

DETECCIÓN DEL *POTATO VIRUS Y* (PVY) EN TUBÉRCULOS DE PAPA MEDIANTE TAS-ELISA Y QRT-PCR EN ANTIOQUIA (COLOMBIA)

Héctor Camilo Medina Cárdenas¹, Pablo Andrés Gutiérrez Sánchez¹ y Mauricio Marín Montoya¹

RESUMEN

El PVY es uno de los problemas virales más incidentes y limitantes para la producción de papa en Colombia y otros países. Es transmitido por áfidos y por tubérculo-semilla, lo que genera un proceso de acumulación de virus y disminución progresiva de rendimientos cuando no se utiliza semilla certificada. En este trabajo se determinó la presencia y distribución de PVY en tubérculos de *Solanum tuberosum* variedad Diacol-Capiro y *S. phureja* variedad Criolla-Colombia obtenidos en Antioquia (Colombia), utilizando TAS-ELISA y qRT-PCR. Se evaluaron 16 muestras de cada variedad y cuatro tipos de tejido (cáscara, yemas, ápice y base de brotes) y se compararon los niveles de detección alcanzados por ambas técnicas. Cuando se utilizó qRT-PCR se encontró PVY en 100 % de los tubérculos de Diacol-Capiro y en 66,6 % de Criolla-Colombia; mientras que mediante TAS-ELISA este valor fue de 75 % para Diacol-Capiro y no se detectó el virus en ninguna muestra de Criolla-Colombia. Al evaluar los ciclos umbral (Ct) obtenidos por qRT-PCR, fue evidente que dichas diferencias se debían principalmente al bajo título viral alcanzado en Criolla-Colombia (Ct promedio=32,4) con respecto a Diacol-Capiro (Ct promedio=15,54), lo que imposibilita la detección de PVY por pruebas menos sensibles como TAS-ELISA. Con respecto a la distribución de PVY, se encontró mayor acumulación viral en los ápices de los brotes de ambas variedades (Diacol-Capiro Ct=11,53 y Criolla Colombia Ct=27,52). Estos hallazgos enfatizan la necesidad de utilizar tubérculo-semilla certificado por su sanidad viral en los cultivos de papa y del fortalecimiento de dichos programas a partir del empleo de técnicas de detección viral altamente sensibles como qRT-PCR.

Palabras claves adicionales: Diagnóstico, PCR en tiempo real, Potyvirus, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*

ABSTRACT

Detection of Potato virus Y (PVY) in potato tubers in Antioquia (Colombia) using TAS-ELISA and qRT-PCR

PVY is one of the viruses with highest incidence and severity in potato crops in Colombia and other countries. This virus is transmitted by aphids and tuber seeds and can progressively reduce crop yields due to viral accumulation when non-certified seed is used. In this work, the incidence and distribution of PVY in tubers of *Solanum tuberosum* v. Diacol-Capiro and *S. phureja* v. Criolla-Colombia from Antioquia (Colombia) was evaluated using TAS-ELISA and qRT-PCR. For both varieties, 16 samples from four different tissues (skin, dormant buds, base and tip of sprouts) were used and detection levels were compared for both techniques. With qRT-PCR, PVY was detected in 100 % and 66.6 % of Diacol-Capiro and Criolla-Colombia tubers, respectively. In contrast, TAS-ELISA detected PVY in only 75 % of Diacol-Capiro samples and none of Criolla-Colombia. Low titer values may explain the failure to detect PVY by TAS-ELISA in some samples that tested positive by qRT-PCR in Criolla-Colombia (Ct=32.4) and Diacol-Capiro (Ct=15.54). Distribution analysis revealed that the highest accumulation of PVY was the tip region of sprouts in both varieties (Diacol-Capiro Ct=11.53 and Criolla-Colombia Ct=27.52). These findings demonstrate the need of using certified seed-tubers tested with highly sensitive methods like qRT-PCR.

Additional key words: Diagnostics, Potyvirus, Real-time PCR, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*

INTRODUCCIÓN

El *Potato virus Y* (PVY) es uno de los virus más limitantes para la producción de papa en el mundo, pudiendo causar pérdidas de hasta el 80 % en los rendimientos del cultivo y afectar dramáticamente la calidad de los tubérculos,

cuando se presentan infecciones por cepas necrosantes, tales como PVY^{NTN} y PVY^{Wi} (Baldauf et al., 2006; Kerlan, 2008). Este virus es la especie tipo del género *Potyvirus* (*Potyviridae*) y se caracteriza por presentar partículas filamentosas de aproximadamente 730 nm de longitud, con una molécula de ARN de cadena

Recibido: Febrero 1, 2015

Aceptado: Mayo 29, 2015

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Colombia.

e-mail: hcmedinac@unal.edu.co, paguties@unal.edu.co, mamarinm@unal.edu.co

sencilla de 9700 nucleótidos que presenta una cola de poli-A en el extremo 3' y una proteína VPg unida covalentemente al extremo 5'; se cree que ambas estructuras son fundamentales para la protección del genoma, su replicación y para la regulación génica (Karasev y Gray, 2013). Su genoma se expresa a partir de la traducción de una poliproteína que es procesada por tres proteasas virales (NIa, HC-Pro y P1) para dar origen a 10 proteínas funcionales, incluyendo la cápside de 30kDa (Carrington et al., 1993; Crosslin y Hamlin, 2011).

El PVY tiene un amplio rango de hospederos que incluyen plantas de diferentes géneros de la familia Solanaceae, algunas de las cuales tienen gran importancia económica como la papa, el tomate, el tomate de árbol, el tabaco, el pimentón y la berenjena (Jaramillo et al., 2011; Karasev y Gray, 2013). En papa, este virus causa un amplio rango de síntomas que incluyen mosaicos suaves a severos, rugosidad de hojas, defoliación, enanismo, necrosis foliar y de tubérculos y finalmente reducción en el rendimiento de las plantas (Shubert et al., 2007).

El PVY es altamente variable a nivel biológico y molecular, dadas sus altas tasas de mutación y recombinación genética (Glais et al., 2002; Karasev y Gray, 2013). Históricamente con base en sus reacciones sobre plantas de papa y tabaco, los aislamientos del virus se han dividido en tres razas principales denominadas como: PVY^O (raza ordinaria), PVY^N (raza necrosante) y PVY^C (raza que causa estriados puntiformes) (Singh et al., 2008). Esta última raza, se divide a su vez en dos genotipos principales denominados PVY^{C1} y PVY^{C2} (Blanco-Urgoiti et al., 1998). Posteriormente, se identificó la raza PVY^Z por sus diferencias en patogenicidad sobre un grupo de plantas diferenciales de papa (Singh et al., 2008) y al menos dos variantes del PVY^N, denominadas como PVY^{NTN} y PVY^W (Schubert et al., 2007; Singh et al., 2008). La variante PVY^{NTN} es la más importante desde el punto de vista económico a nivel mundial, pues causa la enfermedad denominada "anillo necrótico del tubérculo" (PTNRD, por sus siglas en inglés) (Glais et al., 2005).

El PVY es transmitido de manera no persistente por al menos 100 especies de áfidos, siendo *Myzus persicae* la más eficiente (Verbeek et al., 2010); así como también por medios

mecánicos y por tubérculos infectados, principal mecanismo de propagación agrícola de la papa (Karasev y Gray, 2013). Es por esto que la siembra de tubérculo-semilla certificado por su sanidad viral, es uno de los principales métodos de manejo de este y otros virus de papa (Kerlan, 2008; Halterman et al., 2012). Usualmente este proceso comienza con la limpieza y propagación del material mediante cultivo de tejidos, generándose posteriormente minitubérculos o esquejes que son propagados en grandes invernaderos bajo condiciones controladas. Los nuevos tubérculos generados, son luego multiplicados en campos de agricultores dedicados a la producción de semilla, siendo vigilados e inspeccionados por agencias gubernamentales de sanidad vegetal (Frost et al., 2013). Así por ejemplo, en Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) se encarga de este proceso y ha establecido diferentes categorías para la semilla de papa dependiendo de la fase de su producción, bien en laboratorio (Super élite y élite) o en campo (básica, registrada y certificada), no siendo permitida la presencia de virus (PVY, PVS, PLRV, PVX) en las categorías de laboratorio, mientras que en aquellas propagadas en campo, se tolera hasta el 1, 2, y 5 % de infección viral, respectivamente. En el mundo es usual que dichos niveles tolerables de infección viral oscilen entre 0,5 y 2 % para lotes destinados a producción comercial de tubérculo-semilla, mientras que aquellos entre 5 y 10 % se consideran inviables para dicha actividad (Halterman et al., 2012).

La definición de los porcentajes de incidencia viral en lotes de semilla se fundamenta en la inspección visual de síntomas foliares en el campo y eventualmente en algunos países o regiones, esto puede estar acompañado de un número limitado de pruebas de ELISA para virus de importancia económica como PVY y PLRV. Sin embargo, dichas metodologías serológicas tienen restricciones de sensibilidad que no permiten la detección de virus en tejidos con bajo título, como los presentes en tubérculos en latencia (Agindotan et al., 2007; Halterman et al., 2012). En contraste, los métodos de detección viral basados en ácidos nucleicos como RT-PCR convencional (Singh y Nie, 2003; Lorenzen et al., 2006) y RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) (Agindotan et al., 2007; Fageria et al., 2013; Singh et al., 2013) son

altamente sensibles, de rápida ejecución y permiten la detección simultánea de diferentes virus cuando se realizan en formatos multiplex (Crosslin y Hamlin, 2011). En los últimos años, para la detección de virus de plantas, incluyendo PVY, se destaca el uso creciente del qRT-PCR dada su eficiencia en tiempo, gran especificidad, altos niveles de sensibilidad y reducción del riesgo de contaminación entre muestras, al no requerir de manipulaciones post-PCR (Mumford et al., 2000; Fageria et al., 2013; Vanegas-Berrouet et al., 2014).

En Colombia, el PVY se ha identificado como uno de los principales virus que afectan los cultivos de papa y otras solanáceas como el tomate de árbol y pimentón en la región Andina (Ayala et al. 2010; Gil et al., 2009, 2011; Villamil-Garzón et al., 2014), presentándose al menos tres variantes principales de PVY en el país (denominadas I-Col, II-Int y IV-Col), dos de las cuales (I-Col y IV-Col) aparentemente son endémicas, al no asociarse filogenéticamente con ninguna secuencia de referencia de las razas tradicionales de PVY; mientras que el tercer grupo hace parte del clado representando el linaje PVY^{N/NTN} (Henao-Díaz et al., 2013). Los estudios hasta ahora realizados en este país suramericano con respecto a la incidencia y variabilidad genética de PVY han utilizado como base de muestreo el tejido foliar, pero no los tubérculos de papa. Es por esto que en el presente estudio se realizó un análisis de los niveles de incidencia de PVY en tubérculos-semilla no certificados de dos de las principales variedades de papa cultivadas en Colombia: *Solanum tuberosum* var. Diacol-Capiro y *S. phureja* var. Criolla-Colombia, y se evaluó la presencia del virus en cuatro tejidos (cáscara, yemas, ápice y base de brotes), comparándose la eficiencia para su detección entre las técnicas de TAS-ELISA y qRT-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Se obtuvieron directamente de agricultores de papa del Departamento de Antioquia (municipios de La Unión y Yarumal) 16 muestras de tubérculo-semilla en estado de brotación de la variedad Diacol-Capiro y 16 muestras de Criolla-Colombia, siendo almacenadas a 4 °C hasta su utilización. Cada muestra consistió de entre 10 y 15 tubérculos; una

vez en el laboratorio, de cada una se obtuvo aleatoriamente un tubérculo y se procedió a tomar con escalpelo estéril cuatro secciones de aproximadamente 0,5 a 1 cm² de cuatro tipos de tejidos: yemas no brotadas, cáscara, ápice de brotes y base de brotes. De esta forma, cada una de las 32 muestras compuestas se dividió en dos subgrupos destinados a la maceración directa en mortero para realizar pruebas de TAS-ELISA y a la extracción de ARN total utilizando nitrógeno líquido.

Detección de PVY por TAS-ELISA: Una vez en el laboratorio, las 32 muestras se evaluaron mediante pruebas de TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich) de la compañía Agdia (Indiana, EE.UU.) que utilizan anticuerpos policlonales para la captura del PVY y monoclonales conjugados a fosfatasa alcalina para su detección, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un equipo Multiscan RC/MS/EX (Labsystem), incluyendo en cada prueba un control positivo y un control negativo, consistentes de tejidos de papa suministrados en forma liofilizada por Agdia. La naturaleza viral del control positivo fue confirmada por RT-PCR convencional y secuenciación por el método de los didesoxirribonucleótidos (sistema Sanger), con los cebadores dirigidos a amplificar el gen completo (801 nt) de CP (PVYCPF: 5' ACC ATC AAG SAA ATG ACA CA 3' y PVYCPR : 5' CGG AGA GAC ACT ACA TCA CA 3') (Glais et al., 2002), siguiendo el protocolo planteado por Henao-Díaz et al. (2013). Para la determinación de los resultados se siguió el procedimiento descrito por la compañía serológica Bioreba (Suiza), en el que se define el sitio de corte (Cut-off) que diferencia las muestras negativas de aquellas positivas con base en la fórmula:

$$\text{Cut-off} = (\text{promedio} + 3 \text{ desviación estándar}) \times 1,1$$

La concordancia entre los resultados de las pruebas de TAS-ELISA y de qRT-PCR se evaluó mediante los índices de Cohen's Kappa y la prueba de McNemar utilizando el programa Graphpad (<http://graphpad.com/quickcalcs>).

Detección de PVY por qRT-PCR: Inicialmente se procedió a la extracción del ARN total de cada muestra utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo, EEUU), a partir de 100 mg del tejido macerado, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue eluido en 50

μL de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) y determinada su concentración y pureza por lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo).

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en dos pasos utilizando el sistema SYBR Green y los cebadores PVY-1 FP (5'CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA C 3') y PVY-1 RP (5'ATA TAC GCT TCT GCA ACA TCT GAG A 3') que se unen a los sitios del genoma 9009–9030 y 9058–9083 (PVY^O - Accesoión UO9509) (Singh et al., 2013) y amplifican una porción de 74 pb de la región de la cápside viral. Para la retrotranscripción se utilizaron 20 μL que contenían 200 U de la enzima *Maxima Reverse Transcriptase* (Thermo), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 pmol del cebador reverso, 20 U de inhibidor de ARNasas y 4 μL de ARN. Las reacciones se incubaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) a 65 °C por 5 min, seguido de 50 °C por 30 min y 85 °C por 5 min. El qPCR se realizó con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo), en 25 μL de reacción conteniendo 12,5 μL del kit, 10 μL de agua estéril libre de nucleasas, 0,3 μM de cada cebador y 50 ng de ADN copia (ADNc).

Las reacciones fueron realizadas en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (marca Qiagen) y consistieron de 95 °C por 10 min para activar la Taq-polimerasa, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 10 s y 51 °C por 45 s. La lectura de fluorescencia se realizó después de cada ciclo de amplificación y los valores de Ct para cada muestra fueron definidos utilizando los valores por defecto del programa Rotor-Gene Q ver. 1.7, siendo consideradas como positivas aquellas muestras que superaron el valor umbral (Ct) antes del ciclo 35, siguiendo el criterio de Schena et al. (2004).

