments were made by ELISA and complemented by

Recibido para evaluación: 1 de Febrero de 2011. Aprobado para publicación: 21 de Marzo de 2011

1 Ingeniero Agrónomo, MSc. Investigador, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín

2 Ingeniero Agrónomo, PhD. Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín

3 Ingeniero Agrónomo, PhD. Profesor Asociado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Correspondencia: mamarinm@unal.edu.co

sequencing the capsid gene of the most frequently detected virus. Seeds from fruits show the presence of AMV, CMV, potyvirus, PLRV and ToMV in at least one sample, but not TSWV and ToRSV. PLRV (26%) and potyviruses (16%) were most frequently associated with this material. The identification in nursery seedlings indicated the presence of potyviruses (35%), PLRV (24%), ToRSV (22%) and CMV (0.6%) in the analyzed samples. In the plantlets from the greenhouse trials, PLRV and potyviruses were detected again. These findings raise the possibility to consider seed transmission of virus in this crop and represent the first report of seed transmission of PLRV in the world.

RESUMO

A virose do tomate de árvore é um dos problemas mais importantes desta cultura na Colômbia. Nesta pesquisa avaliou-se a possível fonte de inóculo de sementes obtidas de frutos no campo, ao igual que mudas obtidas em viveiros de Antioquia, Cundinamarca, Nariño e Putumayo, e finalmente mudas obtidas em casa de vegetação, utilização de provas ELISA. Além destas avaliações obteve-se o sequenciamento do gen da capa dos vírus mais frequentes. Para a semente de frutos coletados no campo observou-se uma alta incidência dos potyvirus (16%) e PLRV (26%), a presença em pelo menos uma amostra dos vírus AMV, CMV e ToMV, e não encontraram-se os vírus TSWV y ToRSV. Nas mudas obtidas em viveiros as incidências foram de PLRV (24%), potyvirus (35%), ToRSV (22%) e CMV (0,6%). Nas plantas obtidas em casa de vegetação, encontraram-se novamente os vírus PLRV e potyvirus. Estes resultados mostram que é possível eu os vírus possam ser transmitidos pela semente e é o primeiro artigo no mundo que mostra a transmissão de PLRV pela semente

INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate de árbol es una de las opciones productivas más importantes para la región Andina de Colombia. Este cultivo se extendía para el año 2004 a cerca de 7.000 ha distribuidas en 18 departamentos del país [1]. Sin embargo, en el último lustro ha disminuido por efecto de la erradicación de importantes extensiones del cultivo debido a la presencia de problemas fitosanitarios entre los que se destacan la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), Nematodos de la Agalla (*Meloidogyne* sp.) y las enfermedades virales. En la década de los 80 se reportó en Boyacá la presencia del virus de la Necrosis anular del tomate de árbol [2] y en Antioquia del Mosaico del tomate de árbol [3]. En 1991 aparece en el Norte Antioqueño una nueva enfermedad denominada como Virosis del tomate de árbol, cuyo efecto motivó la erradicación masiva de árboles afectados [4]. En la actualidad el problema continúa extendiéndose y agravándose, tal como se demuestra en diferentes reportes en Nariño [5, 6]; Cundinamarca [7, 8] y Antioquia [9, 10, 11]; que registran el aumento de la incidencia y la severidad de las virosis, la consecuente reducción en el período productivo de los cultivos y la disminución en la cantidad y calidad de fruta. Estudios recientes mediante pruebas de ELISA, RT-PCR y microscopía electrónica han detectado la presencia de un complejo viral asociado a este cultivo en Colombia, que incluye

al menos dos Potyvirus (Potato virus Y - PVY y una posible nueva especie denominada Tamarillo mosaic leaf virus - TaMLV), además de las especies Cucumber mosaic virus (CMV), Alfalfa mosaic virus (AMV), Tomato mosaic virus (ToMV) y Potato leafroll virus (PLRV) [6, 9, 10, 11]. Diferentes trabajos en Colombia y otros países del mundo han determinado que los potyvirus asociados al cultivo son transmitidos en forma mecánica, por propagación asexual y por insectos vectores de la familia Aphididae pero no por semilla [5, 12, 13, 14].

