

PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS DEL TORRADO DEL TOMATE EN PANAMÁ¹

José Ángel Herrera Vásquez²; Dixania Cortés³

RESUMEN

El primer reporte del virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV) en Panamá se realizó en el 2009, en las provincias de Los Santos, Herrera, Coclé y Veraguas, en plantas de tomate que presentaban una sintomatología no descrita anteriormente en el país. Debido a la enorme importancia de ToTV como agente causal de una enfermedad severa en tomate, lo cual contrastaba con el único estudio realizado para este virus en Panamá, se planteó los siguientes objetivos: Evaluar la presencia de ToTV en muestras de tomate y malezas, y su distribución geográfica en Panamá. En el 2011, se colectó 91 muestras de tomate y 25 de malezas, en diferentes localidades de las provincias de Los Santos, Herrera, Coclé y Veraguas. Las muestras fueron analizadas por RT-PCR, mediante el empleo de una pareja de iniciadores específicos que amplifican un fragmento de 573-pb de la proteína de la cápside Vp23 del ARN 2 de ToTV. La presencia del virus se determinó en 12 muestras de tomate de la provincia de Los Santos. Los resultados fueron confirmados mediante el análisis de secuencias y su comparación con secuencias de ToTV procedentes de otras latitudes geográficas. El virus no fue detectado en las muestras de malezas analizadas. El estudio es el primer paso de una serie, que en principio busca conocer los aspectos epidemiológicos y moleculares de ToTV, y el empleo de la información para establecer estrategias de manejo del virus en Panamá.

PALABRAS CLAVES: *Solanum lycopersicum*, ToTV, RT-PCR, epidemiología, estudio molecular.

¹ Recepción: 10 de diciembre de 2014. Aceptación: 19 de marzo de 2015. Investigación financiada por el proyecto ITE11- 002 y por el Sistema Nacional de Investigación (SNI) (contrato 41-2014) de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) de Panamá.

² Ph.D. en Virología. Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC), IDIAP. e-mail: joshervs11@gmail.com

³ Licda. en Biología. Centro Regional Universitario de Azuero (CRUA), Universidad de Panamá.

PRESENCE AND DISTRIBUTION OF TOMATO TORRADO VIRUS IN PANAMA

ABSTRACT

The first report of *Tomato torrado virus* (ToTV) in Panama was shown in 2009 in the provinces of Los Santos, Herrera, Coclé and Veraguas, in tomato plants that exhibited a previously undescribed symptomatology in this country. Due to the great importance of ToTV as causal agent of a severe disease in tomato, which contrasted with the only study realized for this virus in Panama, the following objectives were included: to assess the presence of ToTV in samples of tomato and weeds, and its geographical distribution in Panama. In 2011, 91 samples of tomato and 25 of weeds were collected from different localities of the provinces of Los Santos, Herrera, Coclé and Veraguas. These samples were analyzed by RT-PCR using a pair of specific primers which amplify a 573-bp fragment of the coat protein VP23 of RNA 2 of ToTV. The presence of this virus was determined in 12 tomato samples from the province of Los Santos. These results were confirmed by sequence analysis and its comparison with ToTV sequences from other geographical latitudes. This virus was not detected in weed samples analyzed in this work. This study is the first step of a series that in principle search to understand the epidemiological and molecular aspects of ToTV and using this information to develop strategies for managing of this virus in Panama.

KEYWORDS: *Solanum lycopersicum*, ToTV, RT-PCR, epidemiology, molecular study.

INTRODUCCIÓN

El virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV) se reportó por primera vez en el 2007 en muestras de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) procedentes de Murcia, España, y fue propuesto como el miembro tipo de un nuevo género denominado *Torradovirus* dentro de la familia Secoviridae (Verbeek *et al.* 2007). Posteriormente, el virus fue citado en Polonia (Pospieszny *et al.* 2007), Australia (Gambley *et al.* 2010), Panamá (Herrera-Vásquez *et al.* 2009a),

Hungría (Alfaro-Fernández *et al.* 2009), Francia (Verdin *et al.* 2009), Italia (Davino *et al.* 2010), y Colombia (Verbeek y Dullemans 2012). ToTV ha causado importantes pérdidas económicas en cultivos de tomate en los países donde se ha reportado su presencia.

En Panamá, ToTV es considerado un virus emergente, siendo detectado por primera vez tras una prospección realizada en febrero de 2008 en cultivos de tomate de las provincias de Los Santos, Herrera,

Coclé y Veraguas (Herrera-Vásquez *et al.* 2009a), para determinar las principales virosis que afectaban al cultivo en el país.

En algunos casos, el virus se encontró en infección mixta con el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV; género *Cucumovirus*), virus ampliamente conocido en la mayoría de las regiones productoras de tomate a nivel mundial, coincidiendo con trabajos realizados por otros autores, lo que indicó que ToTV se encuentra a menudo en infecciones mixtas con otros virus que afectan el tomate (Alfaro-Fernández *et al.* 2010b).

