

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS EN CULTIVOS, PLÁNTULAS Y SEMILLAS DE GULUPA (*Passiflora edulis* *f. edulis*) EN EL ORIENTE DE ANTIOQUIA

Daniela Cardona¹, Yuliana Gallo García², Mónica Higuaita¹, Rodrigo Hoyos Sánchez³,
Pablo A. Gutiérrez Sánchez¹ y Mauricio Marín Montoya¹

RESUMEN

La gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*) es uno de los frutales con mayor crecimiento en los últimos años y de gran influencia en la economía de Antioquia (Colombia); sin embargo, su cultivo es afectado por diferentes problemas fitosanitarios, especialmente la marchitez por *Fusarium oxysporum* y enfermedades virales. En este estudio se evaluó la prevalencia de cuatro virus de ARN (SMV, CABMV, PFYMV y CMV) mediante RT-qPCR, virus del género *Begomovirus* y del badnavirus GBVA por PCR, a partir de muestras sintomáticas (SI) y asintomáticas (AS) obtenidas en 15 lotes, 15 grupos de plántulas (PL) y 15 muestras de semilla sexual en el oriente de Antioquia. Los genomas de los virus fueron ensamblados utilizando secuenciación masiva (HTS) a partir de grupos de muestras (15x). Con excepción de CABMV y begomovirus, los otros virus fueron encontrados en las muestras sintomáticas y asintomáticas, siendo el PFYMV (SI=33,3 % y AS=46,6 %) y SMV (SI=33,3 % y AS=20 %) los de mayor prevalencia, mientras que GBVA y CMV se detectaron en niveles inferiores al 26,6 %. De forma interesante, los cuatro virus detectados se encontraron en evaluaciones sobre brotes de semillas recién germinadas (SMV=40 %, CMV=13,3 %, PFYMV=86,6 %, GBVA=53,3 %), lo que sugiere que la semilla sexual juega un papel importante en la transmisión de estos virus en gulupa, así como también las plántulas comercializadas en esta región (SMV=86,6 %, CMV=0 %, PFYMV=60 %, GBVA=53,3 %). Mediante HTS fue posible el ensamblaje completo de los genomas de PFYMV, SMV y GBVA. Estos resultados enfatizan la necesidad de generar material certificado por su sanidad viral en gulupa.

Palabras clave adicionales: Passifloraceae, RT-qPCR, secuenciación, virus de plantas

ABSTRACT

Molecular detection of viruses infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis f. edulis*) crops, plantlets and seeds from Eastern Antioquia (Colombia)

Gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*) is among the crops with the largest expansion rates in Antioquia (Colombia). This rapid increase has been accompanied by a rise in prevalence of vascular wilt (*Fusarium oxysporum*) and viral diseases. In this work, we evaluated the prevalence of four RNA viruses (SMV, CABMV, PFYMV and CMV), in addition to viruses from the genus *Begomovirus* and the badnavirus GBVA. The presence of viruses was investigated in 15 samples of plantlets and 15 of sexual seeds, 15 asymptomatic and 15 symptomatic, from crops from Eastern Antioquia. For RNA viruses, infection was determined by RT-qPCR; in the case of GBVA and begomoviruses, detection was performed using PCR. The presence of these viruses was further confirmed by high-throughput sequence (HTS) analysis of bulked samples (15x) which allowed the complete sequencing of PFYMV, SMV and GBVA. PFYMV and SMV were the most prevalent viruses in adult plants. PFYMV was detected in 33.3 % of symptomatic and 46.6 % of asymptomatic plants, while SMV was found in 33.3 % of symptomatic, and 20 % of asymptomatic plants. For GBVA and CMV, the prevalence was below 26.6 %. Interestingly, these four viruses had a high prevalence in sprouting seeds (SMV: 40 %, CMV: 13.3 %, PFYMV: 86.6 % and GBVA: 53.3 %) suggesting that sexual seeds are important for virus transmission in gulupa. Plantlets commercialized in the region showed significant levels of SMV (86.6 %), PFYMV (60 %), and GBVA (53.3 %). CABMV and begomoviruses were not detected in any sample. These results highlight the need of implementing virus seed certification schemes for this crop.

Additional keywords: Passifloraceae, plant viruses, RT-qPCR, sequencing

INTRODUCCIÓN

En Colombia, el cultivo de la gulupa

(*Passiflora edulis f. edulis*) se extiende a cerca de 1500 ha y genera alrededor de 25.000 Mg de fruta al año, siendo la mayor parte exportada a Europa y

Recibido: Julio 9, 2021

Aceptado: Enero 18, 2022

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. e-mail: dcardonam@unal.edu.co; mmhiguit@unal.edu.co; paguties@unal.edu.co; mamarinm@unal.edu.co (autor de correspondencia)

² Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia. e-mail: ygallo@ces.edu.co

³ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. e-mail: rhoyos@unal.edu.co

Estados Unidos (Agronet, 2020). Antioquia es el principal productor de esta fruta en el país al aportar cerca del 35 % del área cultivada y 55 % de la producción nacional. En esta región, gracias a sus mayores niveles de tecnificación, se obtienen rendimientos promedio de $24,7 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$, muy superiores al promedio nacional de $16,55 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Agronet, 2020). Sin embargo, el cultivo de gulupa presenta diferentes problemas fitosanitarios entre los que se destacan la marchitez vascular por *Fusarium oxysporum*, la mancha bacterial por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* y la roña por *Cladosporium cladoporioides* (Ortíz y Hoyos, 2012; Joy y Sherin, 2016). Adicionalmente, en los últimos años se han reportado diversas enfermedades de origen viral principalmente asociadas a la infección por el potyvirus: Soybean mosaic virus (SMV) (Jaramillo et al., 2018), el tymovirus: Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) (Jaramillo et al., 2019); y una nueva especie tentativa de badnavirus denominada Gulupa bacilliform virus A (GBVA) (Sepúlveda, 2020); aunque en la región de Cundinamarca también se han registrado el Cucumber mosaic virus (CMV) y el Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV).

En el mundo se han reportado al menos 20 diferentes especies de virus infectando *P. edulis* que pertenecen a los géneros *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Geminivirus*, *Cucumovirus*, *Polerovirus*, *Tobamovirus*, *Rhabdovirus*, *Cilevirus* y *Tymovirus* (Kitajima, 2020; Liberato y Zerbini, 2020). De estos virus, en los cultivos de gulupa de Antioquia, solo se ha detectado el SMV asociado a plantas presentando síntomas con mosaicos rugosos, islas verdes, deformación foliar, enación y moteado de venas; el PFYMV en plantas con síntomas de mosaicos suaves y moteados foliares (Jaramillo et al., 2018, 2019) y el GBVA, del cual se desconocen hasta el momento los síntomas específicos que causa en este hospedante (Sepúlveda, 2020).

