

Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Venezuela.

I. Estados Aragua y Zulia¹

Detection of viruses from tomato-growing zones in Venezuela.
I. Aragua and Zulia States

A. Nava²
F. Ochoa.³
G. Trujillo.³
F. Geraud.²
L. Hernández.³
R. Lastra.⁴
G. Rivas.⁴

Resumen

En el estado Aragua se colectaron 24 muestras de tomate, 2 de pimentón y 11 de malezas en 6 localidades, en el estado Zulia se tomaron 21 muestras de tomate en 10 localidades, con el propósito de detectar a través de pruebas inmunoenzimáticas la presencia de los virus: X y Y de la papa (PVX, PVY), del mosaico del pepino (CMV), del grabado del tabaco (TEV), del mosaico del tabaco (TMV) y del marchitamiento y manchado del tomate (TSWV); y con hibridación de ácidos nucleicos geminivirus. En Aragua se encontró tomate con infección simple de los virus PVY, CMV, TEV y geminivirus en cinco muestras, pimentón con asociación de PVX, PVY, CMV y TEV, y en malezas se detectaron PVX, PVY y geminivirus en *Amaranthus* sp., PVX y geminivirus en *Echininochloa colonum* L. (Link), y geminivirus en *Ipomoea* sp. y *Portulaca oleracea* L. En el estado Zulia sólo una muestra presentó CMV y cinco muestras geminivirus.

Palabras claves: Detección, virus, tomate.

Abstract

In Aragua state were collected 24 samples of tomato, 2 of pepper and 11 of weed in six different localities. In Zulia state 21 samples of tomato were

Recibido: 01-07-94 • Aceptado: 10-05-95

1. Proyecto financiado por CONDES/CONICIT/FUNDACITE ZULIA.

2. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Apto. 526. Maracaibo, Venezuela.

3. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

4. Laboratorio de Biología Molecular. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. San José. Costa Rica.

collected in 10 different places. The virus detection was made through enzyme-linked immunosorbent assays for potato X and Y virus (PVX, PVY), cucumber mosaic virus (CMV), tobacco etch virus (TEV) and tomato spotted wilt virus (TSWV). The geminivirus was detected with nucleic acid hybridization. In Aragua state was found simple infection in tomato for PVY, CMV, TEV and geminivirus 5 samples, in pepper was detected in associated form PVX, PVY, CMV and TEV, but geminivirus was not detected. PVX, PVY and geminivirus were detected in associated form in *Amaranthus* sp. and PVX and geminivirus in *Echinochloa colonum* L. (Link), and geminivirus in *Ipomoea* sp. and *Portulaca oleracea* L. In Zulia state only one sample had CMV and 5 samples showed geminivirus.

Key words: Detection, viruses, tomato.

Introducción

En el cultivo del tomate en Venezuela las enfermedades virales han causado daños económicos considerables; esta situación se ha agravado, ya que no existe control químico y sólo a través de resistencia genética es posible lograr superar ésta situación. En el país han sido señalados varios virus afectando el cultivo del tomate: el virus del mosaico amarillento del tomate (VMAT) (10), el virus del grabado del tabaco (TEV) (9), asociación del VMAT y el virus del mosaico del tabaco (TMV) en mayor proporción, y en menor proporción solos o combinados el virus del mosaico del pepino (CMV), el TEV y el TMV (12). En el año 1978 se señaló el rango de hospederos, transmisión y estudio de propiedades físicas del

VMAT (11) y hasta el presente no ha habido ningún otro trabajo publicado que señale la presencia de nuevos virus, ni su dispersión en el país. Hoy en día la detección de virus se está realizando a través de técnicas rápidas como ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), hibridación con sondas de ADN viral (3, 7) tanto en muestras de plantas como del vector (8), y muy recientemente el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (13, 14).

En este trabajo se planteó como objetivo detectar los virus asociados al cultivo del tomate en Venezuela, iniciándose el muestreo en las zonas tomateras de los estados Aragua y Zulia.

