

DETECCIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DEL *Potato Virus Y* (PVY) QUE INFECTA PLANTAS DE TOMATE EN ANTIOQUIA, COLOMBIA

Laura Muñoz-Baena¹, Pablo A. Gutiérrez-Sánchez¹ y Mauricio Marín-Montoya¹

RESUMEN

El *Potato virus Y* (PVY) es uno de los virus más limitantes en cultivos de solanáceas. En la región andina es frecuente encontrar cultivos mixtos de estas especies vegetales, lo cual facilita la inoculación cruzada con este virus. Estudios recientes en el departamento de Antioquia, Colombia, han detectado altos niveles de incidencia y variación genética de PVY en papa y tomate de árbol. Con el fin de evaluar si esta situación también ocurre en los cultivos de tomate de esta región, se realizó una secuenciación de nueva generación (NGS) del transcriptoma de tejido foliar de tomate, como base para la caracterización molecular del PVY en este hospedero. Se determinó, además, su incidencia en tres lotes de cultivo con TAS-ELISA y se confirmó su presencia por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). El PVY fue detectado en el 13,3% de las 45 muestras foliares analizadas mediante TAS-ELISA y se confirmó por RT-qPCR con valores de ciclo umbral (Ct) de 14,31 a 33,8 y temperaturas de fusión (Tm) de $77,5 \pm 1,5$ °C. Los análisis bioinformáticos identificaron la ocurrencia de dos variantes de PVY en proporciones de 3:2. Sus genomas tienen un tamaño de 9726 nt y comparten 97,5 % de identidad; codifican para una poliproteína de 3061 aminoácidos, con regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' de 218 y 325 nt, respectivamente. Los análisis filogenéticos, tanto de la poliproteína como de la cápside de ambas variantes, indican su afinidad con genotipos de PVY^{NTN}, y constituyen el primer reporte en América del genoma completo de este virus en el cultivo de tomate.

Palabras clave adicionales: NGS, *Potyvirus*, RT-PCR en tiempo real, secuenciación masiva, *Solanum lycopersicum*, TAS-ELISA

ABSTRACT

Detection and genome sequencing of *Potato virus Y* (PVY) infecting tomato in Antioquia, Colombia

PVY is one of the most limiting viruses in solanaceous plants. These crops are frequently planted together facilitating their cross-inoculation with this virus. Recent studies in Antioquia, Colombia, detected high levels of incidence and genetic variability of PVY infecting potato and tamarillo. In this study, Next-Generation Sequencing (NGS) transcriptome analysis of tomato leaves was used to confirm the presence of PVY in tomato crops in that region; virus incidence was evaluated in three plots using TAS-ELISA and further confirmed by real-time RT-PCR (RT-qPCR). TAS-ELISA of 45 leaf samples detected PVY in 13.3 % of them; RT-qPCR confirmed the serological results with threshold cycle values in the 14.31 and 33.8 range and a Tm of 77.5 ± 1.5 °C. Bioinformatic analysis confirmed the presence of two PVY variants (proportion 3:2), sharing 97.5 % of sequence identity. Both genomes are 9726 nt in size and code for 3061 amino acids polyprotein flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTR) of 218 and 325 nt. Phylogenetic analysis of both the sequences coding for the coat protein and the complete polyprotein suggest phylogenetic affinity with PVY^{NTN}. To our knowledge, this is the first American report of a complete PVY genome naturally infecting tomato.

Additional key words: Deep sequencing, NGS, *Potyvirus*, Real-time RT-PCR, *Solanum lycopersicum*, TAS-ELISA

INTRODUCCIÓN

El *Potato virus Y* (PVY) (*Potyvirus*, *Potyviridae*) es uno de los virus más limitantes en los cultivos de plantas solanáceas en todo el mundo, incluyendo papa (*Solanum tuberosum*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), pimentón (*Capsicum* spp.) y

tomate (*Solanum lycopersicum*) (Singh et al., 2008; Ayala et al., 2010; Jaramillo et al., 2011).