ToTV es considerado uno de los virus más importantes en tomate y se incluyó en el Sistema de Alerta Fitosanitaria de la Organización Norteamericana de Protección a las plantas (NAPPO) (NAPPO 2010). Adicional, el virus tiene la capacidad de infectar tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), pimiento (*Capsicum annum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), y papa (*Solanum tuberosum* L.) (Pospieszny *et al.* 2007, Amari *et al.* 2008), siendo sin duda alguna un peligro potencial para dichos cultivos en Panamá. Adicional, el ToTV se detectó en varias especies de malezas comunes en los cultivos de tomate, las cuales podrían actuar como reservorios del virus (Alfaro-Fernández *et al.* 2008).

ToTV es transmitido de forma semipersistente por las moscas blancas *Bemisia tabaci* Gennadius, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, y *Trialeurodes abutilonea* Haldeman (Hemiptera: Aleyrodidae) (Pospieszny *et al.* 2007, Amari *et al.* 2008, Verbeek *et al.* 2013), encontrando las dos primeras especies reportadas en Panamá. Por lo tanto, una vez la población del insecto vector se incrementa, por ejemplo: debido a la aplicación descontrolada de insecticidas, la probabilidad de infección y diseminación de ToTV aumenta de forma proporcional.

La infección causada por ToTV dentro de los agroecosistemas es dinámica, ya que son interacciones complejas que involucran diversos factores cambiantes, como: los sistemas de producción, el ambiente y los vectores. Por lo tanto, la detección de este virus debe ser un proceso permanente, dado que los nuevos patógenos requieren cambios continuos en las estrategias de manejo.

En Panamá, los estudios realizados sobre ToTV son escasos. Consecuentemente, resulta necesario realizar trabajos dirigidos inicialmente a conocer los aspectos epidemiológicos del virus en el país, con la finalidad de establecer planes de manejo. En este

sentido, el estudio incluye la presencia y distribución de ToTV en las principales regiones del cultivo de tomate industrial en Panamá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización geográfica del estudio:

Este estudio se realizó en diferentes localidades de las provincias de Los Santos, Herrera, Coclé, y Veraguas, donde se seleccionaron un total de 10 parcelas de tomate industrial para la colecta de las muestras, para la detección de ToTV. Estas parcelas fueron georeferenciadas usando un posicionador geográfico global, marca Garmin eTrex Legend®. Las muestras colectadas fueron analizadas en los laboratorios de Agrobiotecnología y Protección Vegetal, del Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC), del Instituto de

Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), ubicados en el corregimiento de Los Canelos, distrito de Santa María, provincia de Herrera, Panamá.

Colecta de muestras de tomate y malezas:

La colecta de las muestras de tomate y malezas se realizó en el periodo de floración-fructificación y en plantas que presentaban preferiblemente síntomas asociados a infecciones virales (Figura 1), criterios utilizados para seleccionar y colectar las muestras para la detección de ToTV. Se colectó 91 muestras de tomate y 25 de malezas, en el periodo comprendido del 12 de enero al 25 de febrero de 2011. Las muestras fueron preservadas en sílica gel a temperatura ambiente hasta su análisis.



Figura 1. Síntomas de necrosis, clorosis y enrollamiento de hojas infectadas por ToTV (A); manchas necróticas en frutos de una planta de tomate infectada por ToTV (B).

Adicional, se colectó plantas completas de malezas, y su identificación se realizó con el apoyo de especialistas del Herbario y del Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN) de la Universidad de Panamá e IDIAP, utilizando especímenes de referencia y claves taxonómicas especializadas.

Extracción de ARN total:

La extracción de ARN total se realizó a partir de aproximadamente 0,1 g de cada muestra de hoja deshidratada de tomate y maleza, con ayuda del protocolo de extracción “silica capture protocol” (Mackenzie *et al.* 1997). Los extractos de ARN fueron almacenados a -30°C hasta su análisis.

Análisis por RT-PCR:

La detección de ToTV se realizó por RT-PCR en un solo paso con la ayuda de la SuperScript® One-Step RT-PCR con Platinum® TaqMix (Invitrogen), siguiendo la metodología descrita por van den Heuvel *et al.* (2006). Se utilizó una pareja de iniciadores específicos de ToTV, TR2F (5'-GAAGGACGAAGAGCGACTG-3') y TR2R(5'-AAGGTAGGTATGCGTTTGC-3'), diseñados para amplificar un fragmento de 573-pb de la proteína de la cápsida Vp23 del ARN 2 de este virus (Pospieszny *et al.* 2007).

Las concentraciones finales de cada reactivo en la reacción fueron las siguientes: 1X tampón de reacción (conteniendo 0,4 mM dNTPs y 2,4 mM MgSO₄), 1X PVP-40, 2 U RNase Out™, 1X mezcla de iniciadores (a una concentración final de 0,5 µM cada iniciador), 0,4 µl de la enzima descrita anteriormente, 0,6 µl de ARN total y agua ultra pura estéril hasta alcanzar un volumen final de 10 µl.