Materiales y métodos

Muestreo: Las zonas de producción de tomate de los estados Aragua y Zulia fueron muestreadas en los meses de octubre a diciembre y de febrero a abril de 1992, respectivamente. Se colectaron 22 muestras de

tomate (TA), 12 de malezas (MA) y 2 de pimentón (PA) en 6 localidades del estado Aragua y 21 muestras de tomate (TZ) en localidades del estado Zulia. El muestreo se realizó tomando la precaución de usar las bolsas

plásticas de colección como guantes, para no contaminar las muestras, las cuales estuvieron constituidas por hojas jóvenes de plantas con síntomas aparentes de virosis y en algunos casos de plantas aparentemente sanas.

Una vez colectadas las muestras, se procedió a su traslado al laboratorio en una cava con hielo. Se secaron a temperatura ambiente entre dos hojas de papel absorbente; posteriormente se cortaron finamente y se dividieron en cuatro submuestras: banco de virus, prueba de ELISA, prueba de hibridación y reserva. Las muestras se conservaron envueltas en toallas faciales, las cuales se colocaron en tubos de plástico con tapas, que contenían un tercio de su volumen con sílica gel, a una temperatura de -4°C .

Detección de virus. ELISA: se utilizaron 6 estuches (Kits) de Agdia ELISA Assays, por escasez de material para detectar el PVX y PVY sólo se procesaron las siguientes muestras: tomate del estado Zulia y, tomate, pimentón y 2 malezas del estado Aragua. Para los virus CMV, TEV y TSWV se lograron procesar todas las muestras colectadas (cuadro 1).

El buffer de extracción se preparó con 2 ml de Tween 20 (σ), 4 g de clara de huevo, 2 g de polivinil pirrolidol PM 10.000 (σ), y se llevó a 100 ml con buffer fosfato salino-Tween 20 (PBS-Tween).

La muestra se preparó maceando el tejido seco y picado en buffer de extracción, en proporción 1:15 (p/v, respectivamente), en bolsas de

plástico con ayuda de un mazo de mortero. La enzima conjugada fue diluida con buffer de extracción en proporción 1:4 y se preparó justo antes de su uso. La solución buffer o-fenilenediamina (OPD), contiene 40 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, 5.1g de ácido cítrico, 7.33 g de fosfato de sodio dibásico y un pH de 5.0.

Procedimiento: Una vez establecidas las posiciones en las placas de las muestras y controles positivos y negativos absolutos o buffer de extracción, se colocaron 100 μl de muestra preparada en cada celda, ya que las placas contienen el anticuerpo; sólo para las placas de PVX y PVY no se usaron duplicados de muestras. Las placas fueron incubadas a 25°C por 2 h. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween, y se agregó en cada celda 100 μl de enzima conjugada, se incubó por 2h a 25°C , se lavó 3 veces con PBS-Tween, y se agregó en cada celda 100 μL de solución OPD recién preparada; luego se incubó por 30 min a 25°C . La reacción se detuvo cuando el color fue intenso en los controles positivos y sin color en los negativos absolutos, con 50 μL de ácido sulfúrico 3M en cada celda. Posteriormente, se tomaron las lecturas de absorbancia con un lector ELISA a 490 nm y se tomó como resultados positivos aquellos que tuvieron valores de absorbancia mayores a dos veces el valor de absorbancia del control negativo absoluto (4).

