

Detección por PCR de begomovirus en el cultivo del tomate en las áreas productoras de los Andes venezolanos

Begomovirus detection on tomato crop grown in Venezuelan Andes by PCR

A.E. Faría R. y A. Nava

Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia; A.P. 15205, Maracaibo, Venezuela.

Resumen

Los begomovirus han limitado el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) durante muchos años en Venezuela, agravándose la situación con el incremento de la población del insecto vector (*Bemisia tabaci* Gennadius). El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular en años recientes ha suministrado un valioso enfoque para la detección temprana y precisa de begomovirus en plantas. Para determinar la presencia de begomovirus en muestras de tomate de las áreas de producción en los Andes venezolanos, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se colectaron 94 muestras con síntomas similares a los causados por virus, a las cuales se les efectuó la extracción de ADN genómico con CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio). La detección de begomovirus se realizó utilizando cebadores degenerados para cada componente del genoma viral. En el 38% de las muestras se detectó la presencia de begomovirus, basado en el tamaño del producto esperado de PCR. Los síntomas asociados con la presencia de begomovirus más frecuentemente observados fueron mosaicos, nervaduras amarillas, encrespamiento y enanismo. En los estados Mérida, Táchira y Trujillo los begomovirus siguen siendo un problema importante en el cultivo de tomate; por lo cual se requiere estudiar la variabilidad y distribución de los begomovirus para desarrollar estrategias de manejo en ese cultivo.

Palabras clave: Geminivirus, Reacción en cadena de la polimerasa, *Lycopersicon esculentum*.

Abstract

Begomoviruses in tomato production have been a serious problem for several years in Venezuela, and the situation has been aggravated with the insect vector (*Bemisia tabaci* Gennadius) introduction. Development of molecular diagnostic techniques has been a valuable tool for early and accurate detection of begomoviruses in plants. To determine the begomoviruses presence in tomatoes grown in the Andean production areas in Venezuela, 94 samples with virus-like symptoms were collected, and genomic DNA was extracted by CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) method. Begomovirus detection was performed using degenerated primers for each viral component. Based on expected PCR products, begomovirus was detected in 38% of samples. The most frequent symptoms associated with the begomoviruses presence were mosaic, yellow vein, leaf curlin, and stunting plant. The begomoviruses are still a limitation for tomato crops. Therefore, it is required to study the variability and distribution of these viruses in order to develop strategies for adequate tomato crop management.

Key words: Geminivirus, polymerase chain reaction, *Lycopersicon esculentum*

Introducción

El tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) es un cultivo hortícola importante en Venezuela, con una producción estimada para el año 2005 de 195.000 t, en una superficie de 9.000 ha y un rendimiento de 21,67 t.ha⁻¹ (FAOSTAT, 2006). Este cultivo es afectado por varios patógenos (hongos, bacterias y virus) que disminuyen su producción (Jones *et al.*, 1991). En Venezuela se han señalado varios virus afectando al cultivo, entre ellos distintos begomovirus: *Tomato yellow mosaic virus* (Debrot *et al.*, 1963) (ToYMV AF150742) (Morales *et al.* 2001), *Potato yellow mosaic virus-Venezuela* (PYMV VE D00940, D00941) (Coutts *et al.* 1991), PYMV-VE cepa tomate (PYMV-VE strain tomato AF026553), *Tomato Venezuela virus* (ToVEV AF026464) (Guzmán *et al.*, 1997), *Tomato mosaic leaf curl virus*

Introduction

Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) is an important horticultural crop in Venezuela, with an estimated production of 195.000 t for 2005, in a surface of 9.000 ha and a yield of 21.67 t.ha⁻¹ (FAOSTAT, 2006). This crop is affected by several pathogens (fungi, bacteria and viruses) that diminish its production (Jones *et al.*, 1991). In Venezuela, several viruses that affect this crop have been reported, among them, different begomovirus: *Tomato yellow mosaic virus* (Debrot *et al.*, 1963) (ToYMV AF150742) (Morales *et al.*, 2001), *Potato yellow mosaic virus-Venezuela* (PYMV VE D00940, D00941) (Coutts *et al.*, 1991), PYMV-VE tomato strain (PYMV-VE strain tomato AF026553), *Tomato Venezuela virus* (ToVEV AF026464) (Guzmán *et al.*, 1997), *Tomato mosaic leaf curl virus*

(TMLCuV AY508991 AY508992), *Tomato yellow margin leaf curl virus* (ToYMLCuV AY508993, AY508994) (Nava, 2004) y *Tomato yellow leaf curl virus* cepa Portugal (DQ302033) (Zambrano *et al.*, 2007).

Los begomovirus han surgido como una amenaza importante en la producción de una serie de cultivos a nivel mundial. Algunas de las enfermedades causadas por estos patógenos son devastadoras, constituyendo un serio riesgo para la agricultura sostenible, particularmente en zonas tropicales y subtropicales (Morales y Anderson, 2001; Varma y Malathi, 2003). Los begomovirus son uno de los cuatro géneros que conforman la familia *Geminiviridae*, estos virus de plantas (ca. 18-30 nm) tienen un genoma circular de ADN de cadena simple (ssDNA), están protegidos por la cápsida en partículas gemelas, cuasi-icosahédricas, este genoma puede ser de una o de dos partículas y son transmitidos principalmente por el insecto vector, mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Lazarowitz, 1992; Varma y Malathi, 2003).