Los reportes de los efectos del PVY en los cultivos de tomate son muy variables; así por ejemplo Thomas y McGrath (1988) indican que este virus ha causado epidemias en Australia con niveles de infección hasta del 100 % y pérdidas del 50 % en la producción de frutos, mientras que

Recibido: Julio 23, 2015

Aceptado: Febrero 1, 2016

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

e-mail: lamunozba@unal.edu.co; paguties@unal.edu.co; mamarinm@unal.edu.co

Morel et al. (2000) registran que el PVY fue un virus marginal en cultivos de tomate de los países del mediterráneo, pero que luego de 1980, la llegada de nuevas variantes necrosantes ha cambiado la situación a tal punto que en Valencia (España), después del *Tomato mosaic virus* (ToMV), el PVY se registra como el segundo virus más incidente en este hospedero (Soler et al., 2010).

Los síntomas inducidos por el PVY consisten en mosaicos con diferentes niveles de severidad, acompañados de rugosidad y deformación de las hojas, e incluso necrosis sistémica en algunas plantas como tabaco y papa. Las plantas más infectadas pueden presentar defoliación y enanismo severo (Kerlan, 2008; Singh et al., 2008). Algunos genotipos virales de PVY (Ej. PVY^{NTN}, PVY^{Wi}) pueden inducir necrosis en la superficie de los tubérculos de papa, una enfermedad denominada como PTNRD, por sus siglas en inglés (*Tuber Necrotic Ringspot Disease of Potato*) (Schubert et al., 2007). Específicamente en tomate, las cepas de PVY^O y PVY^C inducen deformación de hojas jóvenes, seguido por moteados necróticos y algunas veces necrosis de venas; mientras que PVY^{N/NTN} causan mosaicos severos con presencia de parches amarillos intervenales y manchas blanquecinas en los frutos, lo que afecta su calidad comercial (Shukla et al., 1994). El PVY es transmitido mecánicamente y por propagación asexual (ej. tubérculos de papa, esquejes), así como por más de 100 especies de áfidos de forma no persistente, siendo los miembros de la especie *Myzus persicae* los más eficientes (Kerlan, 2008).

Los viriones de PVY se caracterizan por presentar partículas filamentosas de aproximadamente 730 nm de longitud, con una molécula de ARN de cadena sencilla de 9700-9800 nucleótidos (nt), con poli-A en el extremo 3' y una proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' (Karasev y Gray, 2013). Su genoma se expresa por una poliproteína que es procesada por tres proteasas de origen viral (NIa, HC-Pro y P1) dando origen a 11 proteínas funcionales (P1, HC-Pro, P3, PIPO, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb y CP); las dos últimas correspondientes a la replicasa viral RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) de 59,7 kDa y la proteína de la cápside (CP) de 30 kDa (Crosslin y Hamlin, 2011).

El PVY es un virus altamente variable a nivel

biológico y molecular, debido a sus altas tasas de mutación y recombinación genética (Glais et al., 2002; Karasev y Gray, 2013). Tradicionalmente, los aislamientos del virus han sido divididos en cuatro razas principales: PVY^O corresponde a la raza ordinaria y causa un mosaico general en papa y tabaco; PVY^N causa necrosis de venas en tabaco y mosaicos suaves en papa; PVY^C produce estriado puntiforme en papa y PVY^Z que causa síntomas no necróticos pero es serológicamente diferente a PVY^O (Singh et al., 2008). PVY^N presenta además al menos dos variantes, denominadas como PVY^{NTN} y PVY^{Wi} (Singh et al., 2008; Karasev y Gray, 2013). Este último genotipo es nombrado en Norteamérica como PVY^{N:O} ya que induce necrosis de venas en tabaco, pero tiene una reacción serológica similar a la raza PVY^O; se ha demostrado que dicha variante es producto de eventos recombinatorios entre aislamientos de PVY^N y PVY^O (Schubert et al., 2007).

