

Plants Affected by Frogskin Disease. Journal of Phytopathology 156: 647-653.

- 13- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 14- Kumar S., Tamura K. and Nei M.M. 1994. Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. Computer Applied

Biosciences 10: 189-191.

- 15- Cuervo M. 2006. Caracterización molecular de algunos aislamientos del virus del cuervo de sapo de la yuca recolectados en diferentes zonas de Colombia. Tesis Doctorado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 83pp.

Identificación y caracterización de *Cassava common mosaic virus* en cultivos de mandioca en Argentina

Andrea Zanini¹, Patricia Rodríguez Pardina¹, Andrés Luque² y Liliana Di Feo¹

1- Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) CIAP- INTA. 2- Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) CIAP- INTA. Córdoba.

Correo-e: ldifeoar@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La mandioca (*Manihot esculenta*), cuyo centro de origen genético se encuentra en la cuenca amazónica (1), adquiere particular importancia en regiones tropicales y subtropicales del mundo, que van desde el nivel del mar hasta los 1800 m.s.n.m. En la actualidad, es el cuarto cultivo alimenticio en importancia luego del arroz, trigo y maíz (2), y un componente básico en la dieta de más de 1000 millones de personas.

Se destaca por su singular versatilidad de aplicaciones, debido a la explotación comercial de todas sus partes. El principal producto son sus raíces, proveedoras de energía y nutrientes tanto para animales como para humanos, las cuales constituyen la segunda fuente de almidón, luego del maíz (2). Según sus usos principales, las raíces tuberosas pueden dirigirse a cuatro sectores del mercado: frescas o procesadas para consumo humano; procesadas para producir harina seca; como materia prima en la industria productora de alimentos balanceados para

animales, y como producto intermedio para fines no alimenticios (industria farmacéutica, de adhesivos, química, textil y papelería) (1). Otros órganos importantes de la planta son los tallos, que proveen estacas para la propagación comercial del cultivo, y las hojas que constituyen una excelente fuente de proteínas, minerales y vitaminas, lo que permite su inclusión en la alimentación humana y en la dieta de animales (2).

En agricultura, la mandioca es manejada como un cultivo anual; sin embargo, el hecho de que sea perenne le confiere cierta rusticidad pues, al no tener un período fenológico vulnerable, es resistente a condiciones adversas, principalmente estrés hídrico (2). La ventaja comparativa con otros cultivos más rentables es su capacidad para crecer en suelos ácidos, de escasa fertilidad, con precipitaciones esporádicas o largos períodos de sequía (3).

En nuestro país, el cultivo de mandioca está localizado en la región noreste, donde la provincia de Misiones posee la mayor superficie cultivada (aproximadamente 25.000 ha)

y también la mayor actividad industrial instalada. Le siguen Corrientes y Formosa, con 1.880 y 1.625 ha, respectivamente, donde es utilizada para consumo directo y, eventualmente, para renta. Por su parte, Chaco destina 1.000 ha a este cultivo, utilizado principalmente para autoconsumo, y unos pocos productores lo comercializan (com. pers. Pletsch y Uset).

Entre las limitantes del cultivo de mandioca, las enfermedades causadas por virus tienen gran relevancia, ya que estos patógenos se acumulan en los tejidos en los sucesivos ciclos de propagación agámica de la especie, con los consiguientes daños sobre el crecimiento y la producción. En *M. esculenta* se han aislado al menos 16 virus diferentes; sin embargo, otros siguen sin describirse.

Las enfermedades virales de la mandioca pueden ser asintomáticas o producir síntomas. Entre las primeras, estudiadas en Sudamérica, se destacan el “mosaico común de la yuca” (CsCMD, por su sigla en inglés) y el “mosaico de las nervaduras de la yuca” (CVMD), como patologías que ocasionan síntomas foliares; y el “cuero de sapo” (CFSD), que causa graves síntomas radiculares (4).