La especificidad de los amplicones se definió por análisis de desnaturalización utilizando la herramienta del equipo de curva de desnaturalización entre 50 y 99 °C y por confirmación de la naturaleza viral de tres muestras mediante secuenciación en la compañía MacroGen (Corea del Sur), previa purificación con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit 6.0.6 (Hall, 1999) y comparadas con las bases de datos moleculares mediante el programa BLASTn

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Todas las reacciones incluyeron un control positivo correspondiente al ARN extraído de la muestra liofilizada provista por Agdia (EEUU) y un control negativo libre de virus.

RESULTADOS

Detección de PVY por TAS-ELISA: El virus PVY fue detectado mediante pruebas de TAS-ELISA en las 16 muestras de tubérculos de la variedad Diacol-Capiro (*S. Tuberosum*) evaluadas y con excepción del tejido de cáscara, fue encontrado en la totalidad de submuestras de yemas, base de brotes y ápice, siendo este último el tejido donde se obtuvieron mayores niveles de absorbancia a 405 nm con un valor promedio de 0,98 (SD=0,55) (Cuadro 1). La validez de la prueba fue confirmada por los altos valores de absorbancia obtenidos para los controles positivos (promedio=2,38; SD= 0,178) y los bajos niveles alcanzados para los controles negativos (promedio=0,07; SD=0,008); siendo definido con la metodología de Bioreba un valor de 0,138 como nivel de corte para la definición de resultados.

Para el caso de las muestras de tubérculos de la variedad Criolla-Colombia (*S. Phureja*), las pruebas de TAS-ELISA no detectaron el PVY en ninguno de los tejidos evaluados, obteniéndose valores de absorbancia a 405 nm inferiores a 0,0875 (SDs=0,01) para todas las muestras bajo análisis, independientemente del tejido (Figura 1).

Detección de PVY por qRT-PCR: Las extracciones de ARN utilizando el kit comercial permitieron obtener ARN de buena calidad y en cantidades suficientes para las pruebas de qRT-PCR, con concentraciones que oscilaron entre 32 y 420 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y relaciones de absorbancia 260nm:280nm de 1,69 a 1,92. Trabajos similares de detección de virus de ARN, han encontrado la presencia de inhibidores de polimerasas, particularmente de polifenoles en los extractos de tubérculos de papa (Singh y Singh, 1998; Agindotan et al., 2007), por lo que el uso de metodologías como la aquí empleada basada en el uso de membranas de sílica en presencia de buffers de tiocinato de guanidina, limitan la degradación del ARN y la inhibición enzimática de las reacciones de retrotranscripción y amplificación del cDNA.

Cuadro 1. Detección por TAS-ELISA y qRT-PCR de *Potato virus Y* (PVY) en tejidos de tubérculos de papa obtenidos en el Departamento de Antioquia (Colombia).

Muestra	Variedad	Localidad	Tejido	TAS-ELISA*		qRT-PCR**	
				Absorbancia	Resultado	Ct	Resultado
1	Diacol-Capiro	La Unión	Cáscara del tubérculo	0,09	-	14,22	+
2	Diacol-Capiro	La Unión	Yemas no brotadas	0,18	+	13,73	+
3	Diacol-Capiro	La Unión	Base de brotes	0,43	+	9,74	+
4	Diacol-Capiro	La Unión	Ápices de brotes	1,21	+	9,52	+
5	Diacol-Capiro	La Unión	Cáscara del tubérculo	0,07	-	17,48	+
6	Diacol-Capiro	La Unión	Yemas no brotadas	0,14	+	12,72	+
7	Diacol-Capiro	La Unión	Base de brotes	0,46	+	8,82	+
8	Diacol-Capiro	La Unión	Ápices de brotes	0,70	+	17,15	+
9	Diacol-Capiro	Yarumal	Cáscara del tubérculo	0,07	-	28,35	+
10	Diacol-Capiro	Yarumal	Yemas no brotadas	0,15	+	23,25	+
11	Diacol-Capiro	Yarumal	Base de brotes	1,09	+	15,64	+
12	Diacol-Capiro	Yarumal	Ápices de brotes	1,64	+	10,41	+
13	Diacol-Capiro	Yarumal	Cáscara del tubérculo	0,09	-	23,6	+
14	Diacol-Capiro	Yarumal	Yemas no brotadas	0,14	+	20,01	+
15	Diacol-Capiro	Yarumal	Base de brotes	0,47	+	15,06	+
16	Diacol-Capiro	Yarumal	Ápices de brotes	0,37	+	9,06	+
17	Criolla-Colombia	Yarumal	Cáscara del tubérculo	0,08	-	29,37	+
18	Criolla Colombia	Yarumal	Yemas no brotadas	0,08	-	28,19	+
19	Criolla Colombia	Yarumal	Base de brotes	0,08	-	ND	ND
20	Criolla Colombia	Yarumal	Ápices de brotes	0,07	-	26,29	+
21	Criolla Colombia	Yarumal	Cáscara del tubérculo	0,08	-	23,52	+
22	Criolla Colombia	Yarumal	Yemas no brotadas	0,08	-	31,14	+
23	Criolla Colombia	Yarumal	Base de brotes	0,09	-	29,06	+
24	Criolla Colombia	Yarumal	Ápices de brotes	0,09	-	25,57	+
25	Criolla Colombia	Yarumal	Cáscara del tubérculo	0,10	-	>35	-
26	Criolla Colombia	Yarumal	Yemas no brotadas	0,10	-	>35	-
27	Criolla Colombia	Yarumal	Base de brotes	0,09	-	>35	-
28	Criolla Colombia	Yarumal	Ápices de brotes	0,09	-	>35	-
29	Criolla Colombia	Yarumal	Cáscara del tubérculo	0,09	-	33,13	+
30	Criolla Colombia	Yarumal	Yemas no brotadas	0,09	-	>35	-
31	Criolla Colombia	Yarumal	Base de brotes	0,09	-	34,11	+
32	Criolla Colombia	Yarumal	Ápices de brotes	0,09	-	30,7	+