Con el fin de continuar con la evaluación de los niveles de prevalencia de virus en cultivos y material de siembra de gulupa en Antioquia, en este estudio se evaluó la infección de cuatro virus de ARN (SMV, CABMV, PFYMV y CMV) mediante RT-qPCR y de los virus de ADN: GBVA y begomovirus, por PCR convencional, a partir de muestras foliares sintomáticas y asintomáticas obtenidas en plantas en producción,

así como en plántulas y semilla sexual comercializadas en el oriente de Antioquia. Adicionalmente, los genomas de los virus detectados fueron ensamblados y anotados a partir de datos obtenidos por secuenciación masiva (High-Throughput Sequencing-HTS) y determinados sus niveles de variación con respecto a otros genomas reportados para dichas especies virales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Este estudio se realizó a partir de muestras foliares sintomáticas (SI) y asintomáticas (AS) obtenidas en 15 lotes de cultivo de gulupa, así como en 15 muestras de plántulas (PL) de 1-2 meses (3 plántulas por lote) y 15 muestras de semilla sexual (1 g por muestra) procedentes de Marinilla ($6^{\circ}10' \text{ N}$, $75^{\circ}20' \text{ W}$), San Vicente Ferrer ($6^{\circ}16' \text{ N}$ $75^{\circ}19' \text{ W}$) y Sonsón ($5^{\circ}42' \text{ N}$ $75^{\circ}18' \text{ W}$) en el oriente de Antioquia. En cada lote de cultivo de gulupa, se obtuvieron 20 hojas asintomáticas y 20 hojas con síntomas posiblemente asociados a enfermedades virales, tales como mosaicos rugosos, moteados cloróticos, verdeamiento de nervaduras y deformación de tejidos foliares (Figura 1). Para el caso de las semillas, 500 mg de cada muestra fueron sometidas a un proceso de fermentación durante 48 h, seguido por la eliminación del arilo. Posteriormente se realizó un tratamiento pregerminativo de estratificación en frío a 4°C por 15 días (Melgarejo, 2019), para finalmente ser sembradas en turba estéril a temperatura ambiente para inducir su germinación. Luego de una semana se colectaron los brotes de las semillas recién germinadas (BS) de manera aséptica para proceder a la extracción de sus ácidos nucleicos.

Extracción de ácidos nucleicos. Cada una de las 15 muestras de SI, AS y PL fue macerada con nitrógeno líquido para proceder a la extracción del ARN total a partir de 100 mg usando el método del Trizol (Chomczynski y Sacchi, 1987); mientras que el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher Scientific) se utilizó para las 15 muestras de los brotes BS. Paralelamente se procedió a la extracción en las 60 muestras del ADN utilizando el método del CTAB (Doyle, 1991) a partir de 60 mg de tejido. Simultáneamente se preparó un grupo de muestras foliares (*bulks*) (SI y AS) procedentes de

diferentes lotes hasta alcanzar 5 g de tejido como base para la extracción de ARN de doble cadena (ARNdc) siguiendo el procedimiento de Valverde et al. (1990) y utilizado recientemente con éxito en la detección molecular de virus en papa (Sierra et al., 2020).

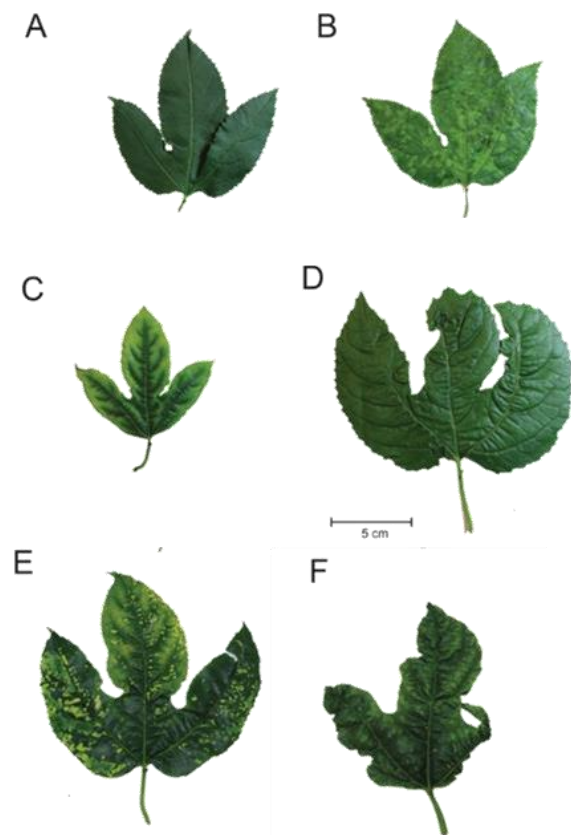


Figura 1. Síntomas asociados a enfermedades virales en plantas de gulupa en producción procedentes del oriente de Antioquia. A. Hoja asintomática. B. Mosaico. C. Verdeamiento de nervaduras. D. Deformación foliar. E. Moteados cloróticos. F. Mosaico rugoso y deformación foliar

También se preparó un *bulk* de tejidos de plántulas y brotes de semillas, dada la baja cantidad de tejido disponible, y se extrajo su ARN total usando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher Scientific). Las tres extracciones realizadas (AS+SI; PL y BS) fueron utilizadas para la secuenciación masiva (HTS), previa evaluación de su calidad y concentración en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

RT-qPCR. A partir de cada una de las extracciones de ARN obtenidas para las 15 muestras AS, SI, PL y BS de gulupa se realizaron pruebas de detección de los virus de ARN previamente reportados en Colombia infectando este frutal (SMV, CABMV, PFYMV y CMV) (Jaramillo et al., 2018; 2019). La síntesis de ADNc y las reacciones de RT-qPCR se realizaron con los primers indicados en el Cuadro 1 y las condiciones descritas por Jaramillo et al. (2019).

El porcentaje de prevalencia viral se determinó en función del número de muestras positivas con relación al de muestras evaluadas. En todas las reacciones se incluyó un control positivo para cada virus y un control negativo. Posteriormente, tres de los amplicones de la qPCR que resultaron positivos para cada virus fueron corridos en un gel de agarosa al 2 % y purificados usando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) para su secuenciación Sanger en ambos sentidos en la compañía Macrogen (Corea del Sur).

PCR. A partir del ADN de las muestras AS y SI en PL y BS de gulupa, se evaluó la presencia del badnavirus GBVA y de begomovirus mediante PCR. Las reacciones consistieron en un volumen total de 25 μ L, con 13 μ L de agua ultrapura estéril, 2,5 μ L de buffer de enzima (10X), 1,8 μ L de $MgCl_2$, 2,5 μ M de dNTPs, 0,2 μ L de Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de BSA, 20 ng de ADN y 0,5 μ M de los primers utilizados para la detección genérica de begomovirus o específica de GBVA (Cuadro 1). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador T3 (Biometra) con un paso inicial de desnaturalización a 95 $^{\circ}C$ por 3 min, seguido de 40 ciclos a 94 $^{\circ}C$ (30 s), 52 $^{\circ}C$ (45 s) y 72 $^{\circ}C$ (1 min); y una extensión final por 5 min a 72 $^{\circ}C$. Posteriormente fueron separados por electroforesis, purificados y secuenciados, tal como se indicó anteriormente.

Secuenciación masiva y análisis bioinformáticos. La extracción de ARNdc fue inicialmente desnaturalizada a 98 $^{\circ}C$ por 5 min y utilizada junto a las dos muestras de ARN total para la generación de librerías de ADNc usando el kit TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep (Illumina) y eliminación previa del ARN ribosomal (ARNr) con el kit Ribo-Zero Plant kit (Illumina). La secuenciación HTS fue realizada en un equipo Illumina NovaSeq en la compañía

Macrogen (Corea del Sur). Una vez obtenidas las secuencias, se realizó la remoción de las bases de baja calidad (Phred<30) usando el programa Sickle (Joshi y Fass, 2011).

Las secuencias virales fueron identificadas utilizando el programa Plant Virus Detection Pipeline (PVDP) (Gutiérrez et al., 2021). Los

genomas de los virus identificados fueron ensamblados utilizando el programa Magic-BLAST (Boratyn et al., 2019) y confirmados mediante ensamblaje *de novo* usando Spades (Bankevich et al., 2012) y el paquete Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2011).

Cuadro 1. Primers utilizados en este estudio para la detección de virus en gulupa

Virus	Primers	Secuencia	Región amplificada	Fuente
PFYMV	Tymo_F_CP	5' AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG 3'	CP	Jaramillo et al. (2019)
	qTymo_R_CP	5' GCG ACG AGA GAG GTG AGT CG 3'		
SMV	SMV_qRT-F	5' CAGATGGGCGTGGTTATGA 3'	CP	Gao et al. (2015)
	SMV_qRT-R	5' ACA ATG GGT TTC AGC GGA TA 3'		
CMV	CMV-R	5' CGA CTT CAA CAG GCG AGC 3'	3A	Xanthis et al. (2015) Feng et al. (2006)
	CMVdo1244b	5' TGC TCR AYG TCR ACA TGA AG 3'	CP	
	CMV_qRT_R	5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3'	CP	
CABMV	CABMV_F	5' CGC TCA AAC CCA TTG TAG AA 3'	CP	Gillaspie et al. (2001)
	CABMV_R	5' TAT TGC TTC CCT TGC TCT TTC 3'		
Badnavirus	GBVA_RT_F	5' GCA AAA GCA GAC ACC GAA CC 3'	RT	Sepúlveda (2020)
	GBVA_RT_R	5' TGT ATC TCT GCG TCT ATG GTG G 3'		
Begomovirus (Componente A)	PAL1v1978	5' GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT YCC NGT 3'	AL1	Rojas et al. (1993)
	PAR1c496	5' AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG 3'	AR1	
Begomovirus (Componente B)	PVL1v2040	5' GCC TCT GCA GCA RTG RTC RAT CTT CAT ACA 3'	BL1	Rojas et al. (1993)
	PCRc1	5' CTA GCT GCA GCA TAT TTA CRA RWA TGC CA 3'	CR	

En Magic-BLAST, las secuencias fueron mapeadas en formato fastq (-informat fastq) con la opción de mapeo de transcriptomas (-reftype transcriptome) y puntaje mínimo de 85 (-score = 85); para el ensamblaje *de novo* se utilizó el ejecutable rnapades.py utilizando los parámetros por defecto; solo los ensamblajes de alta calidad (hard_filtered_transcripts) fueron usados para análisis posteriores. Las secuencias consenso fueron registradas con ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) y BLASTX (Gish y States, 1993). Los análisis filogenéticos fueron realizados por el método Neighbor-Joining utilizando las secuencias de nucleótidos para cada genoma con mil réplicas de *bootstrap* utilizando el programa MEGAX (Kumar et al., 2018). El alineamiento de secuencias fue realizado con MUSCLE (Edgar, 2004) y las distancias calculadas con el método de Tamura-Nei con una distribución Gamma, estimada individualmente para cada conjunto de datos mediante el método de máxima

verosimilitud. El modelo Tamura-Nei fue seleccionado mediante el criterio de infomación de Akaike utilizando la opción Find Best DNA/Protein Models de MEGAX. La cobertura y profundidad a lo largo de las secuencias de los genomas fueron obtenidas con IGV y graficadas utilizando el paquete de Python Seaborn (<https://seaborn.pydata.org/>). La obtención de los genomas completos de PFYMV y SMV se logró por análisis bioinformáticos: para el tymovirus PFYMV, el ensamblaje contiene las secuencias de control esperadas en las regiones 5' (HP1 y HP2) y 3' (ARNt-val) de estos virus, lo que confirma el ensamblaje completo del genoma; en el caso de SMV el ensamblaje incluye los potyboxes A y B en la región 5' y este genoma al ser de un potyvirus incluye secuencias de Poly-A en el extremo 3'; para el badnavirus GBVA, éste tiene un genoma circular.

Las secuencias para los genomas completos de PFYMV y SMV fueron depositadas en GenBank con los números de acceso: MW655828 y

MW655827, respectivamente. La secuencia del genoma del badnavirus GBVA fue obtenida previa amplificación por RCA (*Rolling Circle Amplification*) a partir del ADN procedente del grupo de muestras SI de gulupa, usando la enzima phi29 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado de RCA fue utilizado como molde para la amplificación por PCR con los primers específicos GBVA_RT_F/R para confirmar su naturaleza viral, seguido por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y tinción con GelRed 1X (Biotium). Finalmente, el producto de RCA también fue utilizado para su secuenciación HTS usando un equipo Novaseq con el kit Truseq DNA Library en la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas para los tres genomas completos de GBVA fueron depositadas en GenBank con los números de accesión: MW655829, MW655830 y MW655831.

RESULTADOS

RT-qPCR y PCR. En las evaluaciones individuales realizadas mediante RT-qPCR y PCR en las muestras foliares obtenidas de muestras SI se detectaron tres (SMV, CMV y PFYMV) de los cuatro virus de ARN evaluados, además del badnavirus GBVA, con valores de prevalencia de 33,3 %, 13,3 % y 33,3 % y 26,6 % para SMV, CMV, PFYMV y GBVA, respectivamente. Estos mismos virus se encontraron en las muestras de las plantas AS y con excepción del PFYMV, que se detectó en el 46,6% de estas muestras, los niveles de prevalencia fueron inferiores (SMV= 20 %, CMV=6, 6 % y GBVA=20 %) a los encontrados en las muestras SI (Figura 2A).

Estos cuatro virus también fueron hallados en niveles muy altos de prevalencia en los BS derivados de semillas de gulupa, alcanzándose valores de 40 % para SMV, 13,3 % para CMV, 86,6 % para PFYMV y 53,3 % para GBVA; mientras que, en plántulas, no se encontró infección por CMV, pero sí por SMV (86,6%), PFYMV (60 %) y GBVA (53,3 %). En ninguna de las muestras incluidas en el estudio se detectó el potyvirus CABMV.

La naturaleza de los amplicones obtenidos en las reacciones de RT-qPCR se evaluó inicialmente por comparación de los valores de Tm con los

previamente reportados para dichos virus de ARN en Colombia por Jaramillo et al. (2018; 2019) y Sepúlveda (2020), siendo el SMV, CMV y PFYMV detectados con valores promedio de Tm de 81,07 °C (SD=0,49), 81,82 °C (SD=0,48) y 84,7 °C (SD=0,76), respectivamente (Figura 2B).

Los valores de Ct para las muestras que resultaron positivas para los tres virus en plántulas y en BS se ubicaron en su mayoría alrededor del ciclo 30, mientras que en las muestras de plantas en producción estos valores generalmente se ubicaron entre los ciclos 20 y 30, con casos excepcionales como la detección en dos muestras SI del PFYMV y SMV en los ciclos 10,6 y 12,6, respectivamente (Figura 2C). Adicionalmente, para los tres virus de ARN y para el badnavirus GBVA se purificaron y secuenciaron tres amplicones por el método de Sanger, confirmándose su identidad por comparación con GenBank.