Los begomovirus son principalmente de dos partículas, pero los begomovirus del Viejo Mundo son de una sola partícula. Los begomovirus de dos partículas tienen dos componentes, designados como A y B. Cada componente tiene ~2.600 nt. Los genes del componente A están involucrados en la encapsidación y en la replicación, mientras que los genes del componente B están involucrados en el movimiento de los virus a través de la planta, en la determinación del rango de hospederos y en la expresión de síntomas (Gafni y

virus (TMLCuV AY508991 AY508992), *Tomato yellow margin leaf curl virus* (ToYMLCuV AY508993, AY508994) (Nava, 2004) and *Tomato yellow leaf curl virus* Portugal strain (DQ302033) (Zambrano *et al.*, 2007).

The begomovirus have emerge as an important threat to several crop production world wide. Some diseases caused by these pathogens are devastating, becoming a serious risk for the sustainable agriculture, particularly in Tropical and Subtropical regions (Morales and Anderson, 2001; Varma and Malathi, 2003). The begomovirus are one of four genus of the *Geminiviridae* family, this plant viruses (ca. 18-30 nm) have a circular single-stranded DNA (ssDNA), their genome is encapsidated in icosahedral geminate particles, which is mono or bipartite, and they are mainly transmitted by the insect vector, whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Lazarowitz, 1992; Varma and Malathi, 2003).

Begomoviruses are mostly bipartite and there are some monopartite from the Old World. Bipartite begomoviruses have two components A and B. Each component has ~ 2,600 nt. The A component has the genes involved in encapsidation and replication, and the B component has the genes involved in the movement of virus through the plant, host range and symptom expression (Gafni and Epel, 2002; Lazarowitz, 1992). The A component contains five open reading frames (ORF), one of them, *coat protein* (CP), with viral sense or rightward for clockwise direction of transcription. The other

Epel, 2002; Lazarowitz, 1992). Uno de los cinco genes en el componente A es el gen de la proteína de la cápsida viral [*Coat Protein (CP)*]. La transcripción de este gen es en el sentido viral, es decir siguiendo la dirección de las agujas del reloj. Los otros cuatro genes, los cuales codifican la proteína asociada a la replicación [*Replication-associated protein (Rep)*], la proteína activadora de la transcripción [*Transcriptional Activator Protein (TrAP)*], la proteína reforzadora de la replicación [*Replication Enhancer (REn)*] y la proteína *AC4* de función aun desconocida, se transcriben en sentido complementario al virus, es decir en contra de las agujas del reloj (Lazarowitz, 1992).

Estos dos grupos de genes del componente A (*CP* y *Rep*; *TrAP*; *REn*; *AC4*) están solapados y separados por una región intergénica [Intergenic Region (IR)], la cual no codifica ninguna proteína. La IR comienza en el codón de inicio del gen de la *Rep* y termina en el inicio del gen de la *CP*. La secuencia de nucleótidos de esta región varía ampliamente entre los diferentes begomovirus, con la excepción de una región conservada rica en GC, la cual tiene la capacidad de formar una estructura secundaria denominada horquilla (stem-loop) de una longitud de ~30 nt. En esta IR se encuentra también una secuencia invariable de nueve nucleótidos o nanomérica TAATATT(↓)AC, que constituye el asa o lazo (loop) de esa estructura secundaria. Esta secuencia nanomérica es conservada para todos los virus miembros de la familia *Geminiviridae* (Lazarowitz, 1992).

El componente B tiene dos genes. El gen *NSP*, el cual se

four ORFs: *Replication associated protein (Rep)*, *Transcriptional Activator Protein (TrAP)*, *Replication Enhancer (REn)*, and *AC4* (unknown function), have complementary sense or leftward for counterclockwise direction of transcription (Lazarowitz, 1992).

The two groups of genes are overlapped and separated by an Intergenic Region (IR), which begins with the start codon of the *Rep* and end with the start codon of the *CP*. This region does not encode any protein and is very different among begomoviruses, with the exception of conserved sequences such as a GC rich inverted repeat sequence that has the potential to form a stem-loop structure (~30 nt) with the invariant nanomeric TAATATT(↓)AC sequence or loop of the stem-loop structure, the nanomeric sequence is conserved for all geminiviridae family members (Lazarowitz, 1992).

The B component has two genes, a *Nuclear Shuttling Protein (NSP)* that refers to the viral-sense gene whose protein product is implicated in nuclear shuttling of the viral genome, and a *Movement Protein (MP)* that refers to the gene transcribed from the complementary-sense strand and whose product is involved in cell-to-cell movement via plasmodesmata (Gafni and Epel, 2002). The *MP* appears to be a symptom-inducing element or a determinant of pathogenicity of bipartite begomoviruses. Mutation studies suggest that the 3' region of the *MP* gene is associated with symptom development (Gafni and Epel, 2002).

transcribe en el sentido de la banda viral y el gen de la *proteína de movimiento* (MP), el cual se transcribe en el sentido de la banda complementaria. El NSP está involucrado en el traslado del genoma viral del núcleo al citoplasma y viceversa, el MP está involucrado en el movimiento del virus de célula a célula vía plasmodesmo (Gafni y Epel, 2002). El gen MP pareciera ser un elemento de inducción de síntomas o un determinante de la patogenicidad de los begomovirus de dos partículas. Estudios con mutaciones sugieren que la región 3' del gen MP está asociada con el desarrollo de síntomas (Gafni y Epel, 2002).