La amplificación por RT-PCR se realizó en un termociclador Mastercycler® gradient 5331 (Eppendorf), programado para llevar a cabo un ciclo inicial de síntesis de cDNA a 50°C durante 30 min y un segundo ciclo de amplificación a 94°C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 55°C durante 30 s, y extensión a 72°C durante 1 min. Adicional, se llevó a cabo un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 min, este último con la finalidad de sintetizar todos los fragmentos que posiblemente quedaron incompletos, seguido de un paso de enfriamiento a 4°C hasta que las muestras fueran recuperadas.

En cada experimento de amplificación se utilizó controles negativos (agua ultra pura estéril y extractos de ARN de plántulas de tomate de los cultivares IDIAP T7, T8, y T9, producidas

en condiciones controladas y de estricto aislamiento), y controles positivos de ToTV (aislados MUR-06 y MUR-09) publicados por Alfaro-Fernández *et al.* (2010a), todos ellos analizados bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Los productos amplificados (5 µl) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en tampón 1X TAE (conteniendo 40 mM Tris-acetato y 1 mM de EDTA, pH 8,0), y se tiñeron con SYBR® Safe 10,000X (Invitrogen). Seguidamente, se dejaron a 100 V durante 45 min, y luego se visualizaron en un transiluminador de luz UV acoplado a un sistema de imagen digital (BioDoc-It® Imaging System, UVP). El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de 100-pb (Amresco).

Secuenciación y análisis:

Para confirmar la identidad de ToTV, los productos amplificados por RT-PCR fueron purificados con ayuda del Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados directamente con los iniciadores específicos del virus indicados anteriormente, con ayuda del BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3,0, en un analizador genético ABI

Prism3130XL (Applied Biosystems), en el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI), en ciudad de Panamá.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas con secuencias de ToTV de otras latitudes geográficas disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (Cuadro 1), con ayuda del Instrumento de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos (BLAST) (Altschul *et al.* 1997), mientras que la homología de las secuencias se obtuvo con ayuda del programa DNAMAN versión 4,02 Lynnon Biosoft®1994-98 (Institute of Plant Pathology, BBA, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis por RT-PCR en muestras de tomate:

La detección de ToTV se realizó por RT-PCR, a partir de las muestras de tomate colectadas en diferentes localidades de las provincias de Los Santos, Herrera, Coclé, y Veraguas en 2011. La presencia de este virus se determinó en 12 (13,2%) de las 91 muestras de tomate analizadas en este trabajo, en muestras procedentes de la provincia de Los Santos. En dicha provincia, este virus fue detectado en las localidades de El Montero y El Hato, en el distrito de Guararé (Cuadro 2). Sin embargo, es importante indicar que ToTV

CUADRO 1. SECUENCIAS DE AISLADOS DE ToTV DE TOMATE OBTENIDAS EN LA BASE DE DATOS DEL GENBANK (NCBI).

Nombre del aislado	Año de colecta	Origen geográfico	GenBank Accession No.
ToTV-PAN1	2008	Coclé, Panamá	FJ357161
2136	2008	Australia	GQ844872
1883	2005	Australia	GQ844870
Ros	2007	Polonia	EU652401
Kra	2007	Polonia	EU652402
Wal'03	2003	Polonia	EU563947
PRI-ToTV0301	2003	España	DQ388880
Sicity09	2010	Italia	GU903899
ToTV-CE	sin información	España	EU476182

CUADRO 2. PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE ToTV POR RT-PCR EN MUESTRAS DE TOMATE COLECTADAS EN EL 2011.

Localización geográfica		GPS	Detección de ToTV por RT-PCR		
Provincia	Localidad	Coordenadas UTM (X/Y); Altitud ^a	Muestras	+	-
Los Santos	El Montero, Guararé	578419/860964; 45	10	9	1
	El Hato, Guararé	569200/861426; 41	5	3	2
	Tres Quebradas, Los Santos	566544/867695; 70	5	0	5
	El Chará, Tonosí	563722/819099; 21	10	0	10
Herrera	Pesé, Las Cabras, La Arenita	548213/870471; 66	10	0	10
	Pesé, El Ciruelo, La Trinidad	533231/873456; 107	6	0	6
	Los Chicharrones, Chitré	560731/881739; 41	11	0	11
	Santa María, Los Canelos, Divisa	534070/898353; 47	10	0	10
Coclé	Antón, El Valle, El Hato	596259/951188; 591	15	0	15
Veraguas	Santiago, La Raya de Santa María, Cañazas Abajo	532752/899767; 38	9	0	9
Total			91	12	79

^a La altitud corresponde a metros sobre el nivel del mar (msnm).

se reportó previamente en diferentes localidades de las provincias de Los Santos, Herrera, Coclé y Veraguas en 2009 (Herrera-Vásquez *et al.* 2009a). El fragmento esperado de 573-pb, correspondiente a la proteína de la

cápside Vp23 del ARN 2 de ToTV, fue amplificado a partir de los extractos de las muestras positivas, con excepción de los extractos sanos y el agua utilizados con controles negativos (Figura 2).