Para el caso de SMV, las accesiones con mayores niveles de identidad correspondieron a KY249378, KY249377 y KY249373 (identidad= 96,88%; valor $e = 2e^{-33}$, cobertura 100 %) previamente depositadas por Jaramillo et al. (2018) a partir de aislamientos de SMV infectando gulupa en el suroeste de Antioquia (Colombia).

Las secuencias del CMV presentaron el 100% de identidad con respecto a la accesión MG200270 (valor $e = 8e^{-05}$) depositada en GenBank a partir de aislamientos de CMV infectando *Cymbidium* sp. en Corea del Sur y del 96,55 % (valor $e = 0,004$) con la accesión MN422335 correspondiente a un aislamiento de CMV obtenido en *Capsicum annuum* en China. Las secuencias de PFYMV fueron 100 % idénticas (valor $e = 9e^{-14}$) a las accesiones KY823435, KY823435 y KY823435 de este virus depositadas por Jaramillo et al. (2019) a partir de muestras foliares de gulupa obtenidas en el oriente de Antioquia.

Las secuencias obtenidas a partir de los amplicones de 979 pb obtenidos por PCR convencional para GBVA presentaron niveles de identidad del 72,21 % (valor $e = 6e^{-98}$) con respecto a la accesión KJ413252 del badnavirus Blackberry virus F y del 71,43 % (valor $e = 2e^{-85}$) con la accesión JF911400 del Banana streak UA virus. Al realizar un alineamiento directo con las secuencias de esta región de RT+RNAsa H del GBVA reportadas por Sepúlveda (2020) en el reporte de esta nueva especie, el valor de identidad fue superior a 99,1 %.

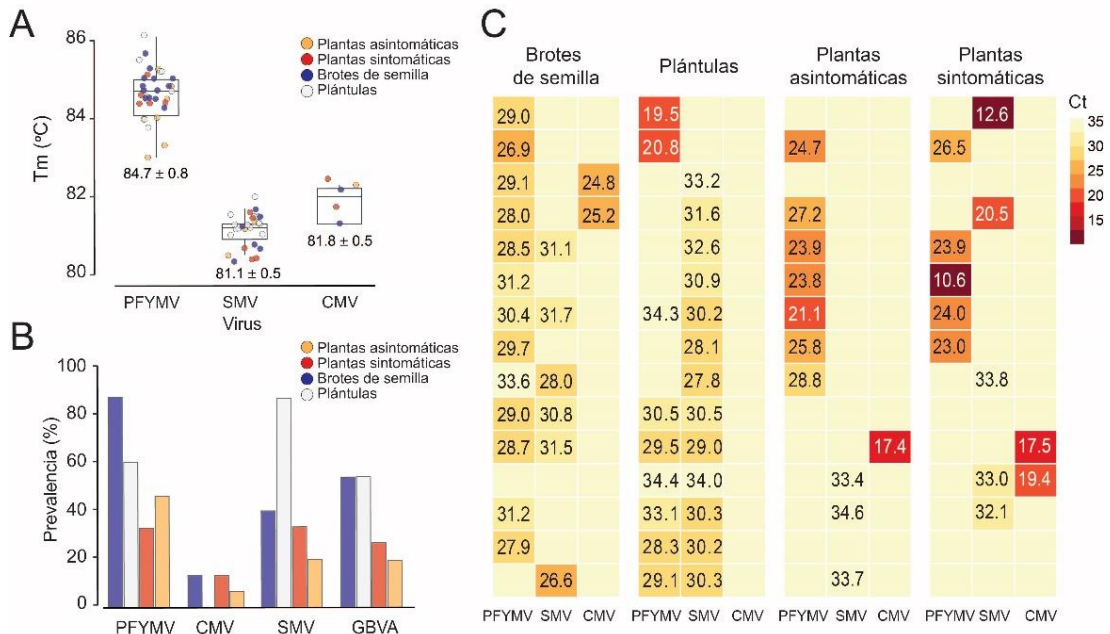


Figura 2. Resultados de la detección molecular de virus en muestras de gulupa utilizando RT-qPCR y PCR convencional. Valores de Ct (A) y T_m (B) para los tres virus de ARN detectados mediante RT-qPCR. (C) Porcentajes de prevalencia viral en cada tipo de muestra de gulupa evaluada

Secuenciación masiva y análisis bioinformáticos.

La secuenciación HTS de los grupos de muestras SI y AS, generó un total de 30.265.602 de *reads* pareados de 101 nt; mientras que para las plántulas y BS estos valores alcanzaron 42.003.192 y 62.157.352 de *reads* pareados, respectivamente (Figura 3). Para facilitar los análisis bioinformáticos, los tres grupos de datos fueron analizados con respecto a la diversidad de secuencias determinadas por el conteo de secuencias únicas y sus abundancias respectivas. En el grupo de datos procedente de las muestras de plantas en producción, los datos correspondientes a secuencias únicas fueron 4.363.349 *reads* (85,6 % de redundancia), en plántulas éstas fueron de 8.576.952 *reads* (79,6 % de redundancia) y en BS de 10.852.210 (82,5 % de redundancia). De estos *reads*, 13,25 % (SI+AS), 1,95 % (PL) y 1,81 % (BS) compartieron niveles significativos de similaridad con respecto a secuencias de virus (Figura 3).

Para el caso de las muestras obtenidas en las plántulas (BPE16) y en BS (BPE15) de gulupa, sólo se encontraron secuencias virales asociadas al badnavirus GBVA, con niveles de abundancia de 21 RPM (881 *reads*) y 20,1 RPM (1.250 *reads*),

respectivamente (Figura 3A, B). Por el contrario, para el grupo de datos SI+AS (BPE89) los virus fueron más abundantes y se encontraron niveles de 123.828,8; 2844,7 y 284,2 *reads* por millón (RPM) para PFYMV (3.747.752 *reads*), SMV (86.097) y el GBVA (8.601 *reads*), respectivamente (Figura 3C).

El genoma completo del PFYMV presentó 6.088 nt (aislamiento PFYMV_BPE89) y se identificaron los tres ORF que codifican para una poliproteína de 1.768 aa y 197,9 kDa asociada con la replicación (ORF1), una proteína de movimiento de 617 aa y 68,6 kDa (ORF2) y para la cápside viral de 193 aa y 19,8 kDa (ORF3). La poliproteína es clivada por una cistein-proteasa viral para dar origen a una metil-transferasa (MT), proteasa (PRO), helicasa (HEL) y para la RdRP. También se identificó en el extremo 5' las secuencias conservadas HP1 (posiciones 33-63) y HP2 (posiciones 75-98) que forman una horquilla (*hairpin loop*) asociada con el empaquetamiento del genoma viral y en el extremo 3' se ubicó el motivo de ARNt-val, así como la secuencia "Tymobox" en las posiciones 5.383-5.404 que actúa como una secuencia promotora para la síntesis de ARN subgenómico (ARNsg) del ORF3

(Figura 4A). La secuencia del PFYMV_BPE89 compartió un 99,7 % de identidad a nivel de nucleótidos con el aislamiento PFYMV_Antioquia, única secuencia completa hasta ahora reportada en GenBank para el genoma de este virus (Figura 4B). Ambos aislamientos difirieron en 17 nt, mientras que con las secuencias encontradas por Sepúlveda (2020) en muestras de gulupa asintomáticas de Antioquia (BPE4 y BPE6), dichos valores fueron del 96,1 % (Figura 4B). El análisis filogenético ubicó a los cuatro aislamientos de PFYMV en un subclado que hace parte del grupo que incluye a la especie tipo del género *Tymovirus* (Turnip yellow mosaic virus-TYMV), además del *Asclepias asymptomatic virus* (AsAV), *Okra mosaic virus* (OMV) y *Kennedy yellow mottle virus* (KYMV) (Figura 4C).