El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular en años recientes ha suministrado un valioso enfoque para la detección temprana y precisa, así como para la cuantificación de patógenos de plantas (Miller y Martin, 1988). Dos técnicas de diagnóstico molecular, técnicas inmunológicas y ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han aplicado exitosamente para la detección cualitativa o cuantitativa de varios patógenos incluyendo virus, bacterias y hongos (Clark, 1981; Hauser *et al.*, 2000; Henson y French, 1993). En comparación a las técnicas tradicionales de diagnóstico visual y microscópico, estos métodos tienen una alta especificidad y sensibilidad por lo que pueden ser útiles para detectar infecciones presintomáticas e identificación de enfermedades sin el consumo de tiempo y cultivo de los patógenos y plantas indicadoras (Martin *et al.*, 2000). La detección temprana, rápida y precisa de

The development of molecular techniques to the diagnosis in the last years has offer a valuable approach for the early and precise detection, as well as plant pathogen quantification (Miller and Martin, 1988). Two molecular techniques for the diagnosis, immunological techniques and assays based on the polymerase chain reaction (PCR) have been succesfully applied to the qualitative or quantitative detection of several pathogens such as viruses, bacteria and fungus (Clark, 1981; Hauser *et al.*, 2000; Henson and French, 1993). In comparison to the traditional techniques of visual and mycroscopical diagnosis, these methods have a high specificity and sensitivity, therefore, they can be useful to detect pre-symptomatic infections and diseases identification without time consuming, pathogens culture and indicator plants grown (Martin *et al.*, 2000). Early, fast and precise detection of begomovirus that affect tomato crop in Venezuela will contribute to the design of management strategies of this phytosanitary problem; it will permit to give an opportune answer to producers avoiding time consuming of biological tests; it will reduce the disease spread by testing plants in seedbeds and it will help the applying of quarantine measures by vegetal sanitary institutions of Venezuela.

PCR has been succesfully used in tomato for *Crinivirus* detection (Dovas *et al.*, 2002) and some begomovirus, in plants and in vectors, the whitefly (Herrera *et al.*, 1999; Khan, 2000; Martínez-Culebras *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002; Mehta-Prem

begomovirus que afectan al cultivo de tomate en Venezuela contribuirá en el diseño de estrategias de manejo de este problema fitosanitario, permitirá dar respuesta oportuna a los productores evitando el consumo de tiempo que representan las pruebas biológicas, reducirá la dispersión de la enfermedad controlando las plantas en semilleros y facilitará la aplicación de medidas cuarentenarias por parte de las instituciones que resguardan la sanidad vegetal venezolana.

La PCR se ha utilizado exitosamente en tomate, para la detección de *Crinivirus* (Dovas *et al.*, 2002) y de algunos begomovirus, tanto en plantas como en su vector; la mosca blanca (Herrera *et al.*, 1999; Khan, 2000; Martínez-Culebras *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002; Mehta-Prem *et al.*, 1994; Rosell *et al.*, 1999), demostrando ser rápida, sensible y específica.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la presencia de begomovirus en muestras de tomate en las áreas de producción de los Andes venezolanos, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como determinar los síntomas más frecuentes en muestras positivas para begomovirus.

Materiales y métodos

Muestreo: Se colectaron hojas jóvenes de plantas de tomate con edad de 2 semanas hasta la cosecha, presentando síntomas de enfermedades virales, creciendo en siembras comerciales de los estados andinos de Venezuela (figura 1). Se realizó un registro de todas las unidades de producción visitadas que incluyó: ubica-

et al., 1994; Rosell *et al.*, 1999), this technique was fast, sensitive and specific.

The main objective of this research was to determine the begomovirus presence in tomato samples from production areas of Venezuelan Andes, through the polymerase chain reaction (PCR) technique, and to determine the more frequent symptoms in positive samples for begomovirus.

Materials and methods

Survey: Young leaves of tomato plants from two weeks-old to harvest, showing viral disease symptoms, growing in commercial production areas of Venezuelan Andean states were collected (figure 1). A data collection of all the visited production units was accomplished, which included location (geographical and astronomic), sowed area, cultivar, age, sowed plant origin and symptoms. 94 samples were collected, 48 in Táchira state (San Cristobal, Libertad, Independencia, Cardenas and Andres Bello municipalities), 28 in Trujillo state (Trujillo, Pampam and Carache municipalities), 18 in Mérida state (Sucre and Pinto Salinas municipalities), which were placed in hermetic plastics bags and they were stored in a refrigerated portable container to guarantee its conservation during its moving from field to the laboratory.