Las plantas afectadas por la CsCMD desarrollan síntomas de mosaico y clorosis en las hojas. Éstos aumentan su severidad a medida que se prolongan los períodos relativamente fríos, situación que es frecuente en zonas subtropicales de América del Sur. Bajo estas condiciones, las plantas afectadas son generalmente de menor tamaño y las pérdidas de rendimiento pueden alcanzar hasta un 60% (5). Esta enfermedad es causada por *Cassava common mosaic virus* (CsCMV), perteneciente al género *Potexvirus*, de acuerdo a la morfología de las partículas, serología y cuerpos de inclusión (6). Posee viriones alargados, semiflexuosos, de 15 nm de diámetro y 495 nm de longitud (7). El genoma consiste en un ARN de cadena sencilla, que ha sido completamente secuenciado (6).

Se sabe que CsCMV infecta de manera sisté-

mica a *M. esculenta*, así como a *Euphorbia* spp., *Cnidoscolus aconitifolius* (chaya), *N. benthamiana* y a otras especies de la familia euforbiáceas (5). Debido a que se disemina de manera sistémica en la planta, la principal fuente de inóculo es el material vegetal infectado. Por esta razón, las estacas provenientes de una planta afectada también están enfermas. El virus es muy estable y puede ser propagado por transmisión mecánica en los machetes u otros implementos usados en las labores agrícolas. Aunque este modo de dispersión es ineficiente, constituye el único medio conocido de propagación desde una planta a otra (8).

En América, las enfermedades virales en el cultivo de mandioca constituyen un problema con influencia creciente en los rendimientos, habiendo sido subestimadas a tal punto que no existen investigaciones relativas a la importancia económica de cada virus o complejo viral (9). Es muy probable que en Argentina, las enfermedades de etiología viral estén causando pérdidas económicas considerables en esta especie. Si bien no existen antecedentes bibliográficos respecto a los virus de la misma, los estudios efectuados en 2013 por Zanini *et. al.* (10) permitieron confirmar la presencia generalizada de CsCMV en cultivos de Corrientes y Formosa. Como prácticamente la totalidad de los lotes plantados están infectados con este patógeno, la falta de un patrón sano hace dificultosa la estimación certera en relación a las mermas que el mismo causa en la producción de raíces.

Es necesario realizar estudios de detección y caracterización de el/ los virus asociados con plantas de mandioca que presentan síntomas virales, lo cual nos permitirá conocer la naturaleza de estas enfermedades, modo de transmisión de sus agentes causales, hospedantes alternativos, como etapa previa para realizar estudios relativos a su importancia y posibilidades de control.

El objetivo de este trabajo fue identificar y

caracterizar biológica, serológica y molecularmente, y mediante microscopía electrónica a CsCMV-Ar, causal de síntomas de mosaico en plantas de mandioca provenientes de cultivos de Corrientes, Formosa y Misiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Fuente de inóculo

Se utilizaron estacas de mandioca con síntomas evidentes de mosaico, convenientemente acondicionadas provenientes del NE argentino (EEA INTA El Colorado, Formosa; Univ. Nac. NE. Corrientes, Cooperativa Agrícola e Industrial San Alberto Ltda. (CAISA) de la localidad de Garuhapé, Misiones; gentilmente donados por la Lic. (MSc.) Rosa Hoyos, el Dr. Ricardo Medina y el Ing. Agr. Antonio Uset, respectivamente). Las estacas fueron sometidas a enraizamiento forzado en "mist" y, una vez que emitieron raíces, se establecieron en macetas bajo condiciones



Figura 1. Plantas de mandioca con síntomas de virosis, mantenidas dentro de una jaula anti-insectos en condiciones de invernadero (A). Planta sana (B). Detalles de síntomas de mosaico y malformación de hojas (C).

controladas de temperatura, humedad e iluminación en invernadero, estando además protegidas dentro de jaulas con malla anti-insectos (Figura 1).

- Inoculación mecánica

Hojas de las plantas mantenidas en invernadero como fuente de inóculo fueron homogeneizadas, en proporción 1/20 (P/V), en tampón fosfato de potasio 0,05M; pH 7,2 (11), conteniendo 0,2% de sulfito de sodio. Con la savia extraída se inocularon hojas de *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. occidentalis*, *N. tabacum* cv Samsun, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *Gomphrena globosa*, *Gossypium hirsutum* (12). Luego de una semana desde la inoculación se observó la evolución de síntomas.