En Colombia, el PVY se ha identificado como uno de los principales virus que afectan los cultivos de papa y otras solanáceas en la región Andina (Ayala et al., 2010; Gil et al., 2011; Villamil-Garzón et al., 2014). Henao-Díaz et al. (2013), utilizando análisis de secuencias de la región CP, reportaron la ocurrencia de tres variantes principales de PVY en este país denominadas como II-Int, I-Col y IV-Col, las dos últimas aparentemente son endémicas al no asociarse filogenéticamente con ninguna secuencia de referencia de los linajes genéticos que representan las razas tradicionales de PVY; mientras II-Int hace parte del linaje PVY^{N/NTN}, ampliamente reportado en diferentes países del mundo (Ogawa et al., 2008; Karasev y Gray, 2013).

Recientemente, utilizando metodologías de secuenciación de nueva generación (NGS) a partir de micro-ARNs, fue reportada la secuencia completa del genoma de un aislamiento de PVY presente en una infección mixta con *Potato yellow vein virus* (PYVV) en plantas de *Solanum phureja* en Cundinamarca, Colombia, siendo confirmada su afinidad filogenética con cepas de PVY^{NTN} de Europa y Norteamérica (Villamil et al., 2014).

A pesar de que el PVY ha afectado cultivos de tomate en diferentes regiones andinas de Colombia (Jaramillo et al., 2007) y de países limítrofes como Brasil (Lourenção et al., 2005) y Venezuela (Nava et al., 1997), hasta el momento

se desconocen las características moleculares de las cepas que infectan este hospedero en la región Andina, así como su afinidad filogenética. Por esta razón, en el presente estudio se evaluó la ocurrencia del PVY en una región montañosa del oriente del departamento de Antioquia, Colombia y se analizó su genoma viral completo utilizando el sistema NGS Illumina HiSeq2000.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. En cada uno de tres lotes de cultivo de tomate var. Chonto en estado de floración, ubicados en la zona rural de los municipios de Marinilla (dos lotes) y El Peñol (un lote) al oriente del departamento de Antioquia, Colombia, se obtuvieron en forma aleatoria 15 muestras foliares de plantas con el fin de evaluar la presencia de PVY mediante pruebas de TAS-ELISA. En esta región confluyen cultivos de tomate con los de otras plantas solanáceas susceptibles a la infección por PVY como papa, tomate de árbol y pimentón. Una vez en el laboratorio, de cada lote bajo análisis se realizaron tres muestras compuestas (5X) con el fin de realizar su maceración con nitrógeno líquido para la extracción del ARN total.

Pruebas de TAS-ELISA y confirmación de PVY por RT-PCR. En las 45 muestras foliares individuales de tomate se evaluó la presencia de PVY con pruebas de TAS-ELISA (*Triple Antibody Sandwich*) de la compañía Agdia, 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 vegetales suministrados en forma liofilizada por Agdia. Para la definición de las muestras positivas, se utilizó la fórmula del valor de corte (*cut-off*) reportada por Bioreba (www.bioreba.com) [$Cut-off = (\text{promedio} + 3 \text{ desviaciones estándar}) \times 1,1$]. La naturaleza viral del control positivo y de una de las muestras positivas para PVY fue confirmada por RT-PCR convencional y secuenciación de Sanger, con los cebadores PVYCPF (5'ACC ATC AAG SAA ATG ACA CA 3') y PVYCPR (5'CGG AGA GAC ACT ACA TCA CA 3') que amplifican el gen completo (801 pb) de CP (Glais et al., 2002), siguiendo el protocolo reportado por Henao et al.

(2013). Adicionalmente, en cinco de las muestras que resultaron positivas por TAS-ELISA, representadas por tres muestras de Marinilla y una del Peñol, más el control positivo (Cuadro 1) fue reconfirmada la presencia de PVY con un procedimiento de inmunocaptura RT-PCR en tiempo real (IC-RT-qPCR), a partir de la liberación post-ELISA de las partículas virales putativas, siguiendo el procedimiento descrito por Wetzel et al. (1992), en el que se utilizan 70 µL de buffer de liberación (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, 1 % Triton X 100) e incubación a 70 °C durante 10 min. Las condiciones de las reacciones de retrotranscripción y PCR fueron aquellas previamente reportadas por Medina et al. (2015), utilizando los primers 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') (Singh et al., 2013) que amplifican una porción de 74 pb de la región CP de PVY.