The collected samples were transported to the Biotechnology Laboratory Profesora Silvia León de Sierralta, Agronomy Collage, Universidad del Zulia, where they were

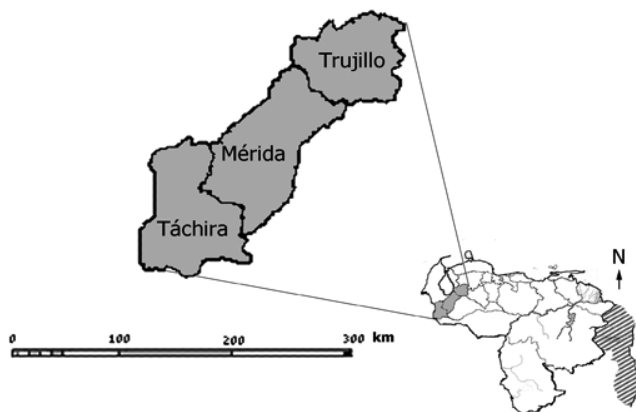


Figura 1. Mapa de la República Bolivariana de Venezuela donde se detalla la región andina, mostrándose en color gris los estados donde se realizó el muestreo, Táchira, Mérida y Trujillo.

Figure 1. Map of the Bolivarian Republic of Venezuela highlighting (in gray) the Andean states of Táchira, Mérida and Trujillo where survey was carried out.

ción (geográfica y astronómica), área sembrada, cultivar, edad, origen de las plantas sembradas y sintomatología. Se colectaron 94 muestras, 48 en el estado Táchira (municipios San Cristobal, Libertad, Independencia, Cardenas y Andres Bello), 28 en Trujillo (municipios Trujillo, Pampam y Carache) 18 en Mérida (municipios Sucre y Pinto Salinas), las cuales se colocaron en bolsas plásticas herméticas y se almacenaron en cava portátil refrigerada para garantizar su conservación durante su traslado desde el campo hasta el laboratorio.

Las muestras colectadas se trasladaron al laboratorio de biotecnología Profesora Silvia León de Sierralta de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, donde se procesa-

processed (dried at environmental temperature, preserved to -20°C in silicagel vials) for its later analysis.

DNA extraction: It was carried out following the Doyle and Doyle method (1987).

PCR:

Two sets of primers were used for each component of the viral genome. Primers PAR1c496 and PAL1v1978 (Rojas *et al.*, 1993) amplify ~ 1500 bp of the A component, which includes ~ 677 bp of the *Rep*, the region between the beginning of the *Rep* and the beginning of the *CP*, and ~ 126 bp of the *CP*. Primers PCRv181 and PAR1c496 (Rojas *et al.*, 1993) amplify ~ 300 bp of the A component that contains ~ 172 bp of region between the beginning of the loop and the beginning of the *CP* and ~ 126 bp of the *CP*. Primers PVL1v2040

ron (secado a temperatura ambiente, conservado a -20°C en viales con silica gel) para su posterior análisis.

Extracción de ADN: Se realizó siguiendo el método de Doyle y Doyle (1987).

PCR: Se usó un par de cebadores degenerados por cada componente del genoma viral. Los cebadores PAR1c496 (5' A A T A C T G C A C G G C T T Y C T R T A C A T R G G 3') y PAL1v1978 (5' G C A T C T G C A G G C C C A C A T Y G T C T T Y C C N G T 3') (Rojas *et al.*, 1993) amplifican un fragmento de ~1100 pb del componente A. Este fragmento incluye ~690 pb del gen *Rep*, ~300 pb de la IR y ~120 pb del gen de la CP. Los cebadores PVL1v2040 (5' G C C T C T G C A G C A R T G R T C R A T C T T C A T A C A 3') y PCRC154 (5' G G T A A T A T T A T A H C G G A T G G 3') (Rojas *et al.*, 1993) amplifican ~600 pb del componente B, este fragmento contiene parte del gen *MP* (~160 pb), la región denominada hipervariable y parte de la región común (Common Region). Las condiciones de la PCR para el par de cebadores PAR1c496 y PAL1v1978 y el par PVL1v2040 y PCRC154 se realizaron siguiendo los protocolos previamente descritos (Rojas *et al.*, 1993).

Las PCRs se realizaron en un termociclador (Mastercycler ep gradient S, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Todas las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 25 µL conteniendo: 5 µl de green GoTaq® flexi buffer 5X; 2,5 µl de MgCl₂ 25 mM; 0,4 µl de dinucleótidos libres 25 mM; 0,5 µl de cada cebador 50 pM/µl; 0,125 µl GoTaq® ADN Polimerasa 5 u/µl y 1,5 µl de ADN genómico. Se usaron como controles la extracción de ADN

(forward 5' C A R T G R T C R A T C T T C A T A C A 3') and PCRC154 (Rojas *et al.*, 1993) amplify ~ 700 bp of the B component, which consists of part of the *MP* (~160 bp), the entire hypervariable region and part of the Common Region (CR). PCR reactions for primer pairs PAR1c496 and PAL1v1978, and PVL1v2040 and PCRC154 were carried out as previously described (Rojas *et al.* 1993).

PCR reactions were carried out in thermocycler (Mastercycler ep gradient S, Eppendorf, Hamburg, Germany). All amplifications were performed in volumes of 25 µL containing 5 µL of green GoTaq flexi buffer 5X; 2.5 µL of 25mM MgCl₂, 0.4µL of 25 mM of dNTP's, 0.4 µM of 25 pM/ µL of each primer, 1.5 µL of genomic DNA, and 0.625 U of GoTaq® DNA polymerase. The Tomato mosaic leaf curl virus was previously detected in a sample designed as 2.7-V (Nava *et al.*, 2006), its DNA extraction was used as positive control, DNA extraction of healthy tomato plant sown in laboratory conditions and pure water were used as negative and absolute negative controls.