- Observaciones al microscopio electrónico

Preparaciones leaf dip. Para comprobar la presencia de partículas virales en mandioca y en las especies inoculadas mecánicamente, se recurrió a la microscopía electrónica. Para ello se efectuaron preparados *leaf dip*, en los que tejido de mandioca (pequeñas porciones de hojas con síntomas conspicuos) y de las plantas de las diferentes especies inoculadas, respectivamente, fue macerado en proporción 1/2 (P/V) en tampón fosfato 0,1M, pH7. Luego se efectuó una tinción negativa de los viriones con acetato de uranilo 2%, para su ulterior observación al microscopio electrónico de transmisión TEM Jeol 1200 EX II (13).

Preparaciones de decoración. Se empleó el jugo de plantas fuente de inóculo, obtenido tras macerar la lámina foliar en tampón fosfato 0,1M, pH7, en proporción 1/10 (P/V). A continuación las partículas se decoraron incubando las grillas con antisuero específico para *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) gentilmente donado por Eliezer R. Souto del Departamento de Agronomía de la Universidade Estadual de Maringá (Brasil). Se utilizó una dilución 1/100 (V/V) del antisuero en el tampón mencionado, donde las grillas se in-

cubaron por 15 min, en cámara húmeda (14).

Cortes ultrafinos

A los fines de constatar los efectos citopáticos producidos por la infección viral, se efectuaron cortes ultrafinos de tejido enfermo proveniente de las plantas empleadas como fuente de inóculo. Trozos de tejido sintomático de 1-3mm² fueron fijados en paraformaldehído- glutaraldehído, posfijados en tetróxido de osmio, deshidratados en diluciones seriadas de acetona e incluidos en resina Spurr. Finalmente se procedió a realizar cortes en ultramicrotomo los cuales se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de su observación al microscopio electrónico (15).

Determinación de la longitud modal de las partículas virales

A partir de hojas de una planta de mandioca con síntomas notables de mosaico (Figura 1C) en la que todos los viriones se decoraron uniformemente con suero anti-CsCMV, se realizaron preparados *leaf dips* con tinción negativa empleando acetato de uranilo, como se indicó anteriormente. Estos viriones se fotografiaron mediante una cámara digital anexada al microscopio electrónico y se determinó su largo modal (considerando 126 partículas). Con las longitudes obtenidas con el software *Image-Pro Plus* se realizó el histograma de frecuencia correspondiente.

- Pruebas serológicas

Para el análisis serológico se empleó el antisuero específico contra CsCMV antes mencionado, en una dilución 1/10.000 (V/V) mediante la aplicación de la técnica *Plate Trapped Antigen ELISA* (PTA-ELISA) (16). Las muestras fueron maceradas en tampón extracción en dos diluciones: 1/10 (P/V) y 1/100 (P/V). El testigo enfermo (mandioca), también proporcionado por el Dr. De Souto, fue utilizado en una dilución 1/300 (P/V). La lectura de las placas se realizó a 405nm (A_{405}) en un lector de Elisa marca Dynatech MR 700. Se consideraron enfermas las muestras que superaron el umbral de absorbancia

(punto crítico) obtenido por la sumatoria de la media de A_{405} de los testigos sanos más tres veces su desvío estándar.

- Pruebas moleculares

PCR

Se extrajo ARN del material vegetal con el método CTAB (17) modificado para hojas de mandioca (18) y la síntesis del ADN complementario (cADN) se realizó con cebadores hexámeros que hibridan al azar (Invitrogen, *Life technologies*. California, USA) y con la enzima de transcripción reversa M-MLV (Promega Corporation. Madison, USA) (18). El PCR se efectuó empleando cebadores específicos para CsCMV. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25µl, conteniendo 2µl de cDNA; 5µl de tampón PCR 5x; 1,5µl de MgCl₂ 25mM; 2,5µl dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 2,5mM; 0,5µl de GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega Corporation. Madison, USA) y 3µl de cebadores. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1,5% p/v), teñidos con bromuro de etidio (2µg/ml), a fin de verificar la presencia de la banda del tamaño esperado.

Clonado y secuenciado

Los productos de PCR obtenidos fueron utilizados para su ligado y secuenciación.