* El valor de corte para la definición de resultados de TAS-ELISA correspondió a una absorbancia a 405 nm de 0,138. ** >35 representa resultados negativos en las pruebas de qRT-PCR. ND. Muestra no definida por pérdida del ARN

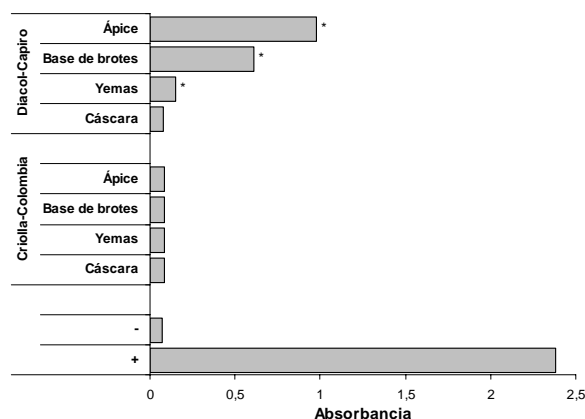


Figura 1. Resultado promedio de las pruebas de TAS-ELISA para la detección de *Potato virus Y* (PVY) en diferentes tejidos de tubérculos de papa obtenidos en el Departamento de

Antioquia (Colombia). Los asteriscos señalan los resultados positivos. Los signos + y - representan los valores para los controles positivos y negativos, respectivamente

La detección de PVY utilizando qRT-PCR permitió encontrar este virus en todos los tejidos evaluados para las 16 muestras de tubérculos de la variedad Diacol-Capiro, obteniéndose valores de Ct que oscilaron entre 9,06 y 28,35, siendo evidente la presencia de un mayor título viral en los tejidos del ápice (Ct promedio=11,5; SD=3,78) y base de brotes (Ct promedio=12,3; SD=3,53), seguidos por las yemas latentes (Ct promedio=17,4; SD=5,04) y finalmente por la cáscara de tubérculo (Ct promedio=20,9; SD=6,30) (Cuadro 1). La utilización de los brotes

de los tubérculos para la detección de virus es una práctica ampliamente utilizada en los procesos de certificación de semilla de papa (Frost et al., 2013; Karasev y Gray, 2013); así por ejemplo Latvala-Kilby et al. (2009) sugieren que el uso de porciones de ápices de brotes de 2 cm surgidos luego de 10 días de incubación a 18 °C, puede aumentar la posibilidad de detección de PMTV en tubérculos de papa. Sin embargo, un resultado de gran interés del presente estudio, fue la posibilidad de detectar el PVY mediante qRT-PCR en variedades locales de Colombia aún en los tejidos de cáscara o de yemas latentes de los tubérculos, pues esto posibilitaría la aplicación de esta técnica para el descarte de lotes de semillas infectadas por PVY antes de dar inicio al proceso de almacenamiento necesario para la ruptura de la dormancia de yemas.

Para el caso de la variedad Criolla-Colombia, las pruebas de qRT-PCR detectaron PVY en 11 de las muestras evaluadas, aunque en este caso los valores Ct de los tejidos que resultaron positivos para el virus fueron evidentemente mayores que aquellos encontrados para Diacol-Capiro, al oscilar entre 23,52 y 34,11 y presentar valores promedio de Ct=31,5 (SD=6,90), Ct=34,8 (SD=6,08), Ct=32,7 (SD=5,49) y Ct=30,6 (SD=6,63) para cáscara, yemas, base de brotes y ápices de brotes, respectivamente. Por su parte los valores de Ct obtenidos para los controles positivos variaron entre 20,17 y 22,13, mientras que en los controles negativos no se presentaron curvas de amplificación (Ct>40) (Cuadro 1).

Las lecturas de fluorescencia de las muestras consideradas como positivas superaron el valor umbral (Ct) antes del ciclo de amplificación 30 (Figura 2 A).

En términos globales para ambas variedades de papa, la prueba de qRT-PCR detectó el PVY en el 80,6 % de las muestras, mientras que las pruebas de TAS-ELISA lo hicieron en tan sólo el 37,5 % de éstas. La validez de los resultados de detección de PVY por qRT-PCR fue confirmada por tres métodos independientes: 1) análisis de desnaturalización con respecto a controles positivos del virus obtenidos en la compañía Agdia; 2) corrido electroforético de los amplicones para evaluar su tamaño y especificidad; y 3) secuenciación de algunos amplicones para su comparación con las bases de datos moleculares.