Hibridación: Esta parte de la investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Biología Molecular del Centro Agronómico Tropical de

Cuadro 1. Repuesta positiva a virus X de la papa (PVX), virus Y de la papa (PVY), virus del mosaico del pepino (CMV) y virus del grabado del tabaco (TEV) a través de ELISA, en muestras de tomate, pimentón y malezas de los estados Aragua y Zulia

Estado	Municipio	Localidad	Muestra*	Virus detectados			
				PVX	PVY	CMV	TEV
Aragua	Zamora	Valle de Ticutunemo Parcela # 2	Tomate (3)				
			Tomate			Positivo	
			Tomate			Positivo	
			Tomate			Positivo	
		Parcela 57	Tomate (2)				
	Pimentón		Positivo	Positivo	Positivo		
	Pimentón		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
	<i>Jussiaea linifolia</i>						
	<i>Portulaca oleracea</i>						
	<i>Ipomoea sp.</i>						
<i>Amaranthus sp.</i>	Positivo		Positivo				
<i>Echinochloa colunum</i>	Positivo						
<i>Eclipta alba</i>							
<i>Cyperus rotundus</i>							
<i>Melampodium divaricatum</i>							
<i>Cucumis dipsaceus</i>							
<i>Euphorbia sp.</i>							
	Parcela 176	Tomate				Positivo	
Tomate							
Tomate			Positivo				
<i>Commelina diffusa</i>							
	Casa Blanca Parcela # 1	Tomate	Positivo	Positivo			
Tomate					Positivo		
Tomate					Positivo		
Tomate					Positivo		
	Parcela # 2	Tomate (2)					
Camatagua		Mucura	Tomate	Positivo	Positivo		
			Tomate				
			Tomate				Positivo
	Tomate					Positivo	
	Bolívar	San Mateo	Tomate (2)				
Zulia	Páez	El Escondido	Tomate (8)				
			Tomate			Positivo	
		Puerto Rosa	Tomate				
		El Molinete	Tomate (6)				
		La Tigra	Tomate (4)				
		El Espanto	Tomate				

* El número entre paréntesis indica el número de muestras colectadas.

Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica, para detectar geminivirus. Se utilizó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, empleando el sistema Photo Gene TM de BRL, con una sonda genérica biotinilada del virus chino del tomate según el procedimiento de Bio Nick Labeling System TM de GIBCO BRL (1), para pruebas con ácidos nucleicos, proporcionada por la Dra. Judith K. Brown (Universidad de Arizona, EE.UU.). Esta técnica se resume en cuatro fases: marcado de la sonda,

preparación de la muestra, hibridación y detección de la hibridación (ϵ). Si la respuesta es positiva aparece una mancha grabada en la película, cuya intensidad será proporcional a la concentración de ácido nucleico presente en la membrana.

Esta técnica se probó en cinco muestras de tomate, cuatro malezas y dos de pimentón provenientes de Aragua y en cinco muestras de tomate del estado Zulia.

Resultados y discusión

De los virus detectados a través de ELISA sólo se presentan los resultados de detección de cuatro de los seis virus probados, debido a que para el TMV las lecturas de absorbancia fueron muy semejantes para los controles negativo absoluto y positivo (0.047 y 0.052 respectivamente); en el caso del TSWV el valor de la lectura del control negativo fue mayor que el control positivo (0.25 y 0.043, respectivamente). Por esta razón no se discuten los resultados para estos dos virus, ya que no se pudo comparar con los controles a pesar de haberse observado una respuesta colorimétrica.

Para el PVX hubo respuesta positiva en seis muestras del estado Aragua: dos de TA, dos de PA y dos de MA [*Amaranthus* sp. y *Echinochloa colonum* L. (Link)]. En todas las muestras del estado Zulia la respuesta fue negativa.

En la prueba de detección del PVY dos muestras de pimentón, cua-

tro de tomate y una de la maleza pira (*Amaranthus* sp.), provenientes del estado Aragua, fueron positivas; las muestras del estado Zulia no presentaron respuesta positiva.

Tres muestras de tomate y una de pimentón colectadas en Aragua fueron positivas para CMV, al igual que una sola muestra de El Escondido, Municipio Páez, estado Zulia.

Para el TEV se observó una respuesta positiva en una de las muestras de pimentón y en tres de tomate del estado Aragua y no se detectó el virus en las muestras del estado Zulia.