Para la clonación se empleó el vector pCR[®] 4-TOPO[®], siguiendo las especificaciones del fabricante (TOPO[®] TA Cloning Kit for Sequencing, (Invitrogen, *Life technologies*. California, USA).

Las células competentes de *Escherichia coli*, se transformaron por el método de choque térmico (incubando a 42°C por 30 segundos) de acuerdo al protocolo de Sambrook (19) y fueron sembradas en medio LB (Luria Bertani) + ampicilina (100 µl/ml). Uno a tres clones, obtenidos a partir de los productos de PCR y ajustados a una concentración mínima de 200 ng/µl, fueron enviados a la Unidad de Genómica de INTA Castelar para su secuenciación. Las secuencias de nucleótidos deducidos fueron comparadas con las de otros virus

previamente caracterizados, que están disponibles en el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih). Para ello, se empleó el programa Blastn (www.ncbi.nlm.nih/BLAST).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- *Transmisión mecánica:*

Del rango de hospedantes empleado se infectaron con CsCMV: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, y *N. occidentalis*. Por el contrario el virus no se transmitió a: *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv Samsun y *Gossypium hirsutum*. En el diagnóstico de la infección mediante microscopía

electrónica se visualizaron partículas virales alargadas y flexuosas, semejantes a las de otros potexvirus. El análisis de las muestras por PTA-ELISA, usando CsCMV_{as}, permitió demostrar si se trataba de infecciones locales (detección del virus sólo en hoja inoculada) o sistémicas (detección del virus también en hojas sin inocular).

Los síntomas locales presentados por *G. globosa* (Figura 2) coinciden con los provocados por el potexvirus *Potato virus X* en este hospedante. Por otro lado, la sintomatología de mosaico foliar en *N. benthamiana* (Figura 3) y puntos cloróticos en *C. quinoa* y *C. amaranticolor*, concuerdan con los ya descritos para el CsCMV en estas especies (12, 20).

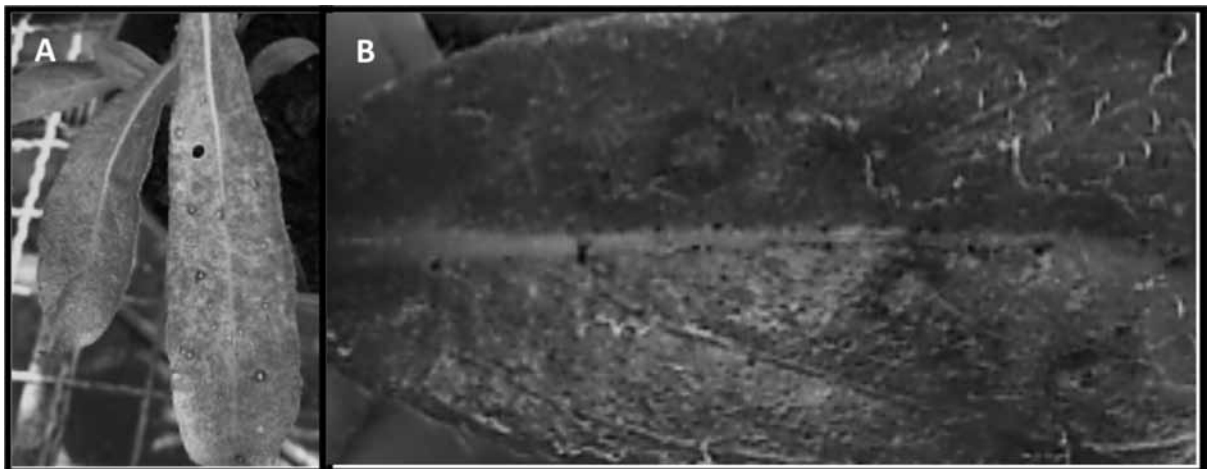


Figura 2. Síntomas en *Gomphrena globosa* a los 10 días desde la inoculación mecánica con extracto vegetal de mandioca infectado con CsCMV (A). Detalle de las lesiones necróticas producidas por el CsCMV (B)



Figura 3. Mosaico suave en *Nicotiana benthamiana* a los 15 días de la inoculación con mandioca infectada con CsCMV (A) y planta sana de la indicadora (B).

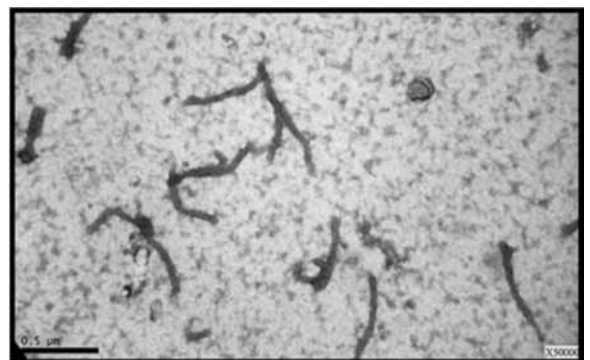


Figura 4. Partículas decoradas uniformemente con anti-suero contra CsCMV 1/100 (v/v) en hojas de plantas de mandioca procedentes de Corrientes (50.000X. La barra indica 0,5μm de longitud)

- Observaciones al microscopio electrónico

En los preparados *leaf dip* de plantas de mandioca con síntomas y de las especies hospedantes, se corroboró la presencia de partículas virales alargadas y semiflexuosas. De acuerdo a las observaciones al M.E. de preparaciones de decoración, algunas plantas de mandioca sintomáticas provenientes de Corrientes estaban infectadas sólo con CsCMV. En este caso, todas las partículas se decoraron uniformemente con CsCMVas (Figura 4). Por su parte, en las muestras procedentes de Formosa, hubo decoración diferencial de viriones alargados, indicio de la presencia de infecciones mixtas (Figura 5). De acuerdo a las mediciones realizadas en una planta de mandioca con síntomas de mosaico foliar y que, según pruebas de decoración, estaban infectadas sólo con *Cassava common mosaic virus* (CsCMV), se determinó una longitud modal de partículas virales comprendida entre los 480 y 500 nm, lo cual coincide con la de dicho patógeno, que es de 495nm (Figura 6) (7).

En observaciones de cortes ultrafinos se detectaron inclusiones virales en el citoplasma del tejido foliar de plantas sintomáticas de mandioca. Las mismas consistieron en masas fibrosas que contenían partículas filamentosas, paralelas entre sí, y fueron más frecuentes en áreas cloróticas de las hojas (Figura 7).

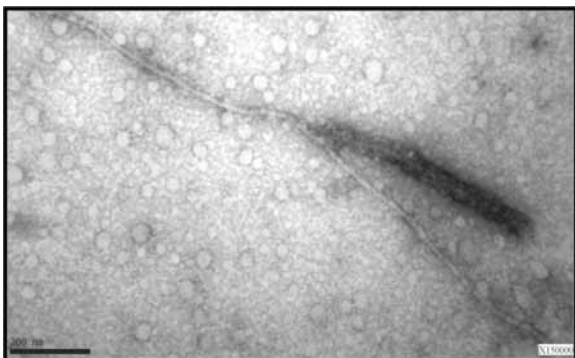


Figura 5. Partículas diferencialmente decoradas con antisuero contra CsCMV 1/100 (v/v) en hojas de plantas de mandioca procedentes de Formosa (150.000X. La barra indica 200 nm)

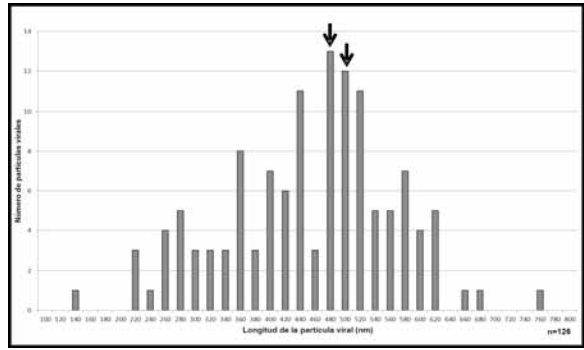


Figura 6. Histograma de frecuencias de la longitud de viriones observados en una planta de mandioca infectada con CsCMV

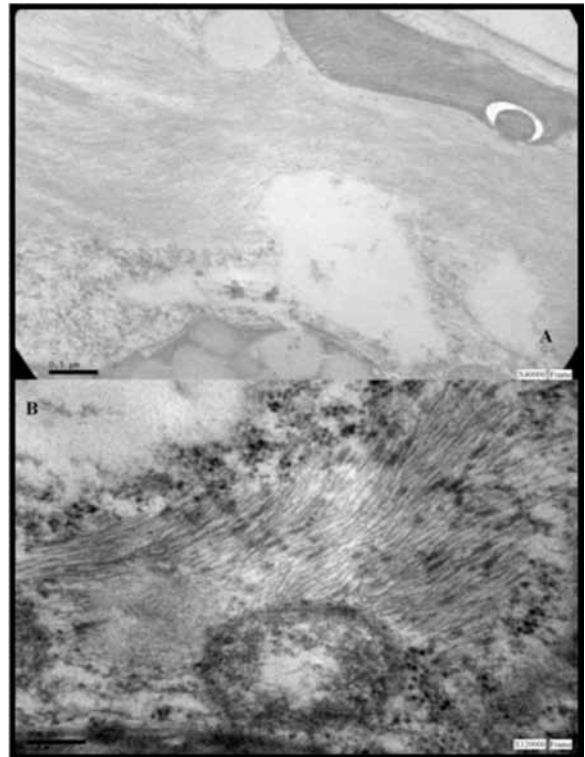


Figura 7. Cuerpos de inclusión en el citoplasma de plantas de mandioca con síntomas de mosaico (A). Detalle de las partículas dispuestas paralelamente (B)

- Serología

En el cuadro 1 se presentan las lecturas de absorbancia a 405 nm de longitud de onda (A_{405}) de las diferentes muestras de mandioca procedentes de Corrientes, Formosa y Misiones. Puede apreciarse que la concentración viral fue marcadamente superior en las segundas. Se recomienda el empleo del CsCMV_{as} en dilución 1/100, ya que permite

Cuadro 1. Lecturas de A₄₀₅ del PTA-ELISA con el suero contra CsCMV. Umbral de absorbancia obtenido de los testigos sanos para la dilución 1/100: 0,094 y para 1/10: 0,095.

Procedencia	Muestra	Dilución del antígeno (p/v)		Condición
		1/100	1/10	
Corrientes	3A	0,064	0,050	Sana
Corrientes	CM-3306	0,061	0,059	Sana
Corrientes	6A	1,014	0,948	Enferma
Corrientes	EC23	0,090	0,065	Sana
Corrientes	2F	1,328	1,493	Enferma
Corrientes	CO1	1,558	1,665	Enferma
Corrientes	CO2	1,034	1,210	Enferma
Corrientes	CO3	1,162	1,511	Enferma
Corrientes	CO4	0,686	1,480	Enferma
Corrientes	CO6	1,217	1,029	Enferma
Formosa	EC17	1,736	1,916	Enferma
Formosa	EC1858	0,254	0,157	Enferma
Formosa	EC164	1,807	1,334	Enferma
Formosa	Yerutí	1,227	1,573	Enferma
Misiones	CA-25-1(1)	1,827	2,262	Enferma
Misiones	CA-25-1(2)	1,917	1,863	Enferma
Misiones	CA-25-1(3)	1,991	1,077	Enferma
Misiones	CA-25-1(4)	2,500	1,405	Enferma
Misiones	CA-25-1(5)	1,237	1,213	Enferma

una máxima diferenciación entre las lecturas de muestras sanas y enfermas.

- **Secuenciación**

Las secuencias resultantes de los clones de *E. coli* transformadas con el producto de PCR obtenido con iniciadores específicos para CsCMV, mostraron un 89% de identidad a nivel de nucleótidos con el aislamiento brasilero del potexvirus *Cassava common mosaic virus* (Nº de acceso *GenBank*: U23414.1) y 94,9% a nivel de aminoácidos.

El fragmento amplificado del CsCMV incluye la secuencia parcial del *triple gene block* y de la cápside proteica (CP).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten informar, por primera vez, la presencia de virus en cul-

tivos de mandioca de Argentina. Las infecciones con CsCMV se encuentran generalizadas en el NEA. Por otra parte, se muestran indicios de infecciones con otras especies virales.

Este trabajo es el inicio de una serie de estudios que deberán focalizarse en la etiología de las enfermedades virales, su epidemiología y los daños ocasionados por las mismas, ya que, según nuestras observaciones, estas virosis afectan a la mayoría de los cultivos de las provincias productoras. Por tal motivo, resulta difícil, bajo condiciones naturales y, debido a la ausencia de patrones sanos de comparación, establecer la magnitud de las mermas potenciales en los rendimientos. Es necesario, por ende, recurrir a la ejecución de ensayos experimentales.

Por otra parte, dado que para el manejo de

estas enfermedades es imprescindible su diagnóstico previo, se está iniciando la producción de un antisuero que permita la fácil detección del CsCMV.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- 1- Fretes F. y Mendoza C. 2010. MANDIOCA: Una opción industrial, Asunción, Paraguay.
- 2- Ceballos H. y Hershey C. 2012. La mandioca: un cultivo americano que conquistó el mundo. *In: XXXV Congreso Argentino de Horticultura, Asociación Argentina de Horticultura, Corrientes, Argentina.* pp. 156-161.
- 3- Aristizábal J. y Sánchez T. 2007. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, Roma, Italia.
- 4- Calvert L. y Cuervo M. 2002. Enfermedades Virales de la Yuca en América del Sur. *In: La Yuca en el Tercer Milenio. Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización.* CIAT y Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca., pp. 262-268.
- 5- Costa A.S. y Kitajima E.W. 1972. Studies on virus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil. *In: Cassava Mosaic Workshop, Ibadan, Nigeria. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadán, Nigeria.* pp. 18-36.
- 6- Calvert L.A., Cuervo M.I., Ospina M.D., Fauquet C.M., and Ramirez B.-C. 1996. Characterization of *cassava common mosaic virus* and a defective RNA species. *Journal of General Virology* 77: 525-530.
- 7- Costa A.S. 1940. Observações sobre o mosaico comum e o mosaico das nervaduras da mandioca (*Manihot utilissima* Pohl.) *Journal de Agronomia (Piracicaba)* 3:239-251.
- 8- Ospina B. y Ceballos H. 2002. La Yuca en el tercer milenio Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- 9- CIAT. 1994. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cassava program annual report, Cali, Colombia.
- 10- Zanini A., Rodríguez Pardina P., Luque A. y Di Feo L. 2013. Primer informe de virus de mandioca en Argentina. *In: Resúmenes XXX-VI Congreso Argentino de Horticultura.* Tucumán, Argentina. p. 48
- 11- Di Feo L., Nome S.F., Biderbost E., Fuentes S. and Salazar L. 2000. Etiology of Sweet Potato Chlorotic Dwarf Disease in Argentina. *Plant Disease* 84:35-39.
- 12- Brunt A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J. and Watson L. 1996. Viruses of Plants: Descriptions and lists from the vide data base, CABI International, United Kingdom.
- 13- Roberts I.M. 1986. Practical aspects on handling, preparing and staining samples containing plant virus particles for electron microscopy. *Developments and applications in virus testing:* 213- 243.
- 14- Milne R.G. y Leseman D.E. 1978. An immunoelectron microscopy investigation of oat sterile dwarf and related viruses. *Virology* 90: 299-304.
- 15- Roland J.C. y Vian B. 1991. General preparations and staining of thin sections *In: Electron Microscopy of Plant Cells* (J.L. Hall y C. Hawes, eds.). Academic Press, London. pp. 1-66.
- 16- Mowat W.P. and Dawson S. 1987. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods* 15: 233-247.
- 17- Lodhi M.A., Ye G.-N., Weeden N.F. and Reisch B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13.
- 18- Carvajal Yepes M., Olaya C., Lozano I., Cuervo M., Castaño M. and Cuellar W. 2013. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. *Virus Research.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.011>.
- 19- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual.* 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 20- Zettler F.W. and Elliot M.S. 1986. An Antigenically Distinct Strain of *Cassava Common Mosaic Virus* Infecting *Cnidocolus aconitifolius*. *Phytopathology* 76(6): 632-638.