Estos resultados ponen de manifiesto las diferencias en los niveles de detección de PVY alcanzadas por ambas pruebas, presentándose 14 disparidades entre éstas que resultaron en bajos índices de concordancia en los análisis de Cohen's Kappa (0,0021) y McNemart (12,071, P= 0,0005). Ya que para la realización de estas pruebas se partió de los mismos tejidos, la principal razón para explicar esta situación recae en las diferencias en los niveles de sensibilidad de dichas metodologías, situación que ya ha sido reportada en múltiples estudios de virología vegetal (Mumford et al., 2000; Mehle et al., 2004; Bertolini et al., 2008; Fageria et al., 2013). En este sentido, Mumford et al. (2000), indican que el uso de qRT-PCR para detectar el *Potato mop-top virus* (PMTV) ofrecía niveles de sensibilidad 10.000 veces superiores que los alcanzados con las pruebas de ELISA; mientras que Bertolini et al. (2008) al evaluar la detección del *Citrus tristeza virus* (CTV) en plantas y áfidos, determinaron que la técnica de qRT-PCR pudo detectar hasta 17 copias del virus, presentando niveles de sensibilidad superiores en 100-500 veces con respecto a IC-RT-PCR anidada y de 106 veces con relación a DAS-ELISA.

Para el caso específico de PVY, Kogovsek et al. (2008), en un estudio tendiente a diseñar pruebas de qRT-PCR capaces de diferenciar aislamientos recombinantes de PVY^{NTN} de aquellos no recombinantes de PVY^N, encontraron que las pruebas en tiempo real presentaban sensibilidades superiores entre 10⁵ y 10⁷ veces con respecto a las pruebas de ELISA convencionalmente empleadas para detectar este virus; e incluso el acople de la qRT-PCR con pruebas de Inmuno-captura podía mejorar la detección del PVY en hasta 10⁴ veces con respecto al formato de ELISA.

Dichas diferencias dependen en buena parte de la naturaleza de ambas técnicas; pues las pruebas de ELISA por su condición serológica sólo pueden detectar proteínas virales, frecuentemente de la cápside; mientras que las pruebas basadas en ácidos nucleicos como la qRT-PCR detectan directamente porciones del genoma viral, independientemente que se encuentren ensamblados o desnudos, una situación que frecuentemente ocurre dado el movimiento sistémico de los virus en las plantas (Shemyakina et al., 2011; Hull et al., 2014). Adicionalmente, las

pruebas de qRT-PCR realizan la detección del genoma viral en los primeros ciclos de las reacciones de PCR y no al final como ocurre con las pruebas de RT-PCR convencional, lo que representa la detección de virus aún bajo condiciones de inhibición de las reacciones o de bajo título viral (Schena et al., 2004).

La especificidad de los amplicones obtenidos mediante qRT-PCR fue confirmada mediante el análisis de curva de desnaturalización, utilizando como base los valores de temperatura de fusión (T_m) de los picos encontrados para los controles positivos, que se presentaron en el rango de $77,5 \pm 0,5$ °C (Figura 2B). La naturaleza de dichos amplicones fue además reconfirmada por secuenciación de dos de las muestras y del control

positivo proveído por Agdia, encontrándose por comparación con las bases de datos moleculares, que dichas secuencias correspondían a una región de cerca de 50 pb de la cápside viral de diferentes aislamientos de PVY (Accesiones KJ741195, KJ741026, GQ200836 y KJ741031, Identidad = 100 %, $e = 5 \times 10^{-6}$). En forma similar, la secuenciación del control positivo realizada a partir de RT-PCR convencional con los cebadores PVYCPF y PVYCPR que amplifican toda la secuencia de 801 pb que codifica para la cápside viral, confirmó la identidad de esta muestra como asociada a la raza PVY^O (por ejemplo HQ912915 y JQ954367, $e=0,0$), certificándose así su utilidad como control positivo en este trabajo.

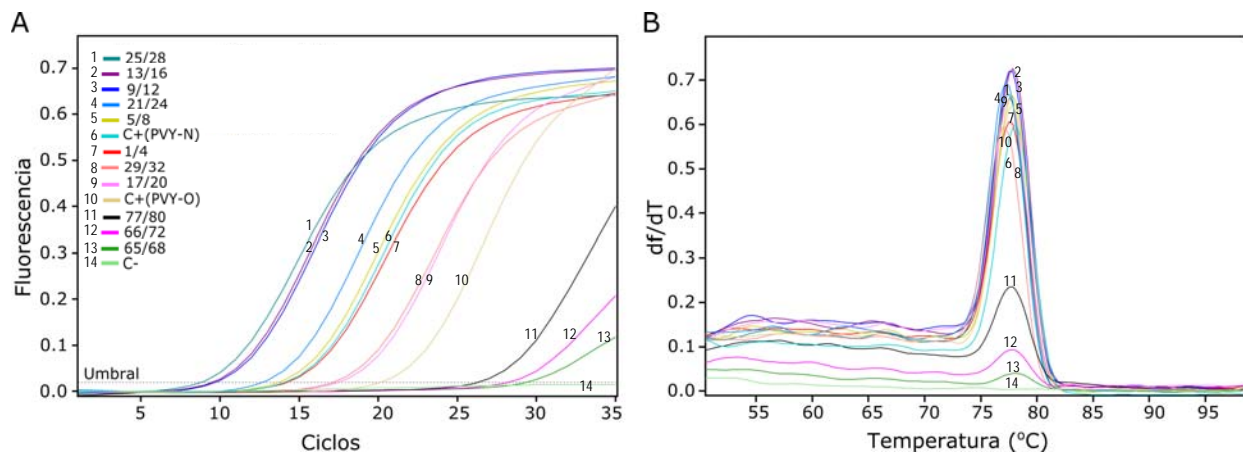


Figura 2. (A) Curvas de amplificación por qRT-PCR utilizando el sistema SYBR Green y los cebadores PVY-1 FP y PVY-1 RP para la detección de *Potato virus Y (PVY)* en tejidos de tubérculos de papa obtenidos en el Departamento de Antioquia (Colombia). (B) Perfiles de la curva de desnaturalización de amplicones específicos de PVY obtenidos por qRT-PCR