En la figura 1 se aprecia la presencia de geminivirus en las muestras de tomate de Aragua y Zulia, así como en las malezas *Portulaca oleracea* L. y *Amaranthus* sp., y también para *Ipomoea* sp. y *Echinochloa colonum* L. (Link), donde la respuesta fue positiva pero leve, todas las malezas provienen del estado Aragua, pudiéndose asociar esta detec-

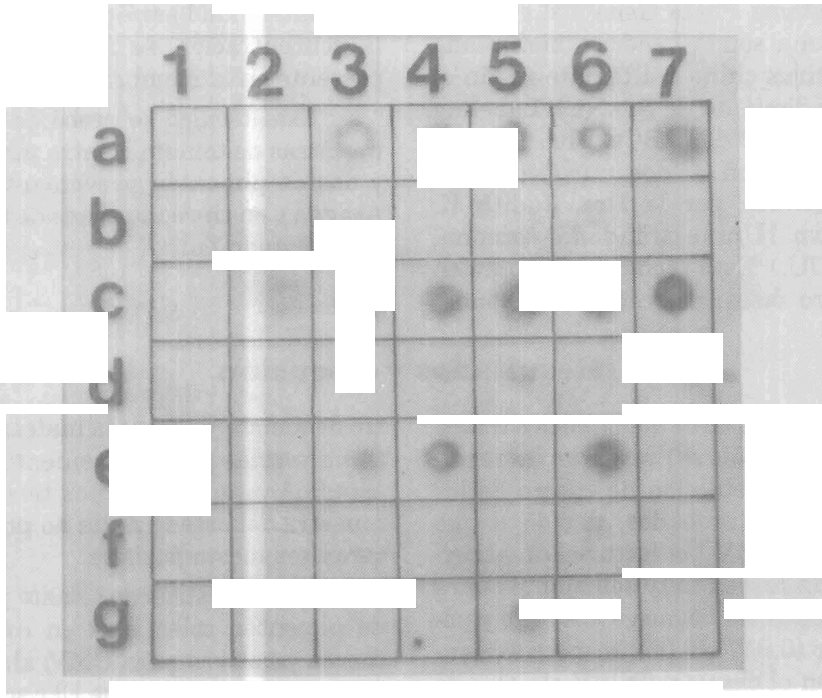


Fig. 1. Detección de gemini virus en tomate, pimentón y malezas de los estados Aragua y Zulia, mediante hibridación no radioactiva de ácidos nucleicos*
a3-a7 Tomate del estado Zulia
c3-c7 Tomate del estado Aragua
e4 *Portulaca oleracea* L. del estado Aragua
e5 *Ipomoea* sp. del estado Aragua
e6 *Amaranthus* sp. del estado Aragua
e7 *Echinochloa colonum* L. (Link) del estado Aragua
g1 Pimentón
g2 Pimentón
g6 Planta sana (Control negativo)
g7 Buffer de extracción (Control negativo absoluto)
b,d y f dilución 1:50
 * La intensidad de la impresión será proporcional a la concentración de ácido nucleico presente en la membrana.

ción con VMAT, dado que se utilizó una sonda genérica para geminivirus. La respuesta fue negativa para pimentón de Aragua.

Analizando el conjunto de pruebas realizadas se puede observar que en una de las muestras de pimentón de Aragua se presentó PVX, PVY, CMV y TEV, en forma asociada, y no se presentó geminivirus. Las malezas colectadas en el estado Aragua presentaron: asociación de PVX, PVY y geminivirus en *Amaranthus* sp. PVX y geminivirus en *Echinochloa colonum* L. (Link), y geminivirus en *Ipomoea* sp. y *Portulaca oleracea* L. En tomate del estado Aragua se detectó PVY, CMV y TEV en forma aislada y geminivirus, concordando con lo señalado por de Uzcátegui y Lastra (11). En el estado Zulia sólo se observó una muestra con CMV y cinco con geminivirus (cuadro 1).