La transmisión de virus por semilla involucra un número relativamente bajo de virus. Se conocen al menos 108 virus transmitidos a través de este medio en por lo menos uno de sus hospedantes, siendo los más frecuentes los miembros de los géneros Potyvirus (20), Nepovirus (18), Ilarvirus (8) y Comovirus (7), además de los alfacriptovirus y betacriptovirus, donde la transmisión por semilla es la única forma de transmisión conocida [15, 16].

El cultivo del tomate de árbol es propagado por los agricultores mediante semilla, por lo que es necesario adelantar estudios de transmisión de virus a través de este mecanismo. En este trabajo se evaluó mediante pruebas de ELISA, la incidencia en material de siembra (semilla y plántulas de vivero) de los virus AMV, CMV, PLRV, Potyvirus, ToMV, Tomato ringspot virus (ToRSV)

y Tomato spotted wilt virus (TSWV), y se confirmó la identidad taxonómica del PVY y PLRV mediante secuenciación del gen de la cápside viral.

MÉTODO

Evaluación de incidencia viral mediante pruebas serológicas (ELISA)

Para esta evaluación se tuvieron en cuenta las alternativas que tienen los agricultores para dar inicio a los cultivos de tomate de árbol en el país: selección de frutos de plantas vigorosas y aparentemente sanas ubicadas en sus cultivos y compra de plántulas en viveros comerciales. Para el primer caso se evaluaron ocho zonas, tres en el Departamento de Antioquia (zona 1: la Unión-Sonsón, zona 2: Oriente cercano, zona 3: Norte Antioqueño), tres zonas en Cundinamarca (zona 4: Anolaima, zona 5: San Bernardo, zona 6: Granada) y una zona en Nariño (zona 7: Córdoba) y Putumayo (zona 8: Valle del Sibundoy). En cada zona se ubicaron cuatro cultivos en edad de fructificación, obteniéndose de cada uno cuatro muestras compuestas de cuatro frutos maduros aparentemente sanos (M1, M2, M3 y M4) y una muestra de un árbol con sintomatología de afección viral, que fue utilizada como referencia en los análisis posteriores (M5). Una vez en el laboratorio, de cada fruto se obtuvieron las semillas, procediéndose a su fermentación durante tres días, secado a temperatura ambiente y tratamiento con jabón, hipoclorito y ácido giberélico (ProGibb, Bogotá) al 1% durante 24 h a 4°C.

Posteriormente, se obtuvieron 20 plántulas de las muestras M1, M2, M3 y M4, y 10 plántulas de la M5, las cuales fueron mantenidas durante dos meses bajo invernadero con malla antiáfidos en cubículos individuales, protegidos por mallas antiáfidos. Para el caso de la evaluación de plántulas, se obtuvieron 20 muestras aleatorias de plántulas disponibles para comercializar en viveros de cada una de las zonas de estudio, tomándose al menos dos hojas con pecíolos para su análisis posterior en el laboratorio (Cuadro 1).

Se realizó la detección de virus mediante la técnica de DAS-ELISA para los virus AMV, CMV, PLRV, ToMV, ToRSV y TSWV, y ACP-ELISA para Potyvirus. Los anticuerpos fueron adquiridos en la compañía Agdia (Indiana, EEUU). Para las pruebas, se tomaron 100 mg de las semillas tratadas o de fracciones de tejido

foliar, según el caso y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia), incluyendo en cada prueba un control positivo y un control negativo. Los pozos fueron considerados con reacción positiva cuando la absorbancia a 405 nm era el doble de la lectura del control negativo, siguiendo el criterio de Matthews [17].

Los resultados de niveles de incidencia viral fueron analizados a través de un modelo lineal generalizado aleatorio considerando una distribución binomial para la variable incidencia y utilizando una función de ligamiento logit. Los efectos aleatorios fueron: zona, lotes dentro de zonas y frutos dentro de lotes de cultivo dentro de zonas, para el caso del análisis de semillas; y zonas y plántulas de vivero para el caso del material de siembra comercializado. Para la evaluación de las plántulas germinadas en invernadero, el efecto fijo fue la procedencia de los frutos (plantas asintomáticas vs sintomáticas) y los efectos aleatorios los mismos indicados para las pruebas de semillas y viveros. Para el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GLIMMIX del programa estadístico SAS versión 9.1.3.