Como se puede inferir de los resultados obtenidos en este estudio, los niveles de incidencia de PVY en tubérculos no certificados de las variedades Diacol-Capiro y Criolla-Colombia son muy altos y sin duda por esto, la semilla utilizada por los agricultores de papa de regiones andinas como el Oriente y Norte de Antioquia, se constituye en un mecanismo fundamental de dispersión primaria de este virus y otros como el PLRV, PMTV y PVS, que se han reportado a nivel mundial como eficientemente transmitidos por esta vía (Agidontan et al., 2007; Latvala-Kilby et al., 2009; Halterman et al., 2012; Frost et al., 2013). De gran interés resultará en el futuro evaluar la utilidad de la técnica de qRT-

PCR aquí aplicada, para determinar los niveles de sanidad viral de la semilla certificada comercializada en Colombia y otros países latinoamericanos, por cuanto en la mayoría de casos la inspección que se realiza en los campos destinados para producción de semilla se realiza de manera visual y eventualmente utilizando un submuestreo muy bajo con pruebas de ELISA. Esto puede conducir a subestimar los niveles de incidencia viral; más aún cuando muchos de los virus que afectan la papa, incluyendo el PVY, pueden inducir infecciones asintomáticas en diferentes variedades o condiciones ambientales, presentándose bajos niveles de título viral difícilmente detectados por pruebas con niveles

medios de sensibilidad como la ELISA (Latvala-Kilby et al., 2009; Fageria et al., 2013).

Se espera que los resultados obtenidos en esta investigación sirvan de base para fortalecer los programas de certificación de semilla de papa en Colombia y otros países latinoamericanos en los que los niveles de incidencia y severidad de PVY resultan limitantes para la producción de este cultivo. Por esto, es deseable que los organismos de sanidad vegetal estatal, gremios de agricultores y compañías de semillas, incorporen la metodología de qRT-PCR aquí evaluada como parte de sus procedimientos para garantizar la sanidad del material de siembra de papa.

CONCLUSIONES

Los tejidos de ápices y base de brotes de tubérculos de papa, resultaron ser los sitios donde se encontró mayor título viral de PVY en la variedad Diacol-Capiro, tal como se desprende de los bajos valores de ciclo umbral (Ct) de las pruebas de qRT-PCR (Ct promedio ápices=11,53 y Ct promedio base = 12,31). Por el contrario, la carga viral fue menor en los tejidos de yemas latentes (Ct promedio = 17,42) y cáscara (Ct promedio = 20,91) para esta variedad; aunque esto no imposibilitó la detección efectiva del PVY. Para el caso de la variedad Criolla-Colombia, fue evidente que el virus se presentó con menor título en los tubérculos evaluados, superándose valores de ciclo umbral de Ct=30 para los cuatro tejidos bajo evaluación. Sin embargo, la alta sensibilidad de la prueba de qRT-PCR permitió la detección del virus en el 66,6 % de los tubérculos-semilla evaluados para esta variedad.

Se encontró un mayor nivel de detección de PVY al utilizar la técnica de qRT-PCR (80,6 %) en cuatro diferentes tejidos de tubérculos de dos variedades de papa, comúnmente cultivadas en Colombia (Diacol-Capiro y Criolla-Colombia), en comparación a la técnica de TAS-ELISA (37,5 %).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia a través de la Convocatoria de proyectos para la introducción en la investigación,

creación o innovación (código 19593).

LITERATURA CITADA

1. Agindotan, B.O., P.J. Shiel y P.H. Berger. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142: 1-9.
2. Ayala, M., P. González, P. Gutiérrez, J.M. Cotes y M. Marín. 2010. Caracterización serológica y molecular de potyvirus asociados a la virosis del tomate de árbol en Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana* 15: 143-162.
3. Baldauf, P.M., S.M. Gray y K.L. Perry. 2006. Biological and serological properties of Potato virus Y isolates in northeastern United States potato. *Plant Disease* 90: 559-566.
4. Bertolini, E., A. Moreno, N. Capote, A. Olmos, A. de Luis, E. Vidal, J. Pérez-Panadés y M. Cambra. 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 120: 177-188.
5. Blanco-Urgoiti, B., F. Sánchez, C. Pérez de San Roman, J. Dopazo y F. Ponz. 1998. Potato virus Y group C isolates are a homogenous pathotype but two different genetic strains. *Journal of General Virology* 79: 2037-2042.
6. Carrington, J.C., R. Haldeman, V.V. Dolja, M.A. Restrepo-Hartwig. 1993. Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPG-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *Journal of Virology* 67:6995-7000.
7. Crosslin, J.M. y L.L. Hamlin. 2011. Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and Potato spindle tuber viroid. *American Journal of Potato Research* 88: 333-338.
8. Fageria, M.S., M. Singh, U. Nanayakkara, Y. Pelletier, X. Nie, y D. Wattie. 2013. Monitoring current-season spread of Potato virus Y in potato fields using ELISA and real-time RT-PCR. *Plant Disease* 97: 641-644.
9. Frost, K., R.L. Groves y A.O. Charkowski. 2013. Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision of clean seed potatoes. *Plant Disease*