PCR products were electrophoresed (25 min at 50 volts) in 1% agarose gels in Tris-acetate-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) buffer, pH 8. Gels were stained with ethidium bromide and viewed by a UV transilluminator.

Results and discussion

Symptoms

Similar symptoms to those caused by virus plants were found in all the production units sampled in

de la muestra denominada 2.7-V donde previamente se detectó la presencia de *Tomato mosaic leaf curl virus* (TMLCuV) (Nava *et al.*, 2006), tomate sano sembrado bajo condiciones de laboratorio y agua pura como control negativo absoluto.

Los productos de las PCRs se observaron después de una electroforesis (25 min a 50 voltios) en geles de agarosa al 1% preparados con buffer Tris-acetato-EDTA (ácido etilendiaminotetracético), pH 8. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

Resultados y discusión

Síntomas

Síntomas similares a los ocasionados por virus en plantas se encontraron en todas las unidades de producción muestreadas en los tres estados andinos, observándose alteración del color, forma y tamaño de las hojas. Los síntomas más frecuentemente observados en hojas (más del 26%) fueron encrespamiento, acopamiento, mosaicos, (figura 2) y otros menos frecuentes fueron color violáceo, alargamiento, aclaramiento o amarillamiento de venas (cuadro 1). Además, se observaron algunas plantas con enanismo o achaparramiento.

Casi la mitad de las muestras presentaron encrespamiento de hojas (cuadro 1); un 44,4% mostraron acopamiento de las hojas, también se observaron dos tipos de mosaico, uno donde sólo se aprecian en las hojas, diferencias de tonalidades de verde o mosaico leve (35,56%) y otro denominado mosaico amarillo, donde se ex-

the three Andean states, alteration of color, shape and size of leaves were observed. The symptoms more frequently observed in leaves (more than 26%) were curl leaf, cupping leaf, mosaics, (figure 2); other less frequent were purplish color, enlargement, and yellow veins (table 1). In addition, several plants were observed with dwarfism or stunting.

Almost the half of samples showed curl leaves (table 1); 44.4% of the samples showed cupping leaves. In addition, two types of mosaic were observed, one in where only differences of green lightness or mild mosaic is appreciated in leaves (35.56%), and the other called yellow mosaic, in where yellow areas contrasting with green regions were observed (similar to tomato yellow mosaic) (figure 2), which was less frequent than the previous one. These symptoms have been observed in tomato crop affected by begomovirus (Chowda Reddy *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2008; Giordano *et al.*, 2005; Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Urbino *et al.*, 2004).

DNA extraction

The CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) extraction method used (Doyle and Doyle, 1987) permitted the DNA extraction from samples, it was easy to carry out. However, brown precipitates and in occasionally almost black precipitates were observed, it could indicate the secondary metabolites the presence phenolic like compounds, which interfere in further use of DNA (Molinari and Crochemore, 2001; Pandey *et al.*, 1996; Rath *et al.*, 1998), suggesting the necessity of improving the DNA extraction methods.

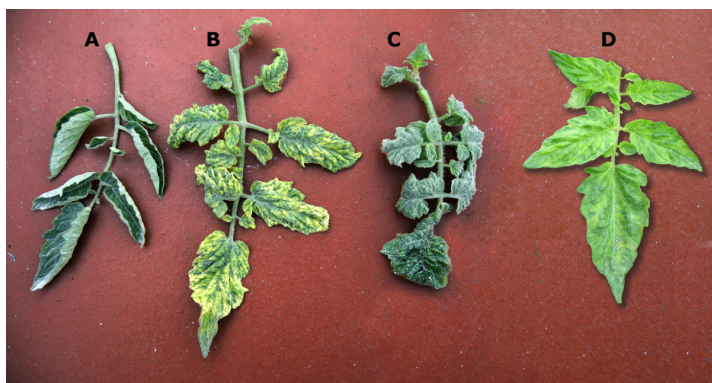


Figura 2. Síntomas más frecuentemente observados en campos de tomate de los tres estados andinos (Táchira, Mérida y Trujillo) de Venezuela. A) Acopamiento, B) Mosaico amarillo C) Encrespamiento y D) Mosaico leve.

Figure 2. Symptoms more frequently observed in tomato fields of the three Andean states (Táchira, Mérida and Trujillo) of Venezuela. A) Upward cupping leaf, B) Yellow mosaic C) Leaf curling and D) Mild mosaic.

hiben zonas amarillas contrastando con zonas verdes (similar al mosaico amarillo del tomate) (figura 2), el cual se presentó con menor frecuencia que el anterior. Estas sintomatologías han sido observadas en begomovirus que afectan al cultivo del tomate (Chowda Reddy *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2008; Giordano *et al.*, 2005; Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Urbino *et al.*, 2004).

Extracción de ADN

El método de CTAB empleado (Doyle y Doyle, 1987) permitió la extracción de ADN de las muestras y resultó fácil de implementar, sin embargo se observaron precipitados de color marrón y en ocasiones casi negro, que pudiera indicar la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, que interfieren en

Begomovirus detection by PCR

The PCR products amplified by PAR1c496 and PAL1v1978 primers for A component; PVL1v2040 and PCRC154 for the B component (Rojas *et al.*, 1993) showed the expected size of ~1100 bp for the A component and of ~600 bp for the B component; the occurrence of at least one of this sizes of PCR products are the sign of begomovirus presence in sample.