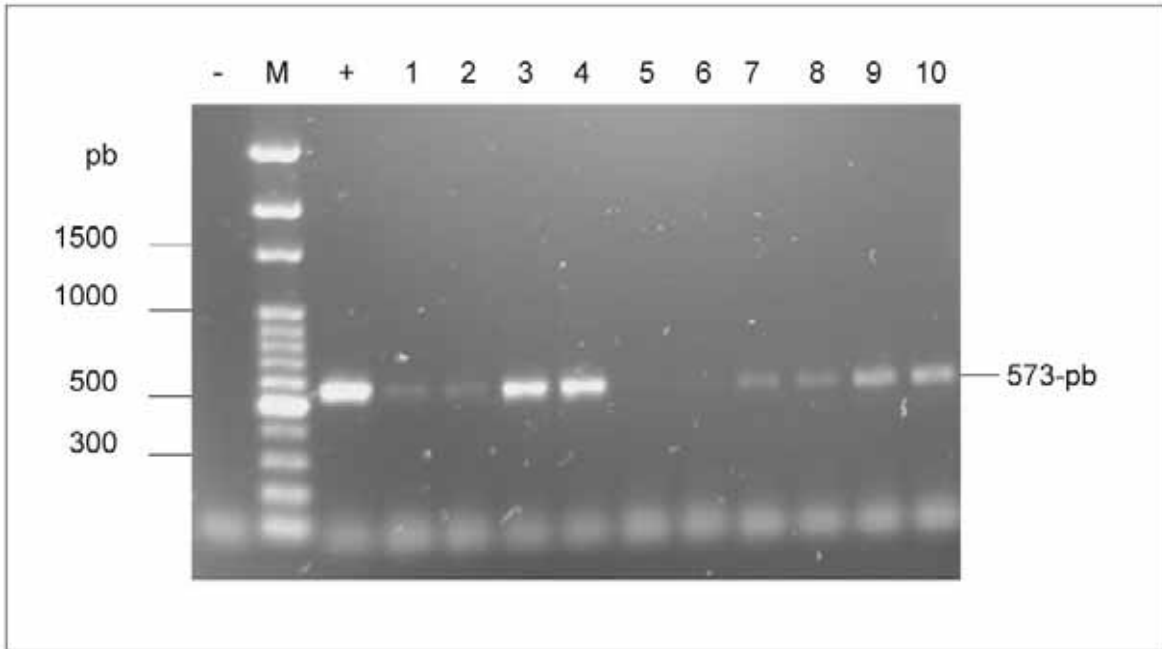


Figura 2. Amplificación por RT-PCR de 573-pb de la proteína de la cápside Vp23 del ARN 2 de ToTV, a partir de muestras de tomate con síntomas asociados a ToTV. Líneas 1-10, muestras +; -, agua ultrapura estéril; +, ToTV (aislado Mur-06); M, marcador de peso molecular de 100-pb (Amresco).

Es importante mencionar que 79 muestras (86,8%) del total de muestras de tomate analizadas, resultaron negativas a ToTV. Esto puede ser debido a la presencia de otros virus que infectan tomate en Panamá, como lo son el virus Y de la papa (*Potato virus Y*, PVY; género *Potyvirus*) (Herrera-Vásquez *et al.* 2009b), CMV (Herrera-Vásquez *et al.* 2009a), el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco*

mosaic virus, TMV) y el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), estos dos últimos, incluidos dentro del género *Tobamovirus* (Herrera-Vásquez 2013). PVY y CMV son transmitidos por áfidos de una manera no persistente (Brunt *et al.* 1996); mientras que TMV y ToMV son transmitidos mecánicamente y por semilla (Brunt *et al.* 1996). Estos virus podrían ser analizados en un futuro.

Adicional, resulta interesante analizar un mayor número de muestras de diferentes localidades, años y cultivares de tomate, de modo que permita obtener una mejor perspectiva sobre la presencia y distribución de ToTV en Panamá, ya que las infecciones ocasionadas por este virus varían enormemente, en función de los sistemas de producción, el ambiente y las moscas blancas como vectores. Por consiguiente, la detección de ToTV se debe realizar de manera permanente en el país.

Análisis por RT-PCR en muestras de malezas:

En este estudio se identificó, hasta el nivel de especie, 12 malezas pertenecientes a 10 familias de plantas (Cuadro 3), las cuales fueron colectadas en cultivos de tomate de distintas localidades de las provincias de Los Santos, Herrera y Veraguas en el 2011. Con la finalidad de comprobar la presencia de ToTV en las muestras de malezas colectadas, se realizó la detección del virus por RT-PCR. Todas las muestras de malezas analizadas resultaron negativas a la presencia de ToTV (Figura 3).

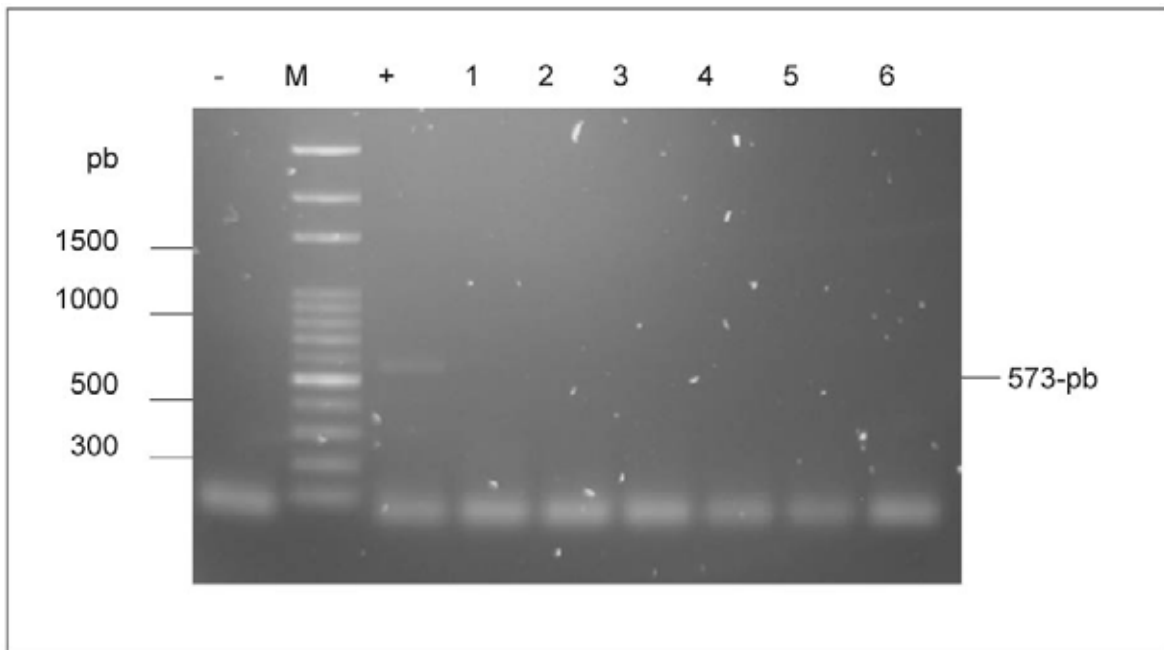


Figura 3. Amplificación por RT-PCR de 573-pb de la proteína de la cápside Vp23 del ARN 2 de ToTV, a partir de muestras de malezas colectadas en cultivos de tomate. Líneas 1-6, muestras -; -, agua ultrapura estéril; +, ToTV (aislado Mur-06); M, marcador de peso molecular de 100-pb (Amresco).

CUADRO 3. PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE ToTV POR RT-PCR EN MUESTRAS DE MALEZAS COLECTADAS EN EI 2011.

Localización geográfica		Especie (Familia) ^a	Detección de ToTV por RT-PCR
Provincia	Localidad		
Los Santos	El Montero, Guararé	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae) (1)	-
		<i>Euphorbia hypericifolia</i> L. (Euphorbiaceae) (1)	-
	El Hato, Guararé	<i>Portulaca oleracea</i> L. (Portulacaceae) (1)	-
		<i>Amaranthus spinosus</i> L. (Amaranthaceae) (1)	-
	Tres Quebradas, Los Santos	<i>Heliotropium indicum</i> L. (Boraginaceae) (1)	-
		<i>Cleome viscosa</i> L. (Capparidaceae) (1)	-
		<i>Priva lappulacea</i> (L.) Pers. (Verbenaceae) (1)	-
		<i>Amaranthus dubius</i> Mart ex Thell (Amaranthaceae) (1)	-
		<i>Parthenium hysterophorus</i> L. (Asteraceae) (1)	-
		<i>Portulaca oleracea</i> L. (Portulacaceae) (1)	-
	El Chará, Tonosí	<i>Amaranthus spinosus</i> L. (Amaranthaceae) (1)	-
		<i>Cleome viscosa</i> L. (Capparidaceae) (1)	-
Herrera	Pesé, Las Cabras ^b	<i>Ludwigia erecta</i> (L.) Hara (Onagraceae) (1)	-
		<i>Mitracarpus hirtus</i> (L.) DC (Rubiaceae) (1)	-
	Los Chicharrones, Chitré	<i>Amaranthus dubius</i> Mart ex Thell (Amaranthaceae) (2)	-
		<i>Cleome viscosa</i> L. (Capparidaceae) (1)	-
		<i>Heliotropium indicum</i> L. (Boraginaceae) (1)	-
	Santa María, Los Canelos, Divisa	<i>Heliotropium procumbens</i> Mill. (Boraginaceae) (1)	-
Veraguas	Santa María, Los Canelos, Divisa	<i>Ludwigia</i> sp. (Onagraceae) (1)	-
	Santiago,	<i>Amaranthus dubius</i> Mart ex Thell (Amaranthaceae) (1)	-
	La Raya de Santa María,	<i>Cleome viscosa</i> L. (Capparidaceae) (1)	-
Cañazas Abajo	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq. (Malvaceae) (2)	-	
		<i>Amaranthus dubius</i> Mart ex Thell (Amaranthaceae) (1)	-

^a El número entre paréntesis indica la cantidad de muestras analizadas de cada especie de maleza.

^b En esta localidad solo se colectó muestras de malezas, por lo tanto, los datos GPS no aparecen en el Cuadro 2. Las coordenadas UTM y la altitud de esta localidad son las siguientes: 550653/870642 (X/Y); 54 msnm.

Es importante indicar que Alfaro-Fernández *et al.* (2008) colectaron 72 muestras de malezas en invernaderos de tomate de Murcia e Islas Canarias (España), con la finalidad de identificar los posibles hospedantes alternativos que podrían actuar como reservorios de ToTV. La presencia de este virus fue determinada en 22 de estas muestras, identificadas taxonómicamente como *Amaranthus* sp. (Amaranthaceae); *Spergularia* sp. (Caryophyllaceae); *Atriplex* sp., *Chenopodium ambrosioides* L., *Chenopodium* sp. y *Halogetum sativus* (Loef. ex L.) Moq. (Chenopodiaceae); *Senebiera didyma* Pers. (Cruciferae); *Malva* sp. (Malvaceae); *Polygonum* sp. (Polygonaceae), y *Nicotiana glauca* Graham y *Solanum nigrum* L. (Solanaceae).

En este estudio, estas especies no fueron observadas, a excepción del género *Amaranthus* sp., descrito por Alfaro-Fernández *et al.* (2008) como hospedante de ToTV, como se indicó anteriormente. Por lo tanto, las especies *Amaranthus spinosus* L. y *Amaranthus dubius* Mart ex Thell identificadas en el trabajo, podrían actuar como potenciales hospedantes alternativos de este virus en Panamá. Sin embargo, se requiere analizar un mayor número de muestras de malezas para confirmar o negar esta hipótesis.

Análisis de secuencias de ToTV:

Con la finalidad de confirmar la identidad de ToTV y comparar los aislados panameños con los aislados de este virus de otras partes del mundo, se realizó una selección de los productos obtenidos inicialmente mediante RT-PCR con los iniciadores TR2F y TR2R. Dicha selección incluyó aislados de las dos localidades donde ToTV fue detectado en este trabajo. En este sentido, fueron seleccionados dos productos, uno de ellos obtenido de una muestra de El Montero y el otro, de El Hato, ambas localidades del distrito de Guararé, en la provincia de Los Santos. Estos productos presentaron el tamaño esperado de 573-pb correspondiente a la proteína de la cápside Vp23 del ARN 2 de ToTV, y los mismos fueron purificados y secuenciados.

Las secuencias obtenidas correspondientes a los aislados de ToTV de El Montero (ToTV-PAN2) y de El Hato (ToTV-PAN3), se compararon con las secuencias de los aislados de este virus procedente de otras regiones geográficas publicadas en la base de datos del GenBank (NCBI) (Cuadro 1), confirmando su identidad.

En estudios previos realizados por Herrera-Vásquez *et al.* (2009a), estos autores publicaron dos secuencias (GenBank Accesoión Nos. FJ357161

y EU934037) del aislado ToTV-PAN1 obtenido a partir de una muestra de tomate infectada procedente de la provincia de Coclé. Sin embargo, en el presente estudio se obtienen por primera vez dos secuencias de ToTV en tomate de la provincia de Los Santos (aislados ToTV-PAN2 y ToTV-PAN3).

En todos los casos, las secuencias de los aislados ToTV-PAN2 y ToTV-PAN3 mostraron una alta homología (98-100%)

a nivel de secuencia de nucleótidos en la zona del genoma estudiada, con las secuencias de los aislados de este virus procedentes de otras latitudes geográficas (Australia, Polonia, Italia, y España), incluyendo el aislado ToTV-PAN1 de la provincia de Coclé, obtenido previamente por Herrera-Vásquez *et al.* (2009a), siendo evidente la relación entre la mayoría de las secuencias analizadas en este estudio (Figura 4).

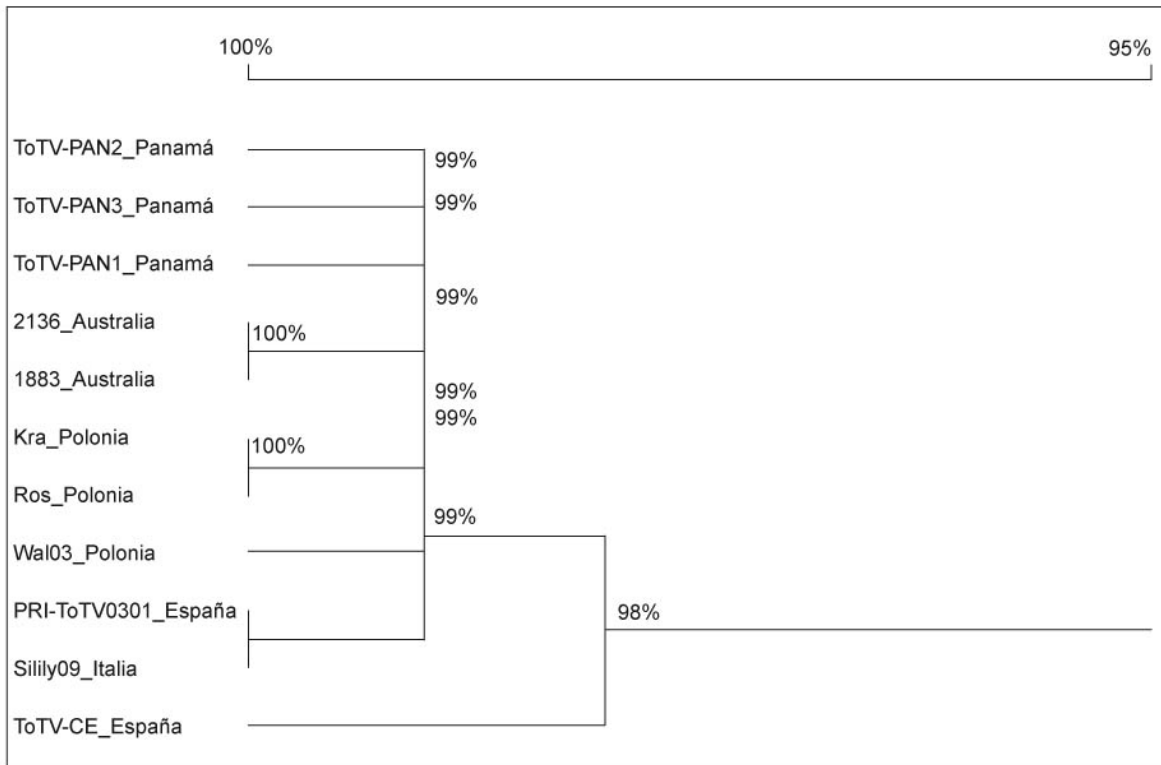


Figura 4. Árbol de homología de secuencias nucleotídicas de la proteína de la cápside Vp23 del RNA2 de ToTV obtenidas en este estudio (aislados ToTV-PAN2 y ToTV-PAN3) y en la base de datos del GenBank (NCBI) (aislados de diferentes partes del mundo). En cada caso, se indica el nombre del aislado y su país de origen.

La proteína de la cápside Vp23 revela una alta homología a nivel de nucleótidos (98-99%) entre aislados de ToTV de diferentes partes del mundo (Alfaro-Fernández *et al.* 2010a, Pospieszny *et al.* 2010), coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo. Estudios filogenéticos que involucren distintas regiones del genoma de ToTV, así como un mayor número de secuencias de este virus procedentes de Panamá y de otras latitudes geográficas, con la finalidad de determinar la variabilidad molecular mundial de ToTV, podrían llevarse a cabo en un futuro, con el propósito de emplear la información en programas de mejoramiento genético tendientes a generar materiales de tomate resistentes a este virus.

CONCLUSIONES

- Se describe la presencia y distribución de ToTV en muestras de tomate procedentes de la provincia de Los Santos, la cual fue determinada mediante la técnica de RT-PCR y su posterior confirmación mediante secuenciación de ADN.
- La información sobre la presencia y distribución de ToTV en Panamá puede ser utilizada en estudios epidemiológicos que permitan diseñar estrategias de manejo integrado.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro-Fernández, A; Córdoba-Sellés, MC; Cebrián, MC; Herrera-Vásquez, JA; Sánchez-Navarro, JA; Juárez, M; Espino, A; Martín, R; Jordá, C. 2008. First report of *Tomato torrado virus* on weed hosts in Spain. *Plant Disease* 92:831.
- Alfaro-Fernández, A; Bese, G; Córdoba-Sellés, MC; Cebrián, MC; Herrera-Vásquez, JA; Forray, A; Jordá, C. 2009. First report of *Tomato torrado virus* (ToTV) infecting tomato in Hungary. *Plant Disease* 93:554.
- Alfaro-Fernández, A; Cebrián, MC; Herrera-Vásquez, JA; Córdoba-Sellés, MC; Sánchez-Navarro, JA; Jordá, C. 2010a. Molecular variability of Spanish and Hungarian isolates of *Tomato torrado virus*. *Plant Pathology* 59:785-793.
- Alfaro-Fernández, A; Córdoba-Sellés, MC; Juárez, M; Herrera-Vásquez, JA; Sánchez-Navarro, JA; Cebrián, MC; Font, MI; Jordá, C. 2010b. Occurrence and geographical distribution of the "Torrado" disease in Spain. *Journal of Phytopathology* 158:457-469.

- Altschul, SF; Madden, TL; Schaffer, AA; Zhang, J; Zhang, Z; Miller, W; Lipman, DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Amari, K; González-Ibeas, D; Gómez, P; Sempere, RN; Sánchez-Pina, MA; Aranda, MA; Díaz-Pendón, JA; Navas-Castillo, J; Moriones, E; Blanca, J; Hernández-Gallardo, MD; Anastasio, G. 2008. *Tomato torrado virus* is transmitted by *Bemisia tabaci* and infects pepper and eggplant in addition to tomato. *Plant Disease* 92:1139.
- Brunt, AA; Crabtree, K; Dallwitz, MJ; Gibbs, AJ; Watson, L; Zurcher, EJ. (eds). 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 20th August 1996 (en línea). Consultado 25 sep. 2014. Disponible en <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- Davino, S; Bivona, L; Iacono, G; Davino, M. 2010. First Report of *Tomato torrado virus* infecting tomato in Italy. *Plant Disease* 94:1172.
- Gambley, CF; Thomas, JE; Persley, DM; Hall, BH. 2010. First report of *Tomato torrado virus* on tomato from Australia. *Plant Disease* 94:486.
- Herrera-Vásquez, JA; Alfaro-Fernández, A; Córdoba-Sellés, MC; Cebrián, MC; Font, MI; Jordá, C. 2009a. First report of *Tomato torrado virus* infecting tomato in single and mixed infections with *Cucumber mosaic virus* in Panama. *Plant Disease* 93:198.
- Herrera-Vásquez, JA; Córdoba-Sellés, MC; Cebrián, MC; Alfaro-Fernández, A; Jordá, C. 2009b. First report of *Pepper mild mottle virus* and *Tobacco mild green mosaic virus* infecting pepper in Panama. *Plant Pathology* 58:786.
- Herrera-Vásquez, JA. 2013. Virus transmitidos por semilla de tomate y pimentón del IDIAP. *Sin publicar*.
- Mackenzie, DJ; Mclean, MA; Mukerji, S; Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81:222-226.
- NAPPO (North American Plant Protection Organization). 2010. Sistema de Alerta Fitosanitaria de la Organización Norteamericana de

- Protección a las Plantas (en línea). Consultado 9 jun. 2010. Disponible en <http://www.pestalert.org/>.
- Pospieszny, H; Borodynko, N; Obrepalska-Stepłowska, A; Hasiów, B. 2007. First report of *Tomato torrado virus* in Poland. *Plant Disease* 91:1364.
- Pospieszny, H; Budziszewska, M; Hasiów-Jaroszewska, B; Obrepalska-Stepłowska, A; Borodynko, N. 2010. Biological and molecular characterization of Polish isolates of *Tomato torrado virus*. *Journal of Phytopathology* 158:56-62.
- van den Heuvel, JF; Maris, PC; Verbeek, M; Dullemans, AM; van der Vlugt, RA. 2006. Plant Virus Designated *Tomato torrado virus*. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization: Patent no.WO2006085749.
- Verbeek, M; Dullemans, AM; van den Heuvel, JFJ; Maris, PC; van der Vlugt, RAA. 2007. Identification and characterization of *Tomato torrado virus*, a new plant picorna-like virus from tomato. *Archives of Virology* 152:881-990.
- Verbeek, M; Dullemans, AM. 2012. First Report of *Tomato torrado virus* infecting tomato in Colombia. *Plant Disease* 96:592.
- Verbeek, M; van Bekkum, PJ; Dullemans, AM; van der Vlugt, RA. 2013. Torradoviruses are transmitted in a semi-persistent and stylet-borne manner by three whitefly vectors. *Virus Research* 186:55-60.
- Verdin, E; Gognalons, P; Wipf-Scheibel, C; Bornard, I; Ridray, G; Schoen, L; Lecoq, H. 2009. First Report of *Tomato torrado virus* in tomato crops in France. *Plant Disease* 93:1352.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Licda. Evelin Romero y al Licdo. Marcos Hernández (Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología del Centro Regional Universitario de Azuero-CRUA, Universidad de Panamá) por su valiosa asistencia en los trabajos de campo y laboratorio. También, queremos agradecer al personal técnico de la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal (DNSV) del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), por el apoyo técnico para la realización de las colectas en los cultivos de tomate en Panamá.

De igual forma, agradecemos a los especialistas Licdo. Alex Espinosa del Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN) de la Universidad de Panamá, Licda. Lucila de Zárate del Herbario de la Universidad de Panamá, y al Ing. Orlando Osorio del LPV-CIAC-IDIAP, por su colaboración en la identificación de las malezas colectadas. También, agradecemos a la Dra. Ana Alfaro del Grupo de Virología del Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM) de la

Universidad Politécnica de Valencia (UPV), Valencia, España, por facilitarnos los aislados españoles de ToTV utilizados como controles positivos, y a la Licda. Maica Cebrián (Valencia, España) por su colaboración y sugerencias en los análisis RT-PCR.

Por último, agradecemos a los productores de tomate de las diferentes localidades visitadas, por permitirnos realizar las colectas de las muestras en sus campos de cultivo.