Identificación molecular de virus

Los ácidos nucleicos molde en las pruebas de RT-PCR para los virus PLRV, PVY y CMV, fueron obtenidos de plantas adultas infectadas, mediante la extracción de ARN total con el kit comercial Qiagen (California, EEUU) e inmunocaptura post-ELISA siguiendo el protocolo de Kogovsek et al., [18].

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en dos pasos con cebadores específicos (Cuadro 2) en un volumen de 20 µl, incluyendo 5,25 µl de agua, 2 µl de buffer 10X de enzima, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cebadores 50 µM, 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40U/µl), 0,25 µl de enzima transcriptasa reversa M-MuLV (Fermentas, Lituania) y 5 µl de ARN (cs y/o dc). El programa consistió de 42°C por 30 min y 99°C por 5 min. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µl con 11,6 µl de agua, 2,5 de buffer de enzima 10X, 1,25 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTPs 25 mM, 1 µl de cada cebador (10 µM), 0,125 µl de Taq ADN polimerasa (Fermentas) y 2,5 µl de ADNc.

El programa de PCR consistió de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50-55°C (Cuadro

2) por 3 min, 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis, purificados directamente del gel mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y secuenciados en un secuenciador ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems, EEUU). Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante los programas BioEdit 6.0.6 y Chromas 1.45, construyéndose secuencias consenso y confirmando su identidad con genes virales por comparación con las bases de datos moleculares, mediante el programa BLASTn.

RESULTADOS

Evaluación serológica de virus en semilla

Las pruebas de ELISA para semilla detectaron la pre-

sencia de cinco (AMV, CMV, potyvirus, PLRV y ToMV) de los siete virus evaluados en al menos una muestra, no encontrándose en ninguna de ellas TSWV y ToRSV. Los virus PLRV y potyvirus fueron los más frecuentemente asociados, con niveles de incidencia promedio de 26% y 16%, respectivamente. El efecto de las zonas de colección fue evidente, al encontrarse regiones como el Oriente cercano de Antioquia donde dichos niveles fueron tan altos como 94% para PLRV y 75% para potyvirus, mientras que en zonas como el Valle de Sibundoy (Putumayo) y el Oriente lejano de Antioquia (La Unión, Sonsón) dichos niveles fueron de 6,5 y 9% para PLRV y 7,5 y 4,5% para potyvirus, respectivamente (Figura 1). El virus CMV se encontró en un 21% de las muestras del Oriente cercano de Antioquia, pero en las demás zonas su incidencia fue marginal (menor al 2%), como también lo fueron los virus AMV y ToMV, que no superaron el 4%. En Cundinamarca, la zona de Granada

Cuadro 1. Procedencia de las muestras de plántulas de vivero de tomate de árbol utilizadas para la detección de virus mediante pruebas de ELISA.

Vivero*	Departamento	Zona	Región/Municipio	Vereda
C	Antioquia	Oriente Cercano	Carmen de Viboral	Quirama
U	Antioquia	Oriente Lejano	La Unión	Primavera
SR	Antioquia	Norte Antioqueño	Santa Rosa de Osos	Palenque
A	Cundinamarca	Anolaima	Anolaima	El Alto
G	Cundinamarca	Granada	Granada	San Raymundo
SB	Cundinamarca	San Bernardo	San Bernardo	Primavera
N	Nariño	Nariño	Córdoba	Chair
P	Putumayo	Putumayo	Colón	San Pedro