Begomovirus presence was detected in the three states sampled (table 2), the higher number of positive samples (28 from 48 collected) was found in Táchira state, that represent a 58.33%, followed by Trujillo state in where 6 positive samples were detected from 28 collected, which constitutes a 21.43%. In Mérida state, begomovirus was

Cuadro 1. Porcentaje de ocurrencia de síntomas encontrados en campos de tomate de los tres estados andinos de Venezuela, y de muestras que resultaron positivas para la detección de begomovirus por PCR, en base a 90 muestras con síntomas.

Table 1. Percentage of symptom occurrence found in tomato fields of three Andean states of Venezuela, and percentage of samples that were positive for begomovirus detection by PCR, base on 90 samples with symptoms.

Muestras	Encr ^{*1}	Acop ^{*2}	Mos L ^{*3}	MA ^{*4}	Viol ^{*5}	Enan ^{*6}	Al ^{*7}	Marg A ^{*8}	Nerv A ^{*9}	Fl.A ^{*10}
Total	43	40	32	24	14	10	7	6	4	1
%	47,78	44,44	35,56	26,67	15,56	11,11	07,78	06,67	04,44	01,11
PCR +	20	11	13	13	4	4	0	2	2	0
%	46,51	27,50	40,63	54,17	28,57	40,00	0,00	33,33	50,00	0,00

^{*1} Encr: Encrespamiento; ^{*2} Acop: Acopamiento; ^{*3} Mos L: Mosaico leve; ^{*4} MA: Mosaico amarillo; ^{*5} Viol: Color violeta; ^{*6} Enan: Enanismo; ^{*7} Al: Alargamiento; ^{*8} Marg A: Márgenes Amarillos; ^{*9} Nerv A: Nervaduras amarillas; ^{*10} Fl.A: Flores abortivas.

la utilización posterior del ADN (Molinari y Crochemore, 2001; Pandey *et al.*, 1996; Rath *et al.*, 1998), sugiriendo la necesidad de mejorar el proceso de extracción.

Detección de begomovirus mediante PCR

Los productos amplificados por la PCR con los cebadores PAR1c496 y PAL1v1978 para el componente A; PVL1v2040 y PCRC154 para el B (Rojas *et al.*, 1993), mostraron el tamaño esperado de ~1100 pb para el componente A y de ~600 pb para el componente B, la presencia de al menos uno de estos tamaños de los productos de PCR denotan la existencia de begomovirus en la muestra.

En los tres estados muestreados se detectó la presencia de begomovirus (cuadro 2), encontrándose en el estado Táchira el mayor número de muestras positivas (28 de las 48 colectadas), que representa un 58,33%, seguido por el estado Trujillo donde se detectaron 6 muestras positivas de las 28 colectadas, que constituye un 21,43%. En el estado Mérida sólo se detectó begomovirus en una muestra de las 18 colectadas (11,11%). Estos resultados difieren de los señalados anteriormente (Nava *et al.*, 2006) para los estados andinos, donde la presencia de begomovirus en el estado Táchira fue muy baja y más alta en el estado Trujillo, pudiendo sugerir esto un cambio en la distribución de begomovirus en el cultivo de tomate en los Andes venezolanos, en un lapso de 13 años. Además, en el estado Táchira se observó la prevalencia de un único cultivar denominado por los productores "Tetera" de procedencia colombiana, pudiendo

only detected on a sample from 18 collected (11.11%). These results differs from those previously reported (Nava *et al.*, 2006) for the Andean states of Venezuela, in where begomovirus presence was lower in Táchira and higher in Trujillo state, it is possible to suggest a change in begomovirus distribution that affect tomato crop in the Venezuelan Andean states during the last 13 years. In addition, the prevalence of a single cultivar called "Tetera", from Colombia, in all tomato fields surveied from Táchira state could increase the crop vulnerability to begomovirus.

A higher quantity of positive samples was observed in Táchira state in which both virus components were amplified, in contrast with Trujillo state, in where the B component was amplified with higher frequency (table 2). A high begomovirus variability in samples is assumed, based on non hybridization between degenerated primers PAR1c496/PAL1v1978 and the A component (Rojas *et al.*, 1993).

In Trujillo state, the begomovirus presence was only detected in Carache municipality in where it is comun the use of transplanting material coming from Lara state, which has been reported as endemic for begomovirus in tomato (Lastra and Uzcátegui, 1975). In Mérida (Antonio Pinto Salinas and Sucre municipalities) and Táchira (San Cristóbal, Andrés Bello, Cárdenas, Independencia and Libertad municipalities) states was detected begomovirus in all the surveied municipalities (table 3). In these two last states, virus dispersion by its own vector is possible due to proximity of the municipalites.

Cuadro 2. Número de muestras donde se amplificaron los componentes A y B de begomovirus utilizando PCR [cebadores PAR1c496 y PAL1v1978 para el componente A; PVL1v2040 y PCRC154 para el B (Rojas *et al.*, 1993)], en muestras de tomate de zonas de producción representativas de los estados andinos de Venezuela.

Table 2. Number of samples in where the A and B components of begomovirus were amplified using PCR [primers PAR1c496 and PAL1v1978 for the A component; PVL1v2040 and PCRC154 for the B component (Rojas *et al.*, 1993)], in tomato samples from representative production regions of Venezuelan Andean states.

		Muestras			
Estado	Total	Positivas para componente			%
		A	B	AB	
Trujillo	28	—	4	2	21,43
Táchira	48	1	5	22	58,33
Mérida	18	—	1	1	11,11
Total	94	1	10	25	38,30

esta uniformidad incrementar la vulnerabilidad del cultivo a begomovirus.

En el estado Táchira se observó la mayor cantidad de muestras positivas en las cuales se logró amplificar ambos componentes del virus, no así en las muestras del estado Trujillo, donde se amplificó con mayor frecuencia el componente B (cuadro 2), presumiéndose que existe una alta variabilidad de begomovirus en las muestras, que no permiten la hibridación de los cebadores degenerados PAR1c496 y PAL1v1978 con el componente A (Rojas *et al.*, 1993).

En el estado Trujillo sólo se detectó la presencia de begomovirus en el municipio Carache de los tres municipios muestreados. En Carache es frecuente la utilización de material de transplante proveniente del estado

Conclusions

The symptoms such as mosaic, yellow vein, upward cupping leaf, curl leaf and stunting were frequently associated to the begomovirus detection in tomato fields of the three Andean states of Venezuela. This association is little useful in field conditions in where symptoms are highly dependent on host genotype, environmental conditions or occurrence of multiple virus infections.

The DNA extraction method by Doyle and Doyle, 1987, used for disecated frozen tomato leaf samples, preserved in silicagel can produce DNA precipitates with the presence of secondary metabolites.

The begomovirus are still an important problem in tomato crop,

Lara, el cual ha sido señalado como endémico para begomovirus en tomate (Lastra y Uzcátegui, 1975). En los estados Mérida (municipios Antonio Pinto Salinas y Sucre) y Táchira (municipios San Cristóbal, Andrés Bello, Cárdenas, Independencia y Libertad) se detectó begomovirus en todos los municipios muestreados (cuadro 3). En estos dos últimos estados los municipios se encuentran muy próximos por lo que es posible la dispersión del virus por su insecto vector.

Conclusiones

Los síntomas de mosaicos, nervaduras amarillas, acopamiento, encrespamiento y enanismo se presentaron frecuentemente asociados con la detección de begomovirus en los campos de tomate de los tres estados andinos de Venezuela. Esta asociación resulta poco

based on PCR detection in 38.3% of samples collected in the Venezuelan Andean states (Mérida, Táchira and Trujillo).

Recommendations

Other methods of DNA extraction are recommended to be evaluated to obtain high DNA quality in dehydrated tomato samples, silicagel preserved in freezer.

Study of distribution and prevalence of begomovirus in tomato crop in Venezuela through exhaustive survey in the Andean states and the rest of the tomato production areas of Venezuela.

Determine the begomovirus variability in Venezuela using specific primers and sequencing, this is the first step to design strategies for viral disease management.

Cuadro 3. Municipios donde se detectó la presencia de begomovirus en muestras de tomate de zonas representativas de producción de los estados andinos de Venezuela.

Table 3. Municipalities in where the begomovirus presence was detected in tomato samples from representative production regions of the Venezuelan Andean states.

Estado	Municipios		
	Total	Presencia Begomovirus	Nombre
Trujillo	3	1	Carache
Táchira	5	5	San Cristóbal, Andrés Bello, Cárdenas, Independencia, Libertad
Mérida	2	2	Antonio Pinto Salinas, Sucre

práctica en condiciones de campo donde la sintomatología es altamente dependiente del genotipo del hospedante, de las condiciones ambientales o de la ocurrencia de infecciones múltiples.

El método de extracción de ADN de Doyle y Doyle, 1987, utilizado en muestras de tomate deshidratadas, preservadas con silicagel en congelador, puede producir precipitados de ADN con presencia de metabolitos secundarios.

Los begomovirus siguen siendo un problema importante en el cultivo de tomate, detectándose por PCR en el 38,3% de las muestras colectadas en los estados andinos de Venezuela (Mérida, Táchira y Trujillo).

Recomendaciones

Se recomienda evaluar otros métodos de extracción de ADN que permitan obtener ADN de mayor calidad en muestras de tomate deshidratadas, preservadas con silicagel en congelador.

Realizar muestreos más exhaustivos en los estados andinos y en el resto del país, para conocer la distribución y prevalencia de los begomovirus en el cultivo de tomate en Venezuela.

Determinar con precisión la variabilidad de los begomovirus presentes en Venezuela utilizando cebadores específicos y secuenciación para desarrollar estrategias de manejo de esta problemática en campo.

Agradecimiento

Los autores expresan el agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la

Acknowledgement

Authors want to express their thanks to the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) by the financing gave to this project. No. VAC-CC-0002-06.

End of english version

Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento a este proyecto No. VAC-CC-0002-06.