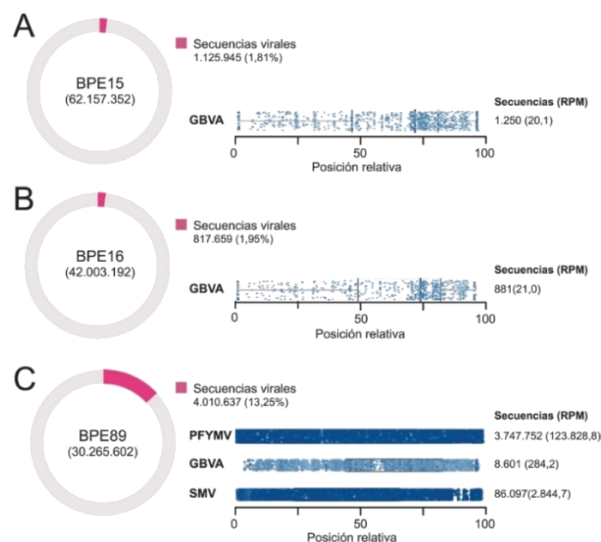


Figura 3. Detección de genomas de virus mediante HTS en gulupa. Gráficas circulares representan la proporción de secuencias virales en cada grupo de datos para los BS (A), plántulas (B) y muestras sintomáticas y asintomáticas (C). Gráficas de barras muestran la ubicación de *reads* para cada genoma. La intensidad del color indica el porcentaje de identidad respecto a secuencias de genomas de referencia y su distribución indica la profundidad a lo largo del genoma viral. BPE15: *bulk* de BS; BPE16: *bulk* de plántulas; BPE89: *bulk* de muestras sintomáticas y asintomáticas. Porcentajes entre paréntesis indican proporción de *reads* de origen viral

El ensamblaje del genoma del SMV (aislamiento SMV_BPE89) tuvo un tamaño de 9.608 nt (excluyendo la cola de poli-A) y un ORF que codifica para una poliproteína de 3.065 aa y 349,3 kDa; también se identificó el ORF interno (posiciones 2.424 a 3.103) denominado N3-PIPO que codifica para una proteína putativa de 227 aa y 26,4 kDa (Figura 5A). Entre las posiciones 17-28 de la región 5' del genoma se ubicó el motivo conservado Potybox A (TAAAGACAACAA), mientras que una variación del motivo Potybox B (TCTACAAG) se identificó 39 nt más adelante (Figura 5A). Una comparación del genoma completo del aislamiento SMV_BPE89 con respecto al aislamiento SMV_Gulupa (KY249378) reportado por Jaramillo et al. (2018) demostró que comparten un 98,7 % de identidad, mientras que dicho valor fue del 97,9 % con la accesión MN124783 (aislamiento SMV/BSB1) obtenida a partir de la infección de *Passiflora* sp. en Brasil y del 97,4 % con el aislamiento WS109 procedente de soja (FJ640959) (Figura 5B). El análisis filogenético agrupó al SMV_BPE89 con los otros dos aislamientos obtenidos en pasifloráceas en un subclado claramente separado de los aislamientos procedentes de soja (Figura 5C).

La secuenciación HTS del ADN derivado de RCA, permitió el ensamblaje del genoma del GBVA de 6.951 pb, con dos ORF que codifican para las proteínas P2 y P3, tal como lo reportó recientemente Sepúlveda (2020). En este caso, nuevamente no se encontró el ORF1 que se presenta en la mayoría de especies de badnavirus. El ORF 2 se ubicó entre las posiciones 257-664 y codifica para una proteína de 135 aa (15,5 kDa) cuya función se desconoce en la actualidad. El ORF 3 se identificó entre las posiciones 661-6.456 nt, y se predice que traduce para una poliproteína de 1.931 aa (222,1 kDa) (Figura 6). Además de estas regiones, se identificó la región que codifica para el ARNt-Met que define el inicio del genoma viral (5'-TGGTAGCGAAGCAAGGTTCA-3'), la caja TATA (5'-TATATAA-3') y una señal de poliadenilación (5'-AATAAA-3') entre las posiciones 6.520-6.525 (Figura 6).

Comparaciones realizadas entre los tres genomas de GBVA obtenidos en el presente estudio (BPE15, BPE16 y BPE89) con el genoma del aislamiento MW393830, indicaron que éstos comparten más del 99 % de identidad a nivel de la secuencia de nucleótidos. El análisis filogenético

con dichas secuencias agrupó a estos cuatro aislamientos de GBVA en un único subclado que hace parte del Grupo 3 de los badnavirus y cuyas

especies más cercanas fueron Jujube mosaic-associated virus (JuMaV) y Taro bacilliform virus (TaBV) (Figura 6).

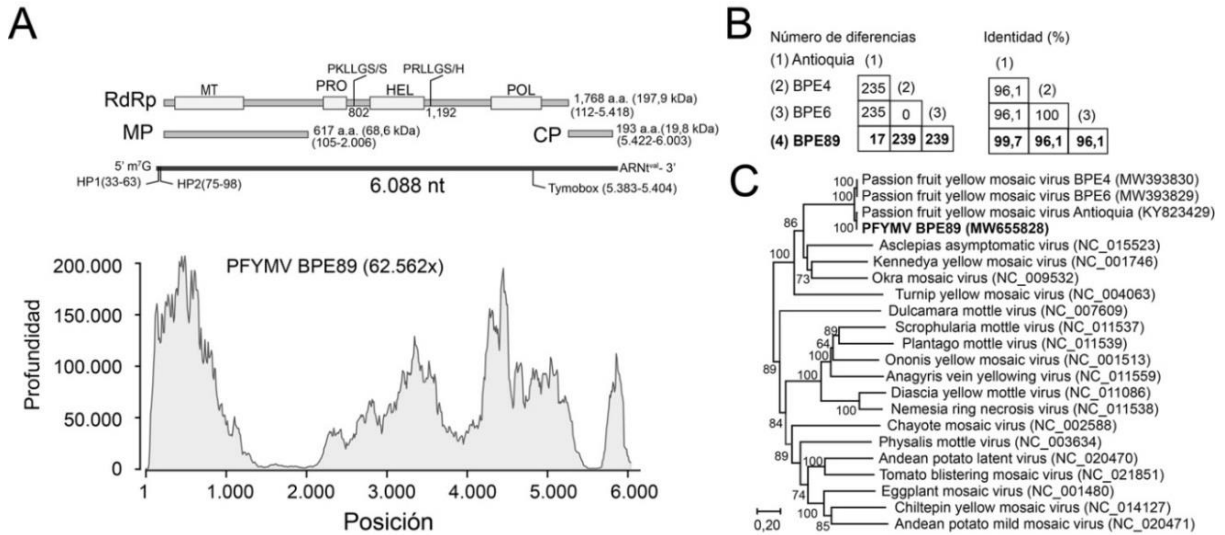


Figura 4. (A) Diagrama del genoma de PFYMV obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa. (A) Se presenta la ubicación de cada ORF y de secuencias representativas en los genomas de tymovirus, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Matriz de diferencias y porcentaje de identidad de nucleótidos para diferentes aislamientos de PFYMV obtenidos en gulupa. (C) Árbol filogenético generado a partir de secuencias completas del genoma viral de diferentes tymovirus. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap* y en letra negra se indica el aislamiento aquí secuenciado