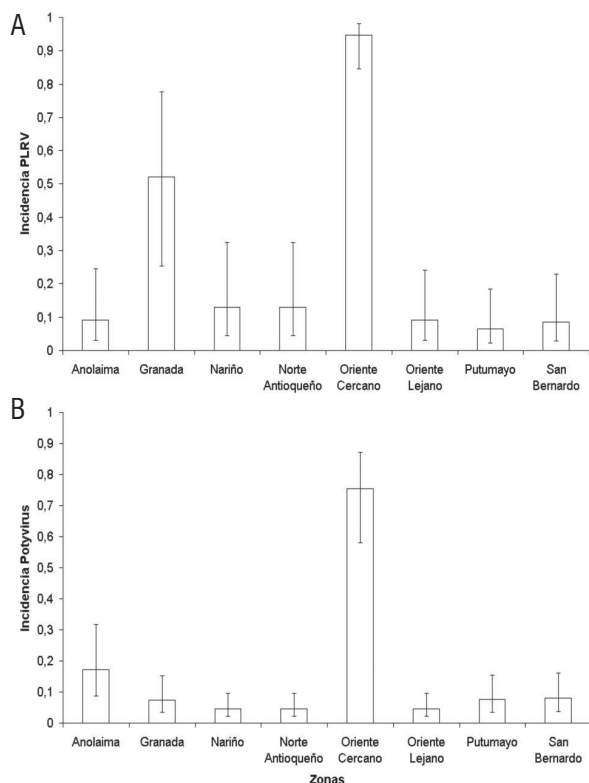
* Cada muestra está representada por 20 plántulas. Las letras representan la inicial del municipio donde se ubica el vivero.

Cuadro 2. Cebadores específicos utilizados en la detección por RT-PCR de cada uno de los virus bajo estudio.

Virus	Cebadores*	Secuencia	Amplicón	°C Annealing
CMV	FCP	5'- GAT CCG CTT CTT CTC CGC GAG- 3'	ARN-2 820 pb, ARN3 870 pb	52°C
	RCP	5'- GCC GTA AGC TGG ATG GAC- 3'	ARN-2 820 pb, ARN3 870 pb	52°C
	CMV-spainF	5'- GTA GAC ATC TGT GAC GCG A- 3'	510 pb	54°C
	CMV-spainR	5'- GCG CGA AAC AAG CTT CTT ATC- 3'	510 pb	54°C
PLRV	F	5'- CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC- 3'	336 pb	54°C
	R	5'- GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT- 3'	336 pb	54°C
Potyvirus	PNBF1	5'-GG(GCT) AA(CT) AAT AGT GG(AGCT) CAA CC- 3'	1200 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
	R	5'- TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT- 3'	480 pb	53°C

* Los reportes originales de los cebadores se registran en Jaramillo [11]

Figura 1. Niveles de incidencia mediante pruebas de ELISA, de los virus PLRV (A) y Potyvirus (B) en semillas de tomate de árbol en cuatro departamentos de Colombia. Las líneas dentro de las barras indican los intervalos de confianza al 95%.



presentó diferencias significativas para la detección de PLRV (52%) con respecto a las otras dos regiones evaluadas (9,2% y 8,4% para Anolaima y San Bernardo, respectivamente), mientras que los potyvirus fueron detectados en 17,2% de las muestras de Anolaima, 7,5% en Granada y 8% en San Bernardo, no presentándose diferencias significativas entre dichas zonas (Figura 1).