Literatura citada

- Chowda Reddy, R.V., J. Colvin, V. Muniyappa y S. Seal. 2005. Diversity and distribution of begomoviruses infecting tomato in India. *Arch Virol.* 150: 845-867
- Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathology* 19:83-106.
- Coutts, R.H.A., R.S. Coffin, E.J.F. Roberts y W.D.O. Hamilton. 1991. The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of *Potato yellow mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* 72: 1515-1520.
- Debrot, E., F. Herold y F. Dao. 1963. Nota preliminar sobre un "mosaico amarillento" del tomate en Venezuela. *Agron. Trop.* 13: 33-41.
- Dovas, C. I., N. I. Katis, y A.D. Avgelis. 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Dis.* 86:1345-1349.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull.* 19: 11-15.
- FAOSTAT, 2006. Base de Datos (en línea). Disponible en: <http://>

- www.faostat.fao.org. Última modificación revisada: 24 abril de 2006, Leído por última vez 28 mayo de 2006.
- Fernandes, F.R., L.C. de Albuquerque, L. de Britto Giordano, L.S. Boiteux, A.C de Avila y A.K. Inoue-Nagata. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus genes* 36: 251-258.
- Gafni, Y., y B.L. Epel. 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Phyl. Mol. Plant Pathol.* 60: 231-241.
- Giordano, L.B., M.E.N. Fonseca, J.B.C. Silva, A.K. Inoue-Nagata y L.S. Boiteux. 2005. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Hort. Bras.* 23:815-818.
- Guzman, P., C. Arredondo, D. Emmatty, R. Portillo y R. Gilbertson. 1997. Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Dis.* 81: 312.
- Hauser, S., C. Weber, G. Vetter, M. Stevens, M. Beuve, y O. Lemaire. 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 89:11-21.
- Henson, J.M. y R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathology* 31:81-109.
- Herrera, L., O. Guerra, P. Ramos, R. Peral, L. Echemendía, N. Ramírez, V. Doreste y P. Oramas. 1999. Molecular techniques for the detection of tomato yellow leaf curl geminivirus in infected plants and viruliferous whiteflies. *Biotechn. Aplic.* 16:237-241.
- Inoue-Nagata, A.K., J. Nayas-Castillo, P.C.T. Melo y A.C. Ávila. 2004. Busca por Tomato yellow leaf curl virus e Tomato yellow leaf curl Sardinia virus em tomateiros. *Hort. Bras.* 22:799-800.
- Jones, J.B., J.P. Jones, R.E. Stall y T.A. Zitter. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*. APS Press. St. Paul, MN. 73 p.
- Khan, J.A. 2000. Detection of tomato leaf curl geminivirus in its vector *Bemisia tabaci*. *Indian J Exp Biol.* 38:512-5.
- Lastra, J.R. y R.C. de Uzcategui. 1975. Viruses affecting tomatoes in Venezuela. *Phytopathology.* 68:985-988.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: Genome and structure and gene function. *Rev. Plant Sci.* 11:327-349.
- Martin, R. R., D.J. James y C.A. Lévesque. 2000. Impacts of molecular diagnostics technologies on plant disease management. *Ann. Rev. Phytopathology* 38:207-239.
- Martínez-Culebras, P.V., I. Font, y C. Jordá. 2001. A rapid PCR method to discriminate between Tomato yellow leaf curl virus isolates. (Abstract). *Ann. Appl. Biol.* 139:251-257.
- Mehta-Prem, A., J. Wyman, M.K. Nakhka y D.P. Maxwell. 1994 Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. *J. Econ. Entomol.* 87: 1285-1290.
- Miller, S.A. y R.R. Martin. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 26:409-432.
- Morales F.J., y P. Anderson. 2001. The emergence and distribution of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch. Virol.* 146: 415-441.
- Morales, F., R. Lastra, R. Uzcategui y L. Calvert. 2001. Potato yellow mosaic virus: a synonym of *Tomato yellow mosaic virus*. *Arch. Virol.* 146: 2249-2253.

- Molinari, H.B. y M.L. Crochemore. 2001. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. Rev. Bras. Frut. 23: 447-450.
- Morris, J., V. Harju, J. Cambridge, N. Boonham y C. Henry. 2002. Virus transmission studies and diagnostic detection of four begomovirus isolates in selected crop hosts and in *Bemisia tabaci* biotype B*. EPPO Bulletin 32, 41-45.
- Nava, A. R., C.P. Patte, E. Hiebert y J.E. Polston. 2006. Detection and variability of begomoviruses in tomato from the Andean states of Venezuela. Plant Dis. 90:61-66.
- Nava, A., 2004. Detección, caracterización y distribución de begomovirus que infectan el cultivo de tomate en Venezuela. Trabajo de ascenso presentado para optar a la categoría de Profesor Titular. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia (LUZ). 123p.
- Pandey R.N., R.P. Adams y L.E. Flournoy. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. Plant Mol Biol Rep 14: 17–22.
- Rath, P., G. Rajaseger, C.J. Goh y P.P. Kumar. 1998. Phylogenetic Analysis of Dipterocarps Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Annals of Botany 82: 61-65.
- Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russell y D.P. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Dis. 77: 340-347.
- Rosell, R., I. Torres-Jerez y J.K. Brown. 1999. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. Phytopathology 89: 239-246.
- Urbino, C., J.E. Polston, C. P. Patte, y M.L. Caruana. 2004. Characterization and genetic diversity of Potato yellow mosaic virus from the Caribbean. Arch. Virol. 149: 417–424
- Varma, A. y V.G. Malathi. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. Ann. Appl. Biol. 142. 145-64.
- Zambrano K., O. Carballo, F. Geraud D. Chirinos, C. Fernández y E. Marys. 2007. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Venezuela. Plant Dis. 91:768.