En el estado Zulia sólo una muestra fue positiva para CMV y cinco para geminivirus, esto posiblemente debido al aislamiento geográfico con las zonas productoras endé-

micas para enfermedades virales como Lara, Guárico, Portuguesa, entre otras. Aunque la presencia de CMV y geminivirus pudiera ser preocupante, hay que destacar que sólo fue en una finca de una localidad, en la cual se constató que el material de transplante utilizado provenía de Quíbor, estado Lara, zona realmente endémica.

Dado que el vector de geminivirus es la mosca blanca (*Bemisia tabaci*, Gennadius, Homoptera: Aleyrodidae), y que el sistema de rotación de los productores en el Zulia es tomate, patilla y melón, donde el vector es plaga importante en esos cultivos, se requiere iniciar estudios con muestreos más detallados de la zona, de transmisión de poblaciones de insectos vectores, rango de hospederos (2, 5, 15), de detección con técnicas más precisas como hibridación tanto en planta como en el vector (8), PCR (13, 14), cadena doble y simple de ARN (6, 16) que hacen posible un diagnóstico rápido y un monitoreo de la enfermedad y del vector en el campo.

Literatura citada

1. BRL. Life technologies. INC. 1990. Photogene TM nucleic acid detection system. Instruction Manual. Cat. No. 8192SA.USA. 26 pp.
2. Brown, J. and M. Nelson. 1988. Transmission, host range and virus-vector relationship of chilo del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 78:866-869.
3. Brown, J. 1989. Development of non radioactive sulfonated probes for the identification of whitefly-transmitted geminiviruses. IV International Plant Virus Epidemiological Workshop. Montpellier. France. pp. 276-279.
4. Clausen, J. 1991. Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. Elsevier. Amsterdam, New York, Oxford. 3rd. Edition. 464 p.
5. Cohen, S., J. Kern, I. Harpaz, and R. Ben-Joseph. 1988. Epidemiological studies of the tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Jordan Valley, Israel. *Phytoparasitica* 16:259-270.
6. Cohen, S., J. Duffus, and Y. Liu. 1992. A new *Bemisia tabaci* biotype in the South-

- western United States and its role in silverleaf of squash and transmission of lettuce infectious yellow virus, *Phytopathology* 82: 86-90.
7. Czosnek, H., R. Ber, Y. Antignus, S. Cohen, N. Navot, and D. Zamir. 1988. Isolation of tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus. *Phytopathology* 78:508-511.
 8. Czosnek, H., R. Ber, N. Navot, and D. Zamir. 1988. Detection of tomato yellow leaf curl virus in lisates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. *Plant Disease* 72: 949-951.
 9. Debrot, E. 1976. Estudios sobre el virus del grabado del tabaco en siembras de tomate en Venezuela. *Agronomía Tropical* 26: 322-335.
 10. Debrot, E., F. Herold y F. Dao. 1963. Notas preliminares sobre el mosaico amarillento del tomate en Venezuela. *Agronomía Tropical* 10: 33-41.
 11. Uzcátegui, R. de, and R. Lastra. 1978. Transmission and physical properties of causal agent of mosaico amarillento del tomate (tomato yellow mosaic). *Phytopathology* 68:985-988.
 12. Lastra, R. and R. de Uzcátegui. 1975. Viruses affecting tomatoes in Venezuela. *Phytopathology* 84: 253-258.
 13. Navot, N., M. Zeidan, E. Pichersky, D. Zamir, and H. Czosnek. 1992. Use of polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whitefly. *Phytopathology* 82:1199-1202.
 - 14 Pappu, S., R. Brand, H. Pappu, E. Rybicki, K. Gough, M. Frenkel, and C. Niblett. 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genome: application to dashen mosaic virus. *Virological Methods* 41: 9-20.
 15. Polston, J., E. Hiebert, R. J. McGovern, and P. A. Stansly. 1993. Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomato in Florida. *Plant Disease* 77: 1181-1184.
 16. Ullman, D. E., T. L. German, J. L. Sherwood, M. Westcot, and F. Cantone. 1993. Tospovirus replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encode by the RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology* 83: 456-463.