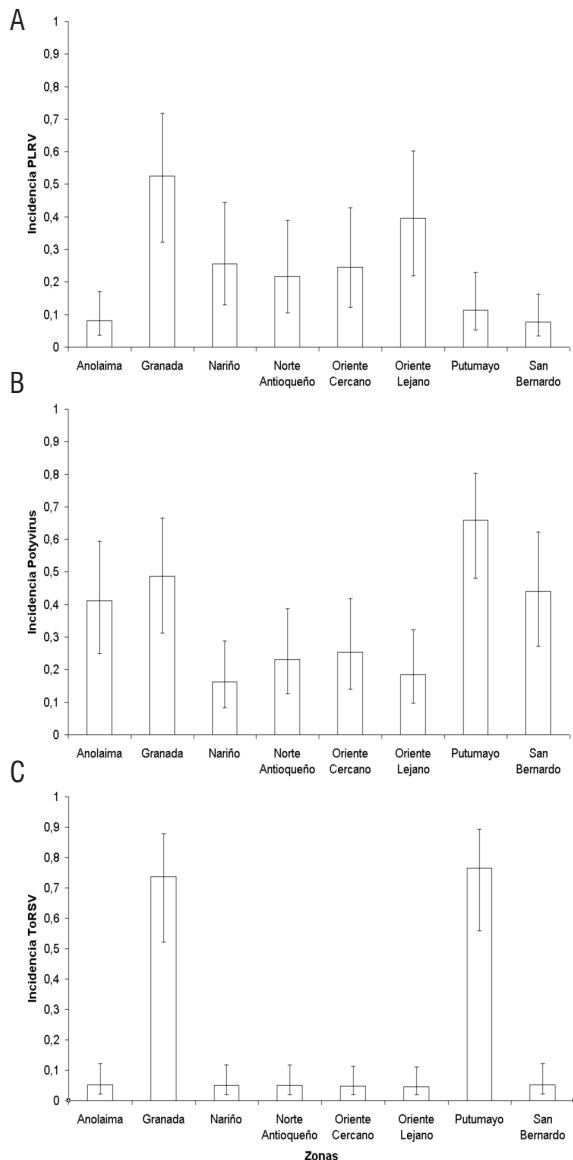
En Colombia los agricultores y viveristas de tomate de árbol utilizan la semilla como base para el establecimiento de sus cultivos y para la comercialización de plántulas. Esta investigación encontró la presencia de AMV, CMV, potyvirus, PLRV y ToMV, en la semilla de este frutal. Al comparar los niveles de incidencia de los virus detectados en semilla de tomate de árbol con los resultados encontrados por Ayala [9] en Antioquia para potyvirus y por Jaramillo [11] para AMV, CMV, PLRV, ToMV, ToRSV, TSWV, en tejido foliar de plantas adultas de diferentes regiones del país, se observó una correspondencia general entre estos estudios, aunque presentándose menores niveles de detección de virus en semilla. En este sentido, los potyvirus y PLRV fueron

detectados como los virus predominantes, mientras que AMV, TSWV, ToRSV y ToMV solamente se detectaron marginalmente o no fueron encontrados en algunas de las regiones sobre plantas adultas y/o semilla. Esta concordancia no ocurrió para el caso de CMV, por cuanto las pruebas sobre plantas adultas realizadas por Jaramillo [11] en Antioquia indicaron niveles de incidencia promedio del 56% para este virus, presentándose incluso zonas como el suroeste Antioqueño donde se detectó en el 92% de las muestras evaluadas; mientras que en el presente estudio CMV sólo se encontró en forma importante en muestras de semilla procedentes del Oriente cercano del departamento de Antioquia, no superando el 21% de incidencia, siendo su detección marginal en semillas de las otras regiones del país.

Evaluación serológica de virus en plántulas de vivero

La detección de virus en plántulas de viveros de cada una de las zonas bajo estudio, indicaron la presencia de PLRV, potyvirus, ToRSV (22%) y CMV (0,6%) en las muestras analizadas, siendo los potyvirus los que se encontraron con mayores niveles de incidencia, con un promedio de 35% y niveles que variaron de 16% en las plantas del vivero del departamento de Nariño, a 65% en el vivero de la zona del Valle del Sibundoy (Putumayo) (Figura 2). Por otra parte, el PLRV se detectó en el 24% de las plántulas analizadas en el país, aunque en las zonas de San Bernardo y Anolaima (Cundinamarca), y del Putumayo, su nivel de incidencia fue inferior al 11%, presentándose diferencias significativas con los demás viveros analizados. El virus ToRSV fue encontrado con altos niveles de incidencia (73 a 76%) en plántulas de los viveros de Granada (Cundinamarca) y Putumayo, mientras que en las demás zonas dichos niveles sólo alcanzaron un 5% en promedio. Este hallazgo resultó inesperado, por cuanto el ToRSV, no fue detectado en semilla en esta investigación y sólo se había encontrado en forma marginal en evaluaciones de campo realizadas por Jaramillo [11]. En tomate de árbol el virus ToRSV se ha registrado en Ecuador causando encrespamiento de hojas, epinastia, amarillamiento de hojas y menos frecuentemente manchas cloróticas y necróticas [23], aunque de acuerdo a Vizúete *et al.*, [12] su efecto es tenue y no representa mayor importancia para este cultivo. La presencia de dicho virus en viveros de ambas regiones, supone la presencia de nematodos vectores en los suelos utilizados para la preparación del sustrato, aunque esta situación requiere de comprobación experimental.

Figura 2. Niveles de incidencia mediante pruebas de ELISA, de los virus PLRV (A), Potyvirus (B) y ToRSV (C) en plántulas de vivero de cuatro departamentos de Colombia. Las líneas dentro de las barras indican los intervalos de confianza al 95%.



Evaluación serológica de virus en plántulas germinadas en invernadero

Las pruebas de ELISA para estas plántulas, no detectaron los virus AMV, CMV y ToMV, pero sí a PLRV y potyvirus. De esta forma el 16,4% de las 280 plántulas analizadas y procedentes de semillas de frutos asintomáticos resultaron positivas para potyvirus, mientras que el 6,8% lo fue para PLRV. Similarmente, el 20% de las plántulas procedentes de la germinación de semillas

de frutos sintomáticos resultaron positivas para potyvirus y el 14% lo fueron para PLRV.

Al analizar individualmente lo encontrado para las semillas de cada zona evaluada, se determinó que en regiones como el Oriente cercano, una alta proporción de las plántulas obtenidas de semillas procedentes tanto de plantas asintomáticas como sintomáticas, presentaban potyvirus (61,5% y 92,3%, respectivamente), así mismo resaltó el hecho que en el 68,4% de las plántulas procedentes de semilla de plantas asintomáticas de Anolaima (Cundinamarca) se detectó PLRV, mientras que este porcentaje fue de 13,5% para las de procedencia de plantas asintomáticas. En ninguna de las plántulas analizadas y obtenidas a partir de semillas de plantas asintomáticas en el Norte Antioqueño, Oriente Antioqueño lejano, Córdoba (Nariño) y Valle del Sibundoy (Putumayo), se detectaron los virus PLRV y potyvirus, aunque esto sí ocurrió en las plántulas germinadas de semillas de plantas sintomáticas, para al menos uno de los virus (Cuadro 3).

Estos resultados se constituyen en el primer reporte mundial de la transmisión del PLRV por medio de semilla sexual, lo cual amplía el concepto que indicaba que dicho virus era transmitido solamente por áfidos de manera persistente no propagativa, siendo las especies *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* las más eficientes para su transmisión; por semilla asexual o mediante injerto en evaluaciones experimentales [19, 20]. La ausencia de reportes de la transmisión de PLRV vía semilla sexual, puede estar muy influenciada por el hecho que el estudio de dicho virus generalmente se ha reducido a su interacción con plantas de papa, su principal hospedante agrícola, dada su propagación vía tubérculos.

Identificación molecular de virus

Las pruebas de RT-PCR permitieron obtener amplicones del tamaño esperado para los virus PLRV (330 pb) y PVY (480 pb) (potyvirus) (Figura 3). Estos amplicones fueron confirmados como asociados a los genes de la cápside mediante secuenciación y comparación con las bases de datos moleculares. Los cebadores genéricos para el grupo no permitieron detectar en material de siembra al TaMLV, recientemente identificado por Ayala et al., [9] en cultivos de Antioquia, pero sí fue posible el diagnóstico de PVY mediante cebadores específicos para esta especie. Los cebadores utilizados para CMV no

Cuadro 3. Detección mediante pruebas de ELISA de los virus PLRV y potyvirus en plántulas de dos meses de edad mantenidas bajo invernadero y obtenidas a partir de semillas provenientes de frutos de plantas asintomáticas y sintomáticas.

Zona	Procedencia de semilla*	No. Plantas analizadas	Plantas positivas para ELISA	
			Potyvirus	PLRV
Oriente Cercano	Asintomáticos	65	40 (61,5%)**	0
Oriente Cercano	Sintomáticos	13	12 (92,3%)	6 (46,1%)
Norte Antioqueño	Asintomáticos	35	0	0
Norte Antioqueño	Sintomáticos	21	10 (47,6%)	4 (19%)
Oriente Lejano	Asintomáticos	30	0	0
Oriente Lejano	Sintomáticos	26	4 (15,3%)	0
Anolaima	Asintomáticos	19	0	13 (68,4%)
Anolaima	Sintomáticos	38	0	5 (13,5%)
San Bernardo	Asintomáticos	39	6 (15,4%)	6 (15,4%)
San Bernardo	Sintomáticos	17	3 (17,6%)	0
Nariño	Asintomáticos	60	0	0
Nariño	Sintomáticos	32	4 (12,5%)	0
Putumayo	Asintomáticos	32	0	0
Putumayo	Sintomáticos	17	0	8 (47%)
TOTAL	Asintomáticos	280	46 (16,4%)	19 (6,8%)
	Sintomáticos	164	33 (20,1%)	23 (14%)

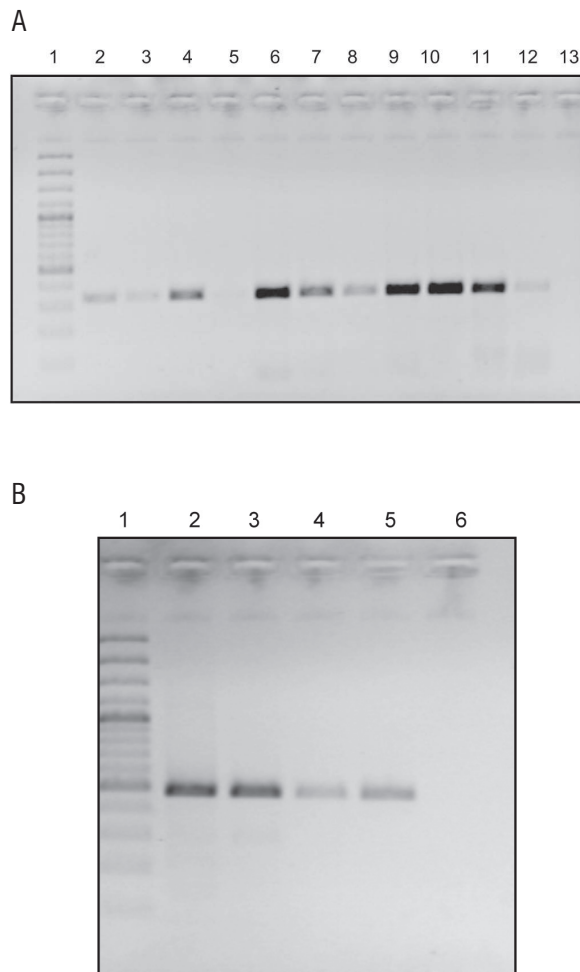
* Asintomáticas: Plántulas obtenidas a partir de semillas de frutos aparentemente sanos de enfermedades virales. Sintomáticas: Plántulas obtenidas a partir de semillas de frutos con síntomas de Virosis.
** Porcentajes de detección.

generaron amplicones confiables para su identificación. Estos resultados reafirman la necesidad de secuenciar los genomas de las variantes virales afectando cultivos de tomate de árbol en Colombia, de manera que sea posible el diseño de cebadores específicos que apoyen los programas de manejo integrado de dichos virus.

CONCLUSIONES

Esta investigación confirma la etiología compleja de la enfermedad denominada como virosis del tomate de árbol en Colombia, con agentes causales de los géneros

Figura 3. Amplificación por RT-PCR de una región del gen de la cápside del PLRV (A) y PVY (B) para muestras de semilla sexual y plántulas de vivero de tomate de árbol en Colombia. Líneas 1. Marcador 100pb. Líneas 13 y 6: Controles negativos



Potyvirus, Polerovirus, Cucumovirus, Tobamovirus y Nepovirus, entre otros.

Los resultados serológicos y moleculares indican la presencia de virus en la semilla de este frutal, confirmando la transmisión vertical de PVY y PLRV a plántulas germinadas a partir de semillas provenientes de frutos sintomáticos.

La investigación identifica a la producción y comercialización de plantas de vivero de tomate de árbol, como aspectos que deben ser tratados con mayor rigurosidad técnica, pues es claro que desde los propios viveros se están dispersando los diferentes virus que afectan este cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por Colciencias (proyecto 1118-405-20317) y DIME-UNALMED (proyecto 20101007745) convocatoria Bicentenario 2009. Se Agradece a la Prof. Luz Estela Lagos de la Universidad de Nariño, por el apoyo en la colección de muestras en Nariño y Putumayo.

REFERENCIAS

- [1] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Observatorio agrocadenas Colombia. Disponible: <http://www.agrocadenas.gov.co> [citado 30 de Enero de 2006]
- [2] SÁNCHEZ DE LUQUE, C. Estudios de hospedantes de un nuevo virus en el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt). Memorias V Congreso ASCOLFI, Cali (Colombia): 1982, p. 41-42.
- [3] TAMAYO, P.J. Mosaico del tomate de árbol. ASCOLFI Informa, 16, 1990, p. 54-55.
- [4] TAMAYO, P.J. Enfermedades virales del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav).Sendt.) en Colombia. ASCOLFI Informa, 22, 1996, p. 26-29.
- [5] BETANCOURTH, C., GOYES, R. y BRAVO, D.A. Caracterización biológica de un virus del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Send) en el departamento de Nariño. Fitopatología Colombiana, 27, 2003, p. 7-10.
- [6] MARTÍNEZ, J.E., GIL, J.F., AYALA, M.L., JARAMILLO, M., RODRÍGUEZ, V., LAGOS, L.E. y MARÍN, M. Virus asociados a la enfermedad de la virosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en los departamentos de Nariño y Putumayo de Colombia, Memorias XV Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Santiago (Chile): 2009, p. 226.
- [7] CRUZ, L.F. Identificación de virus en *Solanum betaceum*, [Tesis de Ingeniería Agronómica]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, 2005, 48 p.
- [8] CUSPOCA, J. Evaluación de virus de tomate de árbol (*Solanum betacea*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. [Tesis de Ingeniería Agronómica]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, 2007, 31 p.
- [9] AYALA, M., GONZÁLEZ, P., GUTIÉRREZ, P., COTES, J.M., MARÍN, M. Caracterización serológica y molecular de potyvirus asociados a la virosis del tomate de árbol en Antioquia (Colombia), Acta Biológica Colombiana, 15, 2010, p. 1-37.
- [10] GIL, J.F., AYALA M.L., MARÍN, M., GONZÁLEZ, P. Identificación de Potyvirus en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) en Antioquia mediante detección serológica. Revista Politécnica, 8, 2009, p. 112-120.
- [11] JARAMILLO, M. Análisis serológico y molecular de virus asociados al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia, [Tesis MSc. en Biotecnología]. Medellín (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, 2009, 127 p.
- [12] 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, 1990, 3 p.
- [13] EAGLES, R., GARDNER, R. y FORSTER, R. Incidence and distribution of six virus infecting Tamarillo (*Cyphomandra betaceum*) in New Zealand, New Zealand Journal of Crop Horticultural Science, 22, 1994, p. 453-458.
- [14] BERNAL, J.A., SALDARRIAGA, A. y ZAPATA, J.L. Evaluación de la transmisión del virus del tomate de árbol, Informe final proyecto CORPOICA-PRONATTA, 1998, 55p.
- [15] ASTIER, S., ABOUY, J., MAURY, Y., ROBAGLIA, C. and LECOQ, H. Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus, Ecology. Paris (Francia): Science Publisher, 2007, 472 p.
- [16] KHAN, J. and DIJKSTRA, J. Plant viruses as molecular pathogens. Oxford (UK): Food Product Press, 2002, 537 p.
- [17] MATTHEWS, R.E.F. Diagnosis of plant virus diseases. Boca Raton (EEUU): CRC Press, 1993, 374 p.
- [18] KOGOVSEK, P., GOW, L., POMPE-NOVAK, M., GRUDEN, K., FOSTER, G.D., BOONHAM, N. and RAVNIKAR, M. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates, Journal of Virological Methods, 149, 2008, p. 1-11.
- [19] HULL, R. Mathew's Plant virology. 4 ed. New York (EEUU): Elsevier Academic Press, 2004, 1001 p.
- [20] ALVAREZ, A.E., GARZO, E., VERBEEK, M., VOSMAN, B., DICKE, M. and TJALLINGII, W.F. Infection of potato plants with *Potato leafroll virus* changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 125, 2007, p. 135-144.