- 97: 1268-1280.
10. Gil J.F., M.L. Ayala, M. Marín y E.P. González. 2009. Identificación de Potyvirus en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en Antioquia mediante detección serológica. *Revista Politécnica* 5: 112-120.
 11. Gil, J.F., J.M. Cotes y M. Marín. 2011. Incidencia de potyvirus y caracterización molecular de PVY en regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13: 85-93.
 12. Glais, L., M. Tribodet y C. Kerlan. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. *Archives of Virology* 147: 363-378.
 13. Glais, L., M. Tribodet, y C. Kerlan. 2005. Specific detection of the PVYNW variant of Potato virus Y. *Journal of Virological Methods* 125: 131-136.
 14. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
 15. Halterman, D., A. Charkowski y J. Verchot. 2012. Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Technology* 6: 1-14.
 16. Henao-Díaz, E., P. Gutiérrez-Sánchez y M. Marín-Montoya. 2013. Análisis filogenético de aislamientos del Potato virus Y (PVY) obtenidos en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. *Actualidades Biológicas* 35: 219-232.
 17. Hull, R. 2014. *Plant Virology*. Academic Press, New York.
 18. Jaramillo, M.M., P. Gutiérrez, L.E. Lagos, J.M. Cotes y M. Marín. 2011. Detection of a complex of viruses in tamarillo (*Solanum betaceum*) orchards in the Andean region of Colombia. *Tropical Plant Pathology* 36: 150-159.
 19. Karasev, A.V. y S.M. Gray. 2013. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. *Annual Review of Phytopathology* 51: 571-586.
 20. Kerlan, C. 2008. Potato viruses. In: Brian W. Mahy y Marc H. van Regenmortel (eds.). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Academic Press. Oxford, UK. pp. 458-471.
 21. Kogovsek, P., L. Gow, M. Pompe-Novak, K. Gruden, G.D. Foster, N. Boonham y M. Ravnikar. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods* 149: 1-11.
 22. Latvala-Kilby, S., J. Aura, N. Pupola, A. Hannukkala y J. Valkonen. 2009. Detection of Potato mop-top virus in potato tubers and sprouts: combinations of RNA2 and RNA3 variants and incidence of symptomless infections. *Phytopathology* 99: 519-531.
 23. Lorenzen, J.H., L.M. Piche, N.C. Gudmestad, T. Meacham y P. Shiel. 2006. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease* 90: 935-940.
 24. Mehle, N., M. Kovac, N. Petrovic, M. Pompe-Novak, S. Baebler, H.K. Stres, K. Gruden y M. Ravnikar. 2004. Spread of Potato virus YNTN in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 293-300.
 25. Mumford, R., K. Walsh, I. Barker y N. Boonham. 2000. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex realtime fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 90: 448-453.
 26. Schena, L., F. Nigro, A. Ippolito y D. Gallitelli. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110: 893-908.
 27. Schubert, J., V. Fomitcheva y J. Sztangret-Wisniewska. 2007. Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR primers. *Journal of Virological Methods* 140: 66-74.
 28. Shemyakina, E.A., A.G. Solovyev, O.G. Leonova, V.I. Popenko, J. Schiemann y S.Y. Morozov. 2011. The role of microtubule association in plasmodesmal targeting of

- Potato mop-top virus movement protein TGBp1. *The Open Virology Journal* 5: 1-11.
29. Singh, R.P. y M. Singh. 1998. Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease* 82: 230-234.
30. Singh, R.P. y X. Nie. 2003. Multiple virus and viroid detection and strain separation via multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 127-134.
31. Singh, R.P., J.P. Valkonen, S.M. Gray, N. Boonham, R.A.C. Jones, C. Kerlan y J. Schubert. 2008. Brief review: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. *Archives of Virology* 153: 1-13.
32. Singh, M., R.P. Singh, M.S. Fageria, X. Nie, R. Coffin y G. Hawkins. 2013. Optimization of a Real-Time RT-PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of Potato virus Y in dormant potato tubers. *American Journal of Potato Research* 90: 43-50.
33. Vanegas-Berrouet, K., L. Martínez-Pacheco, M. Salazar-Yepes, P. Gutiérrez-Sánchez y M. Marín-Montoya. 2014. Detección y cuantificación por qPCR de *Colletotrichum lindemuthianum* en tejidos y semillas de frijol en Antioquia, Colombia. *Bioagro* 26: 13-20.
34. Verbeek, M., C. Cuperus, R.A.A. van der Blugt, P.G.M. Peron y A.M. Dullermans. 2010. Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN, and Wilga strains of Potato virus Y. *Annals of Applied Biology* 156: 39-49.
35. Villamil-Garzón, A., W.J. Cuellar y M. Guzmán-Barney. 2014. Natural co-infection of *Solanum tuberosum* crops by the Potato yellow vein virus and potyvirus in Colombia. *Agronomía Colombiana* 32: 213-223.