Detección de PVY por RT-qPCR. Se evaluó la presencia de PVY en las tres muestras compuestas de cada lote mediante pruebas de RT-qPCR con SYBR Green I, a partir del ARN total extraído con el kit *GeneJET Plant RNA Purification* (Thermo), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron aquellas reportadas por Medina et al. (2015), siendo definidas como muestras positivas las que presentaron valores de ciclo umbral (*threshold cycle - Ct*) menores de 35 y amplicones con temperatura de fusión (*Tm*) de ± 2 °C respecto al control positivo, siguiendo los criterios de Schena et al. (2004). Todas las reacciones de RT-qPCR incluyeron un control negativo libre de cDNA viral. La naturaleza viral de dos de los amplicones que cumplieron estas condiciones y del control positivo fue reconfirmada por secuenciación de Sanger.

Secuenciación NGS. A partir de las muestras compuestas que resultaron positivas para PVY en las pruebas de RT-qPCR se realizó una mezcla aleatoria de ARN total, siendo determinada su concentración y pureza por lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo). Posteriormente las muestras fueron tratadas con el kit *TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant kit* (Illumina) para eliminar el ARN ribosomal y evaluado su RIN (*RNA Integrity Number*) en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Las librerías de ADNc se construyeron con el kit

TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina) y la secuenciación masiva fue realizada en un equipo HiSeq 2000 (Illumina, Macrogen). Una vez obtenidas las secuencias se removieron las bases con baja calidad (*Phred* <30) utilizando el programa SeqTK (<https://github.com/lh3/seqtk>) y las lecturas de secuencias o *reads* correspondientes al genoma de PVY fueron identificadas por mapeo contra genomas de referencia utilizando el programa Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012) y por comparaciones con las bases de datos moleculares con BLASTX (Gish y States, 1993). Los genomas completos de las variantes de PVY detectadas en el estudio fueron ensamblados utilizando rutinas en lenguaje de programación *Perl* escritas por nuestro grupo para este fin.

Análisis filogenéticos. Las secuencias obtenidas por NGS para los genomas completos de PVY y por secuenciación de Sanger para la región CP fueron utilizadas como base para realizar análisis filogenéticos a partir de su alineamiento con respecto a secuencias de cepas de PVY de referencia (Ej. PVY^O, PVY^{N/NTN}, PVY^{N:O/Wi} y PVY^C), así como con cepas de este virus obtenidas en tomate y disponibles en GenBank. Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal W y los análisis de agrupamiento con el algoritmo de máxima verosimilitud y el modelo Jukes-Cantor utilizando el programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de TAS-ELISA y confirmación de PVY por RT-PCR. El virus PVY fue detectado mediante pruebas de TAS-ELISA en dos de los tres lotes de tomate var. Chonto provenientes de los municipios de Marinilla (L2) y El Peñol (L3) con un nivel de incidencia del 13,3 %, es decir, se encontró en seis de las 45 muestras evaluadas (Figura 1). La validez de las pruebas fue confirmada por el alto valor de absorbancia obtenido para el control positivo (0,93) y los bajos niveles alcanzados para los controles negativos (promedio = 0,166; SD = 0,011); definiéndose en el histograma de frecuencias de absorbancia a 405 nm, un nivel de 0,334 como el valor de corte del ensayo. Utilizando RT-PCR con los primers PVYCPF y PVYCPR se obtuvieron los fragmentos del tamaño esperado de 801 pb para el control

positivo y una de las muestras evaluadas (TM2.11) procedente del municipio de Marinilla. La naturaleza viral de dichos amplicones fue confirmada por comparación con las bases de datos moleculares, presentándose para el control positivo una identidad del 100 % con respecto a varios aislamientos de la raza ordinaria de este virus (PVY^O) (ej. HQ912915 y JQ954367) mientras que para la muestra TM2.11 dicho valor fue de 99 % con cepas de PVY^{NTN} (ej. KM396648, JF927752 y JN936432).

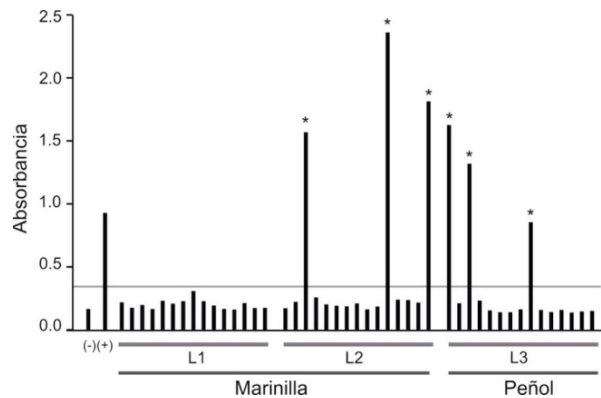


Figura 1. Resultado de las pruebas de TAS-ELISA para la detección de *Potato virus Y* (PVY) en tejidos foliares de tomate, obtenidos en los municipios de Marinilla y El Peñol del oriente del departamento de Antioquia, Colombia. Los asteriscos representan los resultados positivos. Los signos + y - corresponden a los valores para los controles positivos y negativos, respectivamente. La línea horizontal representa el punto de corte de la prueba (Absorbancia = 0,334)

Las pruebas de IC-RT-qPCR, utilizando como molde los productos de la post-ELISA, resultaron positivas para las cuatro muestras evaluadas con valores de Ct de 29,09 a 33,02 y de 23,02 para el control positivo; este último presentó una temperatura de fusión (*T_m*) de 77,5 °C, mientras que en las muestras estos valores fueron de 77 ± 0,5 °C, validándose así su identidad como amplicones de la región CP de PVY (Cuadro 1). La naturaleza viral de los amplicones de IC-RT-qPCR resultó positiva para PVY por secuenciación de Sanger, encontrándose niveles de identidad del 95 a 99 % con respecto a secuencias de PVY^{NTN} de Colombia previamente depositadas en GenBank por Gil et al. (2011) (ej.

JF939837, HQ335262 y HQ335259), mientras con las accesiones de PVY: KJ741195, KJ741026 y KJ741031.

Cuadro 1. Confirmación por RT-qPCR de la presencia del *Potato virus Y* (PVY) en tejidos foliares de plantas de tomate procedentes del departamento de Antioquia, Colombia

Muestra	Municipio de procedencia	Valor de Ct*	Valor de Tm**
IC-RT-qPCR (Post-ELISA)			
C-***		>35	
TM1.8	Marinilla	33,02	76,75
TM2.3	Marinilla	33,80	77,02
<u>TM2.11</u>	Marinilla	29,09	76,93
TM3.1	El Peñol	31,01	77,11
RT-qPCR (ARN total)			
C-		>35	
TM1A	Marinilla	>35	
TM1B	Marinilla	29,51	77,75
TM1C	Marinilla	29,79	77,57
TM2A	Marinilla	15,75	76,02
TM2B	Marinilla	28,17	77,84
<u>TM2C</u>	Marinilla	14,31	77,29
<u>TM3A</u>	El Peñol	23,92	78,02
TM3B	El Peñol	17,38	78,38
TM3C	El Peñol	27,50	77,02

* Ct corresponde al ciclo umbral de amplificación; Ct>35 representa resultados negativos en las pruebas de RT-qPCR. **Tm indica la temperatura de fusión, es decir aquella en la que el 50 % de la doble hélice de los amplicones se encuentran desnaturalizados. Las muestras subrayadas corresponden a los amplicones obtenidos por RT-qPCR que fueron secuenciados y confirmados como parte de la región que codifica para la cápside de PVY. ***C- son los controles negativos; los controles positivos de Agdia para IC-RT-qPCR presentaron valores de Ct = 23,02 y Tm = 77,57; mientras que para RT-qPCR fueron de Ct = 20,17 y Tm = 77,5

Detección de PVY por RT-qPCR. Con el uso de RT-qPCR a partir de ARN total se detectó el PVY en todas las muestras compuestas de los tres lotes de tomate evaluados, obteniéndose valores de Ct en el rango de 14,31 a 29,79 (Cuadro 1; Figura 2A). Estos valores fueron inferiores a aquellos encontrados para las pruebas de IC-RT-qPCR, lo que indica la obtención de un mayor título de genomas virales cuando se extrae directamente el ARN de los tejidos vegetales. A diferencia del TