



Juan Esteban Martínez Duque¹

José Miguel Cotes Torres²

Mauricio Marín Montoya^{3,4}

DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE VIRUS EN ÁFIDOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL CON SÍNTOMAS DE VIROSIS EN ANTIOQUIA, Y NARIÑO (COLOMBIA)

SEROLOGICAL AND MOLECULAR DETECTION OF VIRUSES IN APHIDS ASSOCIATED WITH TREE TOMATO WITH SYMPTOMS OF VIRUS IN ANTIOQUIA AND NARIÑO (COLOMBIA)

Fecha de recepción: 15 de septiembre de 2010

Fecha de aceptación: 13 de noviembre de 2010

1 Ingeniero Agrónomo, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

2 Profesor Asociado, Departamento de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

3 Profesor Asociado, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

4 Autor para correspondencia: mamarinm@unal.edu.co

RESUMEN

La virosis del tomate de árbol es una de las enfermedades de mayor importancia económica en las regiones productoras de este frutal en Colombia. Recientemente, se ha determinado que esta enfermedad es causada por un complejo viral, del cual hacen parte entre otros: potyvirus, cucumovirus, alfamovirus y polerovirus. Algunas de las especies de estos géneros virales son transmitidas en los cultivos por áfidos. El manejo de las enfermedades virales se fundamenta en el uso de semilla sana y en el control de las poblaciones de sus vectores. Esta investigación se planteó con el fin de identificar algunas de las principales especies de áfidos presentes en los cultivos de tomate de árbol en los cultivos de Antioquia y Nariño, evaluando su posible participación como vectores de los virus *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato leaf roll virus* (PLRV) y *Potyvirus*, mediante la utilización de pruebas de ELISA, RT-PCR y secuenciación de la cápside viral. Los áfidos obtenidos en los dos departamentos fueron inicialmente diferenciados con base en su morfología en dos grupos: áfidos negros y verdes, procediéndose a su identificación con base en las secuencias de una región del gen mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I (COI), como *Aphis gossypii* y *Macrosiphum euphorbiae*. Los resultados de las pruebas serológicas indicaron la presencia de Potyvirus y PLRV para las muestras de *A. gossypii* de Nariño y Antioquia, mientras que CMV se detectó en ambas especies de áfidos en cultivos de Nariño, pero no en Antioquia. Las pruebas de RT-PCR permitieron la obtención de los amplicones esperados para PLRV y *Potato virus Y* (PVY) a partir

del ARN extraído de individuos de *A. gossypii*, situación que fue confirmada por secuenciación. Esta investigación plantea la necesidad de realizar estudios epidemiológicos que evalúen la prevalencia de los áfidos detectados en diferentes regiones cultivadoras de tomate de árbol del país, su eficiencia en la transmisión de los virus detectados y su posible patogenicidad cruzada con cultivos como papa, tomate y otras solanáceas en los Andes de Colombia.

Palabras clave: *Aphis gossypii*, CMV, *Macrosiphum euphorbiae*, PLRV, PVY.

ABSTRACT

Virus diseases of tamarillo orchards are one of the most economically important biotic problems of this crop in Colombia. Recently, it has been determined that this disease is caused by a virus complex, including: potyvirus, cucumovirus, alfamovirus and polerovirus. Some species of these viruses are transmitted by aphids in different crops. Management of viral diseases is based on using healthy seed and control of vector populations. This research was developed to identify some of the main species of aphids present in the tamarillo crops from provinces of Antioquia and Nariño, evaluating their possible role as vectors of *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato leaf roll virus* (PLRV) and potyvirus, through ELISA, RT-PCR and sequencing of the viral capsid gene (CP). Aphids from the two provinces were initially differentiated based on their morphology into two groups: black and green aphids, which were identified as *Aphis gossypii* and *Macrosiphum euphorbiae*, respectively, based on the sequences of a region of mitochondrial gene

cytochrome oxidase subunit I (COI). The results of serological tests indicated the presence of PLRV and potyvirus for samples of *A. gossypii* from Nariño and Antioquia, while CMV was detected in both species of aphids in crops from Nariño, but not from Antioquia. The RT-PCR tests produced the expected amplicons for PLRV and *Potato virus Y* (PVY) from extracted RNA in individuals of *A. gossypii*. This result was confirmed by sequencing of CP. This research suggests the need for epidemiological studies assessing the prevalence of aphids found in different tamarillo growing regions of the country, their transmission efficiency and possible cross-pathogenicity to other solanaceous crops such as potatoes and tomatoes in the Andes of Colombia.

Key words: *Aphis gossypii*, CMV, *Macrosiphum euphorbiae*, PLRV, PVY.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) se ha constituido en una alternativa viable para los agricultores de las regiones andinas de Colombia, reemplazando cultivos tradicionales que dejan bajos niveles de rentabilidad y como sustituto de los cultivos ilícitos, dadas sus excelentes características organolépticas y su gran aporte nutricional, que lo hacen muy atractivo para la industria de bebidas y alimentos en fresco (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006).

Antioquia y Nariño se han constituido en dos de los principales productores de este frutal, contribuyendo al crecimiento de la demanda interna y a la exportación de esta fruta hacia diferentes países. Sin embargo, la presencia

de diferentes problemas fitosanitarios entre los cuales se destacan la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) y la virosis del tomate de árbol, vienen afectando drásticamente los planes de expansión del cultivo. Los principales síntomas asociados a la virosis del tomate de árbol corresponden a mosaicos foliares acompañados de ampollamiento, engrosamiento y amarillamiento de venas, cambios en la coloración y textura de los frutos, reducción en la producción y disminución de la longevidad de las plantas afectadas (Tamayo, 1996; Betancourth *et al.*, 2003; Cruz, 2005; Gil *et al.*, 2009).

Esta diversidad de síntomas se ha asociado a un complejo viral del cual hacen parte los virus *Potato leaf roll virus* (PLRV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWW), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y al menos dos especies de Potyvirus: *Potato virus Y* (PVY) y *Tamarillo leaf malformation virus* (TaLMV) (Ayala, 2009; Jaramillo, 2009; Álvarez, 2010). Sin embargo, la importancia de cada uno de estos virus sobre el rendimiento y la reducción en el período de producción de los cultivos de tomate de árbol del país, no se ha determinado plenamente, así como tampoco sus hospedantes alternos, ni sus mecanismos específicos de transmisión.

Los virus no pueden penetrar la cutícula de la plantas, razón por la cual necesitan de la ayuda de insectos, ácaros, hongos o nemátodos para su transmisión y permanencia en un hospedante, aunque en la agricultura su dispersión por medios mecánicos, propagación vegetativa y eventualmente por semilla botánica, son especialmente importantes (Salazar, 1995; Hull, 2004). La mayoría de los vectores de virus son

los insectos chupadores, dentro de los cuales se encuentran aquellos del orden Hemiptera (áfidos, moscas blancas, saltahojas, saltapuntas), aunque también existen vectores con aparato bucal masticador, especialmente del orden Coleoptera y raspador (Thysanoptera) (Agrios, 2005; Astier et al., 2007). Entre los insectos, los áfidos (Aphididae) son el grupo más importante de vectores de virus de plantas, siendo aproximadamente responsables del 66% de los virus transmitidos por invertebrados en hospedantes vegetales (Hull, 2004; Astier et al., 2007).

Diferentes modos de transmisión se pueden presentar debido a la biología y la anatomía de los vectores, las estructuras externas de los virus, las propiedades intrínsecas de la proteína de la cápside viral y su genoma (Khan y Dijkstra, 2006). Entre las especies de áfidos, las características morfológicas y de comportamiento, como estructura bucal, modo de alimentación, forma de dispersión en búsqueda de hospederos, forma biológica (alados o ápteros), alternancia de generaciones y tasa de reproducción, son fundamentales para determinar su capacidad de transmitir los virus de manera efectiva (Astier et al., 2007).

Existen diferentes formas de transmisión de los virus por los insectos (circulativos y no circulativos); estos varían en el tiempo de adquisición en la planta enferma, incubación en el vector y el período de inoculación en la planta sana. Los virus circulativos, no se transmiten mecánicamente, algunos se transmiten por semilla y abundan en las células del floema. Se llaman virus circulativos porque se acumulan y movilizan dentro del vector hasta llegar a las glándulas salivales. Estos virus son clasificados en circulativos propagativos y no propagativos,

según si se replican o no en el interior del vector (Reinbold et al., 2003). Generalmente los virus que se transmiten de forma no circulativa lo hacen mecánicamente y abundan en las células del parénquima o en el floema. Este grupo se clasifica de acuerdo a si el virus permanecen minutos/horas (no persistente) o días/semanas (semipersistente) en el vector. (Singh et al., 1996; Reinbold et al., 2003).

De los virus detectados en tomate de árbol en el país, es bien conocida la transmisión de forma no circulativa que realizan los áfidos del virus PVY en cultivos de papa (Salazar, 1995; Schubert et al., 2007) y del CMV en cucurbitáceas y otros hospedantes (Sokhandan et al., 2006), mientras que el PLRV se transmite de forma circulativa (Singh et al., 1995). Sin embargo, en el país sólo existen reportes de la transmisión por áfidos de la especie *Myzus persicae*, de un potyvirus no identificado en cultivos de tomate de árbol del departamento de Nariño. Los síntomas asociados a dicho virus se caracterizan por la presencia de manchas aceitosas, clorosis, mosaicos, distorsiones en color, tamaño y forma de las hojas y frutos (Betancourth et al., 2003). En Nueva Zelanda, Eagles (1994) reportó la transmisión del potyvirus *Tamarillo mosaic virus* (TaMV) por esa misma especie de áfido y Vizueté et al. (1994) confirmó que *M. persicae* transmitía el PLRV en cultivos de este frutal en Ecuador.

Tradicionalmente la detección de la transmisión de virus por áfidos ha sido realizada a partir de pruebas de inoculación en ambientes controlados, de un determinado número de individuos de la especie en evaluación, sobre una o varias plantas hospedantes (Matthews, 1993). En los últimos años la utilización de técnicas serológicas y moleculares

para la detección directa de los virus en los insectos colectados sobre las plantas en el campo han ganado fuerza, debido al aumento en la rapidez y sensibilidad que ofrecen éstas. Así por ejemplo, existen reportes que han validado el uso de metodologías basadas en ELISA (Clark *et al.*, 1980; Vizuetta *et al.*, 1990), RT-PCR (Singh *et al.*, 1996; Nie y Singh, 2001; Cambra *et al.*, 2004), IC-RT-PCR (Ahouee *et al.*, 2010) y RT-PCR en tiempo real (Fabre *et al.*, 2003; Olmos *et al.*, 2005) para la detección de virus en áfidos de diferentes cultivos.

Debido al desconocimiento generalizado que se tiene en los cultivos de tomate de árbol del país del papel que juegan los áfidos como vectores de algunos de los virus asociados a la virosis, en este trabajo se realizó una evaluación de la identidad taxonómica de algunas de las especies de áfidos presentes en cultivos de los Departamentos de Antioquia y Nariño, además de la detección serológica y molecular de los virus CMV, PLRV y Potyvirus en extractos de áfidos, como una manera de contribuir al conocimiento de esta importante variable epidemiológica, fundamental para el desarrollo de estrategias de manejo de las enfermedades virales de este cultivo en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Las muestras de áfidos fueron obtenidas de cultivos de tomate de árbol que se encontraban afectados por virosis localizados en los departamentos de Antioquia

(municipios Carmen de Viboral, veredas Samaria y Quirama; Santa Rosa de Osos, veredas Palenque y La Chapa) y Nariño (municipio de Córdoba, vereda El Chair). En cada municipio se registraron por la presencia de áfidos, un mínimo de cinco cultivos de tomate de árbol en etapa de producción. En aquellos cultivos donde se encontró una alta cantidad de áfidos, se procedió a su colección con la ayuda de un pincel fino, requiriéndose un mínimo de 300 mg para las pruebas posteriores de laboratorio.

Identificación molecular de áfidos

En el campo se realizó la separación morfológica de los áfidos que se encontraban alimentando de plantas de tomate de árbol, dividiéndose en áfidos verdes y negros. Así, en Antioquia se obtuvieron dos muestras de áfidos negros mientras que en Nariño se colectaron dos muestras de áfidos negros y dos muestras de áfidos verdes. La identificación se realizó a partir de las seis muestras de áfidos colectadas, procediéndose a la extracción de su ADN a partir de la maceración de 100 mg de áfidos con nitrógeno líquido y el uso del kit DNeasy plant mini kit (Qiagen, California, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de PCR consistieron de: 36.7 μL de agua, 4 μL de MgCl_2 (25 mM), 5 μL Buffer 10X, 1 μL de dNTPs (2,5 mM), 0.5 μL de cada cebador (10 μM) (HCO: 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3' y LCO: 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3') (Stahls y Savolainen, 2008), 0.3 μL de Taq ADN polimerasa (5 U μL^{-1}) y 2 μL de ADN para un total de 50 μL de volumen. El programa de amplificación

consistió de una fase inicial de separación de la doble cadena a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 93°C por 30 s, 48°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% suplementado con 4 µL de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹), visualizados utilizando un transiluminador UV (Biometra, Göttingen, Alemania) y su tamaño verificado por comparación con el marcador de peso molecular Generuler 100 pb DNA ladder (Fermentas).

Los amplicones del tamaño esperado para cada una de las muestras (áfidos verdes y áfidos negros), fueron purificados directamente del gel mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), para proceder a su secuenciación directa utilizando los cebadores para el gen Citocromo Oxidasa en la compañía Macrogen (Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante el software BioEdit 6.0.6 y Chromas 1.45, construyéndose secuencias consenso y confirmándose la identidad de las especies de áfidos por comparación con el GenBank mediante el programa Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Detección serológica de virus en áfidos colectados en cultivos de tomate de árbol

A partir de las seis muestras de áfidos colectadas se procedió al diagnóstico viral mediante pruebas de ELISA de la compañía Agdia (Indiana, EEUU), para los virus PLRV, CMV y Potyvirus asociados a la virosis del tomate de árbol en Colombia (Jaramillo, 2009) y reportados como virus transmitidos por áfidos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las siguientes son las características de las pruebas realizadas: a) CMV: Prueba de TAS-ELISA utilizando anticuerpos policlonales y detección con mezcla de anticuerpos monoclonales, uno de ellos conjugados a la enzima Fosfatasa alcalina, b) PLRV: Prueba de DAS-ELISA utilizando anticuerpos policlonales y detección con anticuerpos policlonales conjugados a la enzima Fosfatasa alcalina, c) Grupo de Potyvirus: Prueba de ACP-ELISA utilizando anticuerpos monoclonales desarrollados por USDA (Beltsville, Maryland, USA) y detección con anticuerpo monoclonal conjugado a la enzima Fosfatasa alcalina.

Cada prueba incluyó un control positivo (suministrado por el fabricante en forma liofilizada) y un control negativo (buffer de

Debido al desconocimiento generalizado que se tiene en los cultivos de tomate de árbol del país del papel que juegan los áfidos como vectores de algunos de los virus asociados a la virosis, en este trabajo se realizó una evaluación de la identidad taxonómica de algunas de las especies de áfidos presentes en cultivos de los Departamentos de Antioquia y Nariño.

extracción). Los pozos con reacción positiva se consideraron como aquellos en los cuales la lectura de absorbancia a 405 nm obtuvo un valor mínimo del doble de la lectura obtenida en el control negativo, siguiendo el criterio de Matthews (1993). Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un espectrofotómetro Multiscan (Labsystem, Finlandia).

Identificación molecular de virus en áfidos

Se llevó a cabo mediante el empleo del kit RNeasy plant mini kit (Qiagen, California, EEUU) a partir de una de las muestras de áfidos que resultaron positivas en las pruebas de ELISA para cada virus. Para este procedimiento se maceraron 100 mg de áfidos (verdes y negros), utilizando 450 μ L de buffer RLT y 10 μ L de β -mercaptoetanol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Al finalizar el procedimiento, el ARN obtenido fue resuspendido en 30 μ L de agua destilada estéril libre de ARNasas.

Las reacciones de RT-PCR se realizaron con el kit Qiagen OneStep RT-PCR (California, EEUU), incluyendo 5 μ L de ARN total, 0,6 μ M de cada cebador específico para PVY (Potyvirus) (PVYF: 5' ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC 3' y PVYR: 5' TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT 3'), CMV (CMVF: 5' GAT CCG CTT CTT CTC CGC GAG 3' y CMVR: 5' GCC GTA AGC TGG ATG GAC 3') y PLRV (PLRVF: 5' CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC 3' y PLRVR: 5' GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT 3') (Rizos *et al*, 1992; Singh *et al*, 1995; Nei y Singh, 2001), 1X de Buffer QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 400 μ M de dNTPs y 2 μ L de mezcla de enzimas Qiagen (transcriptasa reversa Omniscript, transcriptasa reversa Sensiscript y Polimerasa de ADN HotStarTaq). El programa de amplificación consistió de una fase

inicial de síntesis de la primera cadena a 50°C por 30 min, seguido de la activación de la Taq polimerasa 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 fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% suplementado con 4 μ L de bromuro de etidio (10mg mL⁻¹), visualizados utilizando un transiluminador UV (Biometra, Göttingen, Alemania) y su tamaño verificado por comparación con el marcador de peso molecular Generuler 100 pb DNA ladder (Fermentas).

Los amplicones del tamaño esperado para los virus evaluados, fueron purificados directamente del gel mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), para proceder a su secuenciación directa utilizando los mismos cebadores del RT-PCR. Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante el software BioEdit 6.0.6 y Chromas 1.45, construyéndose secuencias consenso y confirmándose su identidad con genes virales por comparación con las bases de datos moleculares, mediante el programa Blastn.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sintomatología asociada a la virosis del tomate de árbol

La enfermedad de la virosis del tomate de árbol ha ocasionado grandes pérdidas en las regiones cultivadoras de este frutal en Colombia (Gil *et al*, 2009; Alvarez, 2010). Las observaciones en campo indicaron que los síntomas asociados a dicha enfermedad se caracterizan principalmente por presentar una gran variedad de deformaciones en el área foliar y



Figura 1. Sintomatología asociada a la virosis del tomate de árbol en hojas y frutos en cultivos de Antioquia y Nariño.

cambios en la coloración y textura de los frutos, aunque para cada una de las regiones muestreadas predominó un rango de síntomas característicos a la enfermedad. Los síntomas de la virosis del tomate de árbol en Antioquia se manifestaron inicialmente a principios de los años noventa en Santa Rosa de Osos y en el Oriente Antioqueño (Tamayo, 1990; Saldarriaga y Bernal, 1994). En esta investigación, los síntomas observados en Antioquia se

caracterizaron por la presencia de mosaicos acompañados de bronceado, engrosamiento de nervaduras, ampollamientos 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 daños en la calidad de la fruta. Esta sintomatología coincidió plenamente con la descripción detallada que realizó Jaramillo (2009) de la virosis del tomate de árbol en cinco regiones productoras de este frutal en Antioquia. En Nariño, las observaciones en campo indicaron además de los mosaicos, la presencia de manchas aceitosas y anillos cloróticos, los cuales estaban acompañados de clorosis general en las hojas. En los frutos, los síntomas se asemejaban a los observados en Antioquia (Figura 1).



Figura 2. Amplificación mediante PCR del gen mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad I a partir de ADN de áfidos asociados a cultivos de tomate de árbol.

Identificación molecular de áfidos

Los cebadores utilizados para la amplificación de la subunidad I del gen Col tanto para los áfidos verdes como para los áfidos negros, permitieron la obtención de los amplicones del tamaño indicado por Stahls y Savolainen (2008) a partir de las muestras bajo análisis

(Figura 2), seleccionándose para secuenciación un amplicón de cada tipo de áfido por departamento. El análisis Blast de las secuencias generadas en este estudio, indicó la identidad taxonómica de los áfidos verdes como *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) mientras que los áfidos negros correspondieron a la especie *Aphis gossypii* (Glover). De esta forma, para el departamento de Antioquia solo se encontró la especie *A. gossypii*, mientras que en Nariño ambas especies fueron identificadas.

Los áfidos son insectos chupadores de plantas que comprenden más de 4000 especies en todo el mundo, lo que evidentemente representa un gran nivel de complejidad al momento de realizar la identificación morfológica de dichas especies (Ortiz et al., 2004). El ADN mitocondrial ha sido ampliamente usado en estudios evolutivos, poblacionales y como apoyo en la identificación de especies de insectos (Footitt et al., 2008). Dependiendo del gen empleado y del organismo en estudio, las secuencias de ADN mitocondrial permiten diferenciar desde categorías taxonómicas superiores como orden hasta niveles infraespecíficos como razas y formas (Marín et al., 2009). Para el caso de la identificación de especies de áfidos, Footitt et al. (2008) han evaluado la utilidad de la región 5' del gen COI, recomendándola como ideal para su implementación como código de barras de ADN para los miembros de este grupo. Estos autores reportan que mediante su utilización fue posible discriminar 300 especies de áfidos de 130 géneros diferentes, con un porcentaje de variación intraespecífico de tan sólo 0,2%.

De gran interés resultó el hecho que la especie *Myzus persicae* no fue detectada en

los cultivos de tomate de árbol evaluados, por cuanto dicha especie es frecuentemente reportada en este frutal en diferentes regiones (Gobernación del Huila, 2009; Arnal et al., 2005), e incluso esta especie fue reportada por Betancourth et al. (2003) en Nariño, como transmisora de un potyvirus no identificado a nivel de especie en cultivos de tomate de árbol de Nariño. Sin embargo, las dos especies detectadas en este estudio, han sido igualmente reportadas en este cultivo en Colombia y otros países, siendo *A. gossypii* la más frecuentemente reportada (Yepes, 1999; Arnal et al., 2005). Esta especie de áfido es comúnmente conocida como el pulgón del algodón, aunque su rango de hospedantes es muy amplio, siendo considerado como altamente polífago. Así por ejemplo, Sánchez et al. (2001) al evaluar su rango de plantas hospedantes en una zona productora de melón de Costa Rica, encontró la presencia de este áfido en 24 especies de plantas de 16 familias botánicas diferentes. Morfológicamente se caracteriza por ser un áfido pequeño, de menor tamaño que otros áfidos; los adultos alados miden aproximadamente 1,25 mm de largo, tienen cuerpo blando, y son de color amarillo a verde oscuro con cabeza y tórax negros. Las alas yacen como una especie de techo sobre el abdomen cuando el individuo se encuentra en reposo. Los adultos no alados tienden a medir entre 1 y 1,5 mm de largo, de color uniforme, y de amarillos a verde oscuro a negro. Por su parte *M. euphorbiae* es conocido como el pulgón verde de la papa, aunque es igualmente polífago. Se caracteriza en su estado adulto áptero por medir de 1,7 a 3,6 mm, con forma de huso alargado,

Departamento	Municipio	Especie de áfido	CMV	PLRV	Poty
Antioquia	Santa Rosa de Osos	<i>A. gossypii</i>	-	+	+
	Carmen del Viboral	<i>A. gossypii</i>	-	+	-
Nariño	Córdoba Lote 1	<i>M. euphorbiae</i>	+	-	-
		<i>A. gossypii</i>	+	+	+
	Córdoba Lote 2	<i>M. euphorbiae</i>	+	-	-
		<i>A. gossypii</i>	-	+	+

Tabla 1. Resultados de las pruebas de ELISA a partir de muestras de áfidos obtenidas en cultivos de tomate de árbol de Antioquia y Nariño.

de color verde claro, algunas veces amarillo, con ligeras manchas, mientras que los adultos alados miden 1,7 a 3,4 mm, son de color verde claro a rojizo, con tubérculos antenales divergentes, antenas ligeramente obscurecidas, tórax con un lóbulo verdoso o amarillo acaramelado (Bayer, 2008). Estos resultados representan una primera aproximación a un inventario entomológico de este grupo en dicho frutal, por lo que es fundamental el desarrollo de nuevos muestreos e identificación de otras especies de áfidos, para lo cual la metodología de identificación molecular realizada en este trabajo resulta altamente recomendable.

Detección serológica de virus en áfidos colectados en cultivos de tomate de árbol

La detección de fitopatógenos a partir de material vegetal, vectores biológicos y reservorios naturales como el suelo y las fuentes de agua, es de vital importancia para garantizar

las condiciones fitosanitarias de los sistemas agrícolas (Hull, 2004). En los últimos años, las técnicas de diagnóstico han evolucionado de manera tal que se han alcanzado niveles de detección rápidos y confiables permitiendo incluso la detección asintomática de virus en material de siembra sexual o asexual y en insectos vectores; puntos críticos para cualquier programa de manejo integrado de enfermedades (Salazar, 1995).

En este sentido, las cuatro muestras de *A. gossypii* y dos de *M. euphorbiae* se sometieron a pruebas de ELISA para los virus CMV, PLRV y Potyvirus. Las cuatro muestras obtenidas de *A. gossypii* en Antioquia y Nariño arrojaron resultados positivos para el virus PLRV, mientras que tres de dichas muestras también presentaron Potyvirus. Por otra parte, el virus CMV se detectó en ambas especies de áfidos en tres de las muestras procedentes de Córdoba (Nariño), pero no en Antioquia (Tabla 1).

El hallazgo de estos virus en áfidos presentes en cultivos de tomate de árbol de los departamentos de Antioquia y Nariño, coinciden con los recientes reportes de Ayala (2009) y Jaramillo (2009), quienes realizaron estudios detallados de las especies y niveles de incidencia de Potyvirus y virus isométricos asociados a la virosis del tomate de árbol en dichos departamentos, confirmando que CMV, PLRV y los potyvirus: PVY y TaLMV, se detectan con frecuencia en el tejido foliar sintomático de este cultivo. Adicionalmente, Álvarez (2010) registró a partir de evaluaciones con las técnicas de RT-PCR y hibridación dot-blot, que los virus PVY y PLRV se encontraban en semilla sexual de tomate de árbol, lo cual posiblemente sería un indicativo de la posible transmisibilidad de dichos virus por este medio.

Identificación molecular de virus en áfidos

Las pruebas de RT-PCR con cebadores para los virus CMV, PLRV y PVY, permitieron la identificación de estos dos últimos virus a partir de ARN obtenido de áfidos de la especie *A. gossypii*. Sin embargo, el virus CMV no pudo ser detectado en ninguno de los áfidos evaluados, a pesar del cambio de diversas condiciones de las reacciones de RT-PCR (concentraciones de Mg, temperaturas de anillamiento, diluciones del cDNA, entre otras). El hecho que este virus se detectó mediante ELISA pero no por RT-PCR puede ser un indicativo de que los cebadores utilizados no son lo suficientemente específicos para las variantes de este virus presente en los cultivos de tomate de árbol del país, pues a pesar de que fueron diseñados a partir de regiones conservadas en el genoma, cualquier mutación presente

Homología en GenBank	Número accesoión	Tamaño del fragmento (pb)	Identidad	Valor e
Potato leafroll virus isolate Shiraz coat protein gene	FJ481107	291	99%	2e-143
Potato leafroll virus isolate Shiraz coat protein gene	AF539791	291	99%	2e-143
coat protein [potato leaf roll virus PLRV, Cuban isolate	S77421	291	99%	2e-143
Potato leaf roll virus (Canadian isolate) genomic RNA	D13954	291	99%	2e-143
Potato leafroll virus genes for 23K ORF (putative coat protein gene)	D13753	291	99%	2e-143

Tabla 2. Homología encontrada entre la secuencia del virus PLRV obtenida del áfido *A. gossypii* y secuencias reportadas en NCBI.

en la posición del genoma a la cual se une el extremo 3' de los cebadores, puede conducir a la no amplificación del fragmento esperado, máxime cuando diferentes autores reportan que esta especie viral consiste de un amplio rango de variantes que exhiben diferencias en sus hospedantes y niveles de patogenicidad (Rizos *et al.*, 1992; García-Arenal *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005) y que los diferentes mecanismos de rearrreglo de genes han jugado un importante papel en la historia evolutiva de la especie viral CMV (Balaji *et al.*, 2008). En cualquier caso, trabajos futuros deben buscar obtener secuencias del genoma del

cultivos de papa, no puede transmitirse mecánicamente, ni por semilla sexual o polen, sino solamente mediante tubérculos, injerto o por medio de vectores (áfidos), que al alimentarse por medio de sus estiletes mandibulares y maxilares, penetran hasta los vasos cribosos del floema, donde se adhieren para nutrirse del flujo de la savia de la planta; de esta forma adquieren con la savia enferma partículas de PLRV que pasan a través de las paredes del canal alimenticio hacia las glándulas salivales nuevamente (Singh *et al.*, 1995; Khan y Dijkstra, 2006). El período de latencia es de 8 a 72 horas, los períodos

Las pruebas de RT-PCR con cebadores para los virus CMV, PLRV y PVY, permitieron la identificación de estos dos últimos virus a partir de ARN obtenido de áfidos de la especie *A. gossypii*. Sin embargo, el virus CMV no pudo ser detectado en ninguno de los áfidos evaluados, a pesar del cambio de diversas condiciones de las reacciones de RT-PCR.

virus CMV a partir de plantas afectadas de tomate de árbol, para proceder al diseño de nuevos cebadores que permitan determinar las características genotípicas de este virus en áfidos asociados a este cultivo en Colombia. Con respecto al virus PLRV, se obtuvieron a partir de muestras de *A. gossypii* de Nariño los amplicones del tamaño esperado (336 pb), que una vez secuenciado compartieron un 99% de identidad con diferentes cepas de este virus, previamente depositadas en el GenBank a partir de plantas de papa de diferentes países (Tabla 2). El PLRV en

de adquisición y transmisión requieren de un tiempo mínimo de alimentación de 10-15 minutos pero se necesita de 12 horas para que la eficiencia en la trasmisión se desarrolle al máximo. Estos vectores una vez infectados, portan el virus durante toda su vida, por lo que ha este tipo de transmisión se le denomina persistente. El vector más eficiente del PLRV es *M. persicae*, aunque *M. euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *A. gossypii*, *A. nasturtii*, *M. ascalonicus* y *Neomyzus circumflexus* también han sido reportados como vectores de dicho virus (Cordero, 2008).

Homología en GenBank	Número accesión	Tamaño del fragmento (pb)	Identidad	Valor e
Potato virus Y isolate NN333B_87_152 coat protein gene. Isolate=recombinant PVYN/PVYO	GQ853630	480	96%	0.0
Potato virus Y genes for polyprotein, Coat protein. Isolate=NTNH091	AB331548	480	96%	0.0
Potato virus Y genes polyprotein, Isolate: NTNHO90	AB331517	480	96%	0.0
Potato virus Y isolate 8084 coat protein gene. Isolate=NTN	EF027897	480	96%	0.0
Potato virus Y coat protein gene. Isolate=Latvia	GQ496607	470	96%	0.0

Tabla 3. Homología encontrada entre la secuencia del virus PVY obtenida del áfido *A. gossypii* y secuencias reportadas en NCBI.

Por otra parte, el virus PVY fue detectado a partir de ARN de áfidos de *A. gossypii* de Antioquia y Nariño, obteniéndose con los cebadores PVYF-R amplicones de 480 pb, que una vez secuenciados presentaron niveles de identidad superiores al 96% con las variantes PVY^{NTN} obtenidas de papa de diferentes regiones del mundo (Tabla 3). El virus PVY es transmitido de forma mecánica o por injerto, además por áfidos de manera no persistente, siendo algunas de las especies más eficientes para su transmisión *M. persicae*, *A. fabae*, *A. gossypii*, *M. euphorbiae* y *Rhopalosiphum insertum* (Büchen-Osmond, 2006).

La detección de virus mediante RT-PCR a partir de ARN viral ha sido utilizada para los dos virus secuenciados en este trabajo. Para el caso de PLRV Singh et al. (1995) utilizaron esta metodología para evaluar la presencia de este virus en áfidos de *M. persicae* utilizados en pruebas de inoculación dirigidas, encontrando que luego de 5 min de exposición, se detectaron los amplicones de 336 pb en el 13% de las muestras. Este porcentaje aumentó luego de períodos de exposición de 3-4 días, confirmando los

altos niveles de sensibilidad de la técnica al detectar niveles tan bajos como 100 fg de ARN de PLRV en la muestra. Similarmente, Singh et al. (1997) detectaron la presencia de PLRV en áfidos de las especies *M. persicae*, *A. nasturtii* y *M. euphorbiae* capturados en trampas ubicadas en campos de papa de Canadá. Por otra parte, el PVY ha sido detectado con la técnica de RT-PCR directamente de áfidos de las especies *M. persicae* y *A. nasturtii* (Singh et al. 1996) e incluso se han desarrollado metodologías que permiten la detección conjunta del virus PVY a partir de áfidos, tubérculos y hojas, con otros virus que afectan el cultivo de la papa (PVS, PLRV, PVX, PVA y el viroide PSTVd) utilizando una prueba de RT-PCR múltiple con síntesis de cDNA con cebadores hexámeros (Nie y Singh, 2001).

La detección por ELISA de los virus CMV, PLRV y Potyvirus en extractos de áfidos asociados a cultivos de tomate de árbol, indica que un componente fundamental para disminuir los niveles de incidencia y severidad de la virosis de este frutal en Colombia corresponde al manejo integrado de las poblaciones de dichos insectos. Los

altos niveles de identidad que presentaron las secuencias de la cápside viral del PLRV y PVY con cepas de diferentes regiones del mundo obtenidas de cultivos de papa, plantean importantes interrogantes epidemiológicos como la posible alternancia de hospedantes para dichos virus entre tomate de árbol, papa, tomate de mesa y otras solanáceas, aspectos que deben ser abordados en forma integral a partir de estudios detallados de las secuencias de los virus presentes en dichos cultivos y mediante ensayos de inoculación cruzada con transmisión mecánica y de evaluaciones de los áfidos identificados en este estudio y otros reportados en otras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto COLCIENCIAS Código 1118-405-20317 Contrato 408-2007 "Desarrollo de métodos de detección serológica y molecular del complejo de virus asociado al Mosaico del tomate de árbol en Colombia". Se agradece a los productores de tomate de árbol del país que permitieron la colección de las muestras y a los integrantes del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y al Grupo de Sistemática molecular por proveer los cebadores para la identificación de los áfidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, GN. 2005. Plant Pathology. 5 ed. Elsevier Academy Press. New York. EEUU.
2. Ahouee K, Habibi M, Mosahebi GH. 2010. Detection of potato leafroll virus isolated from potato fields in Tehran province in aphids by immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction. African Journal of Biotechnology, 9: 2349-2352.
3. Álvarez J. 2010. Caracterización serológica y molecular de virus asociados al material de siembra de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Bosh) en Colombia. Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
4. Astier S, Albouy J, Maury Y, Robaglia C, Lecoq H. 2007. Principles of plant virology. Genome, pathogenicity, virus ecology. Science Publishers. París. Francia.
5. Ayala, M. 2009. Caracterización del *Potyvi* virus asociado a la virosis del tomate de árbol en Antioquia. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
6. Balaji S, Bhat AI, Eapen SJ. 2008. A phylogenetic reexamination of *Cucumber mosaic virus* isolates based on 1a 2a 3a and 3b proteins. Indian Journal Virology 19: 17-25
7. 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.
8. Cambra M, Gorris MT, Capote N, Asensio M, Martinez MC, Bertolini E, Collado C, Hermoso de Mendoza A, Mataix E. 2004. Epidemiology of *Plum pox virus* in Japanese Plums in Spain. Acta Horticulturae, 657: 195-200.
9. Clark RG, Converse RH, Kojima M. 1980. Enzyme-linked immunosorbant assay to detect potato leafroll virus in potato tubers and viroliferous aphids. Plant Disease, 64: 43-45.

10. Cordero, M. 2008. El virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV). *Temas de Ciencia y Tecnología*, 12: 37-49.
11. Cruz J. 2005. Identificación de virus en *Solanum betaceum*. Trabajo de grado Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.
12. Eagles R. 1994. *Tamarillo mosaic potyvirus*: characterization and resistance. Tesis Doctoral. School of Biological sciences, University of Auckland. Nueva Zelanda.
13. Fabre F, Kervarrec C, Mieuxet L, Riault G, Vialatte A, Jacquot E. 2003. Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 110: 51-60.
14. Footitt RG, Maw EL, von Dohlen CD, Hebert P. 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources* 8: 1189-1201.
15. García-Arenal F, Escriu F, Aranda MA, Alonso-Prados JL, Malpica JM, Fraile A. 2000. Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. *Virus Research* 71: 1-8.
16. Gil JF, Ayala M, Marín M, González, P. 2009. Identificación de potyvirus en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* cav.) en Antioquia mediante detección serológica. *Revista Politécnica*, 5: 112-120.
17. Hull R. 2004. *Mathew's Plant virology*. 4 ed. Elsevier Academic Press. New York. EEUU.
18. Jaramillo M. 2009. Análisis serológico y molecular de virus asociados al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
19. Khan JA, Dijkstra J. 2006. *Handbook of plant virology*. Food Products Press. New York. EEUU.
20. Marín M, López A, Freitas L, Uribe S. 2009. Caracterización molecular de *Euptychiina* (Lepidoptera: Satyrinae) del norte de la Cordillera Central de los Andes. *Revista Colombiana Entomología*, 35: 235-244.
21. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio agrocadenas Colombia. <http://www.agrocadenas.gov.co>, 20. En.07.
22. Matthews RE. 1993. *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press. New Zealand.
23. Nie X, Singh RP. 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.
24. Olmos A, Bertolini E, Gil M, Cambra M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151-155.
25. Ortiz RB, Moya A, Martinez TD. 2004. Molecular systematics of aphids (Homoptera: Aphididae): new insights from the long-wavelength opsin gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 24-37.
26. Reinbold C, Herrbach E, Brault V. 2003. Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of *Cucurbit Aphid-borne Yellows Virus* in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Journal of General Virology* 84: 3473-3484.
27. Rizos H, Gunn L, Pares RD, Gillings MR. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 73: 2099-2103.
28. Salazar, LF. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa CIP, Perú, 226 p.

29. Saldarriaga A, Bernal J. 1994. Virus en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt). XV Congreso Asociación Colombiana de Fitopatología ASCOLFI. Santafé de Bogotá, Colombia.
30. Sánchez MV, Agüero R, Rivera C. 2001. Plantas hospederas de *Aphis gossypii* (Aphididae), vector de virus del melón *Cucumis melo* (Cucurbitaceae) en Costa Rica. *Revista Biología Tropical*, 49: 305-311.
31. Schubert J, Fomitcheva V, Sztangret-Wisniewska J. 2007. Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR primers. *Journal of Virological Methods*, 140: 66-74.
32. Singh RP, Kurz J, Boiteau G, Bernard G. 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.
33. Singh RP, Kurz J, Boiteau G. 1996. Detection of styletborne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 59: 189-196.
34. Singh RP, Kurz J, Boiteau G, Moore LM. 1997. Potato leafroll virus detection by RT-PCR in field-collected aphids. *American Potato Journal*, 74: 305-313.
35. Sokhandan N, Rasaei M, Nourinejad S. Detection, Differentiation and Phylogenetic Analysis of Cucumber Mosaic Virus Isolates from Cucurbits in the Northwest Region of Iran. *Virus Genes*, 32: 277-288.
36. Stahls G, Savolainen E. 2008. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 82-87.
37. Tamayo, PJ. 1990. Mosaico del tomate de árbol. *ASCOLFI Informa*, 16: 54-55.
38. Tamayo PJ. 1996. Enfermedades Virales del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) en Colombia. *ASCOLFI Informa*, 22: 26-29.
39. Vizuete B, Insuasti ML, Ochoa J, Ellis M. 1990. Biological and serological characterization of tree tomato virus diseases in Ecuador. INIAP, Ohio State University. 3 p.
40. Yepes F. 1999. Algunos artrópodos asociados a viveros de frutales. *Lunes Entomológico*. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
41. Yu C, Jianxiang W, Xueping Z. 2005. Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 123: 155-161.

CONSULTA VIRTUAL

42. Arnal, E, Ramos F, Aponte A, Suárez Z, Cermeli M, Rojas T. 2005. Reconocimiento de insectos y enemigos naturales asociados al tomate de árbol en Aragua y Miranda, Venezuela. *Revista Digital CENIAP HOY*, 9. http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n9/arti/arnal_e2/arti/arnal_e2.htm, 3.Ago.10.
43. Bayer CropScience. *Macrosiphum euphorbiae* y *Aphis gossypii*. <http://www.bayercropscience.com.pe/web/index.aspx?articulo=515>. 28.Ag.2010.
44. Büchen-Osmond C. 2006. *ICTVdB Management*. Columbia University, New York, EEUU. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>, 18.Ag.2006.