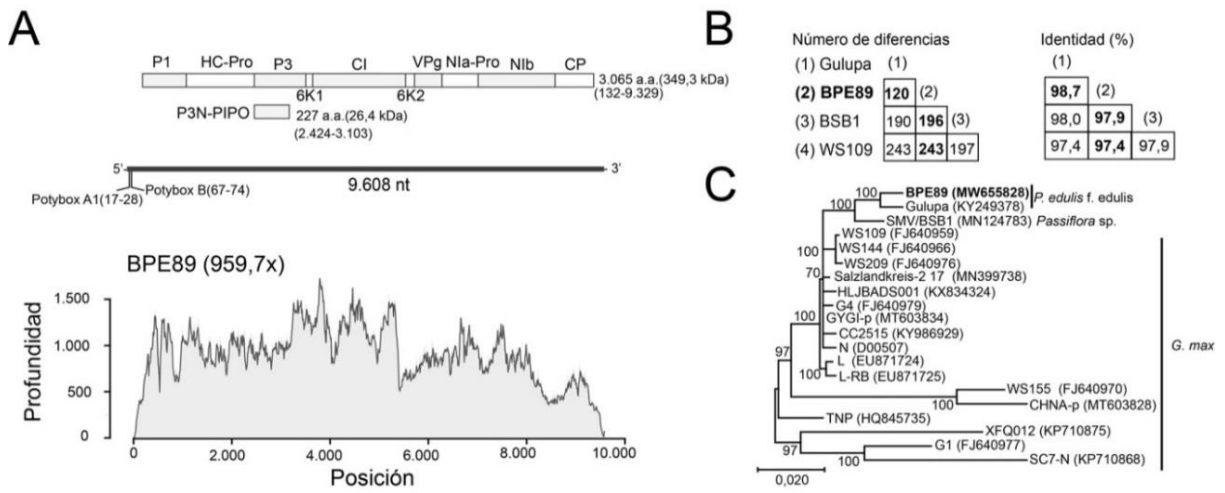


Figura 5. (A) Diagrama del genoma de SMV obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa. (A) Se presenta la ubicación de cada ORF y de secuencias representativas de los genomas de potyvirus, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Matriz de diferencias y porcentaje de identidad de nucleótidos para diferentes aislamientos de SMV obtenidos en gulupa (BSB1, Gulupa) y en soya (WS109). (C) Árbol filogenético generado a partir de secuencias completas del genoma viral de diferentes aislamientos de SMV en passifloras y soya. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap* y en letras negras se indica el aislamiento aquí secuenciado

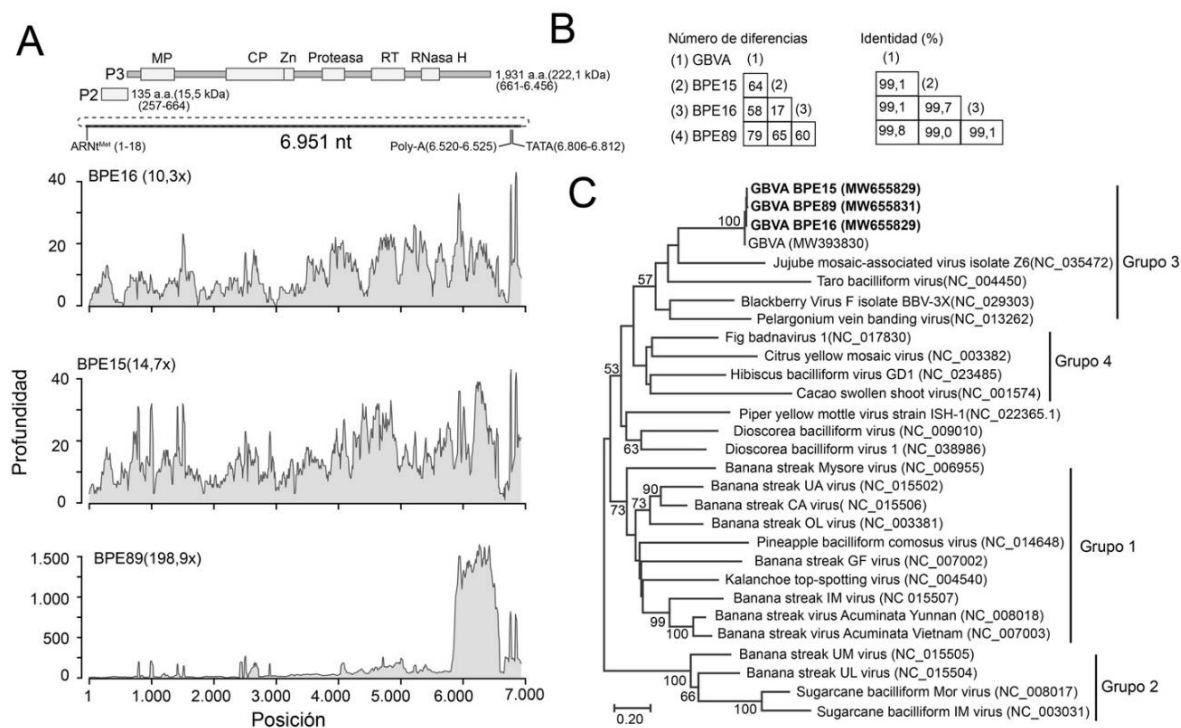


Figura 6. (A) Diagrama del genoma de GBVA obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa (BPE89), así como de plántulas (BPE16) y semillas (BPE15). (A) Se presenta la ubicación de cada ORF y de secuencias representativas de los genomas de badnavirus, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Matriz de diferencias y porcentaje de identidad de nucleótidos para diferentes aislamientos de GBVA. (C) Árbol filogenético generado a partir de secuencias completas del genoma viral de diferentes badnavirus. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap* y en letras negrillas se indican los aislamientos secuenciados en Colombia

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la prevalencia de los virus: SMV, CMV, CABMV, PFYMV, GBVA y de especies de begomovirus en plantas y semillas de gulupa en Antioquia (Colombia). Los resultados de las pruebas de RT-qPCR indicaron la infección de los virus de ARN: SMV (SI =33,3 % y AS=20 %), CMV (SI=13,3 % y AS=6,6 %) y PFYMV (SI=26,6 % y AS=46,6 %) tanto en material con síntomas asociados (SI) a enfermedades virales como en aquellas muestras asintomáticas (AS); mientras que el badnavirus GBVA se detectó con pruebas de PCR en niveles del 26,6 % y 20 %, respectivamente. Estos valores de prevalencia resultan muy preocupantes para los programas de expansión del cultivo de gulupa en esta región, pues indican el establecimiento del potyvirus SMV en el oriente de Antioquia, en donde hasta hace pocos años su presencia no se

había reportado.

Considerando que los efectos de la infección del SMV resultan devastadores para la producción comercial de este frutal, tal como se ha observado en la subregión del suroeste de Antioquia, en donde la prevalencia del virus supera el 60 % y se reporta el abandono y/o el desplazamiento de muchos cultivos a otras zonas por efecto de esta enfermedad viral, es necesario evitar la dispersión de este virus en el oriente de Antioquia. Por su parte, la detección del PFYMV en niveles de prevalencia tan altos como el 46,6 % en muestras AS, no resulta sorprendente, pues Jaramillo et al. (2019) habían demostrado que este virus se presenta de manera generalizada en esta zona de Antioquia; aunque hasta el momento se desconocen sus efectos individuales sobre la longevidad de los cultivos, calidad de los frutos o disminución en los rendimientos de este frutal.

El PFYMV fue inicialmente reportado en

cultivos de maracuyá en el estado de Río de Janeiro (Brasil) con síntomas de mosaicos amarillos, deformación foliar y amarillamiento de venas (Crestani et al., 1986) y posteriormente registrado en plantaciones de este mismo hospedante en diferentes departamentos de Colombia (Morales et al., 2002). La confirmación que se realiza en el presente estudio de su alta prevalencia en cultivos de gulupa en Antioquia reafirma la necesidad de emprender evaluaciones biológicas que conduzcan a determinar con detalle sus efectos sobre la producción de gulupa.

Para el caso del cucumovirus CMV, aunque sus niveles de prevalencia fueron inferiores al 13,3 % en plantas en producción, su detección en este estudio representa el primer registro formal de este virus sobre gulupa en Antioquia. La susceptibilidad de *P. edulis* a este cucumovirus ha sido reportada desde hace varias décadas (Kitajima, 2020) e incluso se ha postulado que su infección mixta con el CABMV induce mayores niveles de enfermedad en maracuyá, especialmente en lo referente al síntoma específico de endurecimiento de los frutos (Colariccio et al., 2018).

La detección del GBVA tanto en muestras sintomáticas como asintomáticas de gulupa, confirma la ocurrencia de esta nueva especie de badnavirus en este cultivo en Colombia y plantea la necesidad de evaluar su importancia económica, métodos de transmisión y niveles de variación intraespecífica con premura. La posibilidad de que este virus se integre en el genoma del hospedante fue planteada por Sepúlveda (2020), por lo que dicha hipótesis requiere ser evaluada con prontitud, ya que esto representaría un gran reto para la generación de plantas certificadas de gulupa derivadas de cultivo *in vitro*, tal como ocurre en algunas variedades de musáceas con la problemática derivada de la integración del Banana streak virus (BSV) (Bhat et al., 2016).

Por su parte, la detección de estos cuatro virus en brotes derivados de semillas sexuales (BS) con valores que alcanzaron niveles de hasta el 86,6 % para PFYMV, 53,3 % para GBVA, 40 % para SMV y 13,3 % para CMV conducen a plantear la hipótesis que la transmisión vertical de dichos virus juega un papel fundamental en la epidemiología de las enfermedades que causan éstos en el cultivo de gulupa, y que por tanto la generación de semilla certificada por su sanidad

viral, resulta en una tarea prioritaria para la producción tecnificada de este frutal. Trabajos previos habían encontrado altos valores de prevalencia del SMV en semillas de gulupa (95 %) (Jaramillo et al., 2018). Así mismo, la detección en semillas del PFYMV con tan altos niveles de prevalencia, plantea la posibilidad de que también dicho virus presente transmisión vertical en gulupa, una situación que no sería excepcional por cuanto la transmisión por semilla se ha documentado para diferentes tymovirus (King, 2012).

Una situación similar ocurre con el CMV, pues se ha encontrado su transmisión por semilla en cultivos tan diversos como frijol, pimentón o espinaca (Ali y Kobayashi, 2010). Finalmente, la detección del GBVA en 53,3 % de semillas de gulupa plantea su transmisión vertical, tal como se ha reportado para otros badnavirus como el Cacao swollen shoot virus (CSSV) y Taro bacilliform virus (TaBV) (Bhai et al., 2016).

Este trabajo fue complementado con el uso de HTS para obtener información sobre los genomas de los virus más prevalentes en gulupa en el Oriente de Antioquia, lográndose ensamblar los genomas completos del SMV (9.608 nt), PFYMV (6.088 nt) y GBVA (6.951 nt). Al realizar comparaciones con las secuencias previamente reportadas para estos virus, se encontró que las secuencias consenso, es decir, las secuencias mayoritarias a partir de las cuales se definen los niveles de variación con respecto a otros genomas disponibles en GenBank, compartían niveles superiores al 97 % con respecto a los genomas de aislamientos obtenidos en Antioquia. Lo anterior indica que, aunque se presenten diferencias en algunos sitios, estos genomas son altamente similares a los previamente reportados en Colombia para dichos virus, y permite afianzar la información disponible para el diseño de pruebas específicas de detección molecular al servicio del sector fruticultor del país. El hallazgo de estos virus en cultivos de gulupa de Colombia, hace parte de las más de 20 especies de virus que se han encontrado en el mundo infectando *P. edulis* (Kitajima, 2020; Liberato y Zerbini, 2020), y la confirmación de las secuencias de sus genomas se une al número creciente de virus caracterizados a partir de HTS y otras técnicas moleculares, tal como el Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) (*Polerovirus*, *Luteoviridae*) asociado a

infecciones mixtas con el CABMV sobre maracuyá en Bahía (Brasil) (Vidal et al., 2018); el Passion fruit chlorotic mottle virus (PCMoV) y Melochia yellow mosaic virus (MeYMV) (*Begomovirus*, *Geminiviridae*) descubiertos en Mato Grosso do Sul (Brasil) (Fontenele et al., 2018; Spadotti et al., 2019), el Passion fruit leaf distortion virus (PLDV) (*Begomovirus*, *Geminiviridae*) encontrado en cultivos de maracuyá del Valle del Cauca (Colombia) (Vaca et al., 2017) y el Passiflora edulis symptomless virus (PeSV) (*Roymovirus*, *Potyviridae*) en Israel (Jover et al., 2018).

La información generada en este trabajo y en otros estudios recientes adelantados sobre los virus que infectan gulupa en Colombia, plantean la necesidad de establecer programas de manejo integrado de enfermedades virales apoyados en la utilización de métodos de diagnóstico molecular como los aquí descritos y en los que la generación de semilla certificada y la limitación al movimiento de plántulas y semilla entre regiones de cultivo debe ser pilares fundamentales.

CONCLUSIONES

Mediante pruebas moleculares de RT-qPCR se detectó la infección de los virus de ARN: SMV, CMV y PFYMV en plantas asintomáticas y sintomáticas de gulupa obtenidas en el oriente de Antioquia (Colombia) con niveles superiores al 20 % para el SMV y PFYMV. Así mismo, utilizando PCR convencional se encontró la nueva especie de badnavirus GBVA en dichas muestras, con niveles de prevalencia del 26,6 % y 20 % para el material sintomático y asintomático de gulupa, respectivamente.

En evaluaciones realizadas en materiales de siembra de gulupa (plántulas y brotes de semillas sexuales) comercializados en el oriente de Antioquia se detectó la infección de los virus SMV, PFYMV y GBVA en muy altos niveles de prevalencia, lo que puede ser un indicativo de que dichos materiales juegan un papel importante en la transmisión de estos virus en este frutal.

Utilizando secuenciación HTS de grupos de muestras de tejidos foliares de gulupa, se obtuvieron las secuencias completas de los virus SMV, PFYMV y GBVA, confirmándose que sus genotipos presentan altos niveles de identidad (mayores al 97 %) con respecto a las secuencias

de aislamientos colombianos previamente depositadas en GenBank.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías del Departamento de Antioquia (Proyecto 1101-805-62786, Convenio No. 4600007658-779). El proyecto fue supervisado por SADRA y MinCiencias. Las muestras biológicas fueron obtenidas bajo la Resolución 0209 del 9/03/2020 de Minambiente de Colombia.

LITERATURA CITADA

1. Agronet. 2020. Área, producción y rendimiento de gulupa en Colombia. <https://n9.cl/dhvg> (consulta noviembre 15, 2021).
2. Ali, A. y M. Kobayashi. 2010. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods* 163(2): 234-237.
3. Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov et al. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455-477.
4. Bhat, A.I., T. Hohn y R. Selvarajan. 2016. Badnaviruses: The current global scenario. *Viruses* 8(6): 177.
5. Boratyn, G.M., D. Thierry-Mieg, B. Busby y T.L. Madden. 2019. Magic-BLAST, an accurate DNA and RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics* 20: 405.
6. Chomczynski, P. y N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-159.
7. Colariccio, A., R.M. Garcêz, L.K. Rodrigues, M. Eiras, L.A.M. Peruch y A.L.R. Chaves. 2018. Doenças causadas por vírus na cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis*). In: Peruch, L.A.M. y A.L. Schroeder (eds.). *Maracujazeiro-azedo: polinização, pragas e*

- doenças. EPAGRI. Florianópolis. pp.171-202.
8. Crestani, O.A., E.W. Kitajima, M.T. Lin y V.L.A. Marinho. 1986. Passion fruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathology* 76: 951-955.
 9. Doyle, J. 1991. DNA Protocols for Plants. *In*: Hewitt, G.M., A.W.B. Johnston y J.P.W. Young (eds.). *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer. Heidelberg. pp. 283-293.
 10. Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.
 11. Feng, J.L., S.N. Chen, X.S. Tang, X.F. Ding, Z.Y. Du y J.S. Chen. 2006. Quantitative determination of cucumber mosaic virus genome RNAs in virions by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38(10): 669-676.
 12. Fontenele, R.S., R.A. Abreu, N.S. Lamas, D.M.T. Alves-Freitas, A.H. Vidal, R.R. Poppiel et al. 2018. Passion fruit chlorotic mottle virus: molecular characterization of a new divergent geminivirus in Brazil. *Viruses* 10(4): E169.
 13. Gao, L., X. Ding, K. Li, W. Liao, Y. Zhong, R. Ren et al. 2015. Characterization of Soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 128: 1489-1505.
 14. Gillaspie, A.G., G. Pio-Ribeiro, G.P. Andrade y H.R. Pappu. 2001. RT-PCR detection of seedborne Cowpea aphid-borne mosaic virus in peanut. *Plant Disease* 85: 1181-1182.
 15. Gish, W. y D.J. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3(3): 266-272.
 16. Gutiérrez, P., A. Rivillas, D. Tejada, S. Giraldo, A. Restrepo, M. Ospina, S. Cadavid, Y. Gallo y M. Marín. 2021. PVDP: A portable open source pipeline for detection of plant viruses in RNAseq data. A case study on potato viruses in Antioquia (Colombia). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 113: 101604.
 17. Jaramillo, H., M. Marín y P. Gutiérrez P. 2018. Molecular characterization of Soybean mosaic virus (SMV) infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia, Colombia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 51(11-12): 617-636.
 18. Jaramillo, H., M. Marín y P. Gutiérrez. 2019. Complete genome sequence of a passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 72(1): 8643-8654.
 19. Joy, P.P. y C.G. Sherin. 2016. Diseases of passion fruit (*Passiflora edulis*) and their management. *In*: Kumar, A. y P. Mall (eds.). *Insect Pests Management of Fruit Crops*. Biotech. New Delhi. pp. 453-470.
 20. Joshi, N.A. y J.N. Fass. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. (version 1.33). <https://github.com/najoshi/sickle> (consulta de marzo 20, 2021).
 21. Jover-Gil, S., A. Beeri, P. Fresnillo, A. Samach y H. Candela. 2018. Complete genome sequence of a novel virus, classifiable within the Potyviridae family, which infects passion fruit (*Passiflora edulis*). *Archives of Virology* 163(11): 3191-3194.
 22. Kitajima. 2020. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). *Biota Neotropica* 20(2): e20190932.
 23. King, A.M.Q. 2012. *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego.
 24. Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz y K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549.
 25. Liberato, J.R. y F.M. Zerbini. 2020. Diseases of Passionfruit (*Passiflora* spp.). <https://n9.cl/n12e9> (consulta de septiembre 18, 2020).
 26. Melgarejo, L.M. 2019. Gulupa (*Passiflora edulis*), curuba (*Passiflora tripartita*), aguacate (*Persea americana*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) Innovaciones. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <https://n9.cl/2s1v6> (consulta de julio 21,

- 2021).
27. Morales, F.J., I. Lozano, M. Castaño, J. Arroyave, A.C. Velasco y F. Varón. 2002. Partial characterization of a tymovirus infecting passion fruit in Colombia, South America. *Journal of Phytopathology* 150(4-5): 292-296.
 28. Ortíz, E. y L. Hoyos. 2012. Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 6(1): 110-116.
 29. Robinson, J.T., H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E.S. Lander, G. Getz y J.P. Mesirov. 2011. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* 29(1): 24-26.
 30. Rojas, M.R., R.L. Giltberson, D.R. Rusell y D.P. Mawell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77(4): 340-347.
 31. Sepúlveda, M. 2020. Identificación molecular de virus que infectan gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en cultivos asintomáticos y material de siembra en Antioquia. Tesis Ingeniería Biológica. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 26 p.
 32. Sierra-Mejía, A., Y. Gallo-García, M. Estrada-Arteaga, P.A. Gutiérrez y M. Marín-Montoya. 2020. Detección molecular de seis virus de ARN en brotes de tubérculos de papa criolla (*Solanum phureja*) en Antioquia, Colombia. *Bioagro* 32(1): 3-14
 33. Spadotti, D.M.A., V.H. Bello, G.M. Favara, O.S. Stangarlin, R. Krause-Sakate, J.A.M. Rezende. 2019. *Passiflora edulis*: new natural host of Melochia yellow mosaic virus in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 14: 23.
 34. Vaca-Vaca, J.C., E.C. Carrasco-Lozano y K. López-López. 2017. Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. *Archives of Virology* 162(2): 573-576.
 35. Valverde, R., S. Nameth y R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.
 36. Vidal, A.H., M.M. Sanches, D.M. Alves-Freitas, E.F. Abreu, C. Lacorte, B. Pinheiro-Lima et al. 2018. First World Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus infecting Passionfruit. *Plant Disease* 102(12): 2665.
 37. Xanthis, C.K., V.I. Maliogka, H. Lecoq, C. Dezbiez, I. Tsvetkov, N.I. Katis. 2015. First report of cucumber mosaic virus infecting watermelon in Greece and Bulgaria. *Journal of Plant Pathology* 97(2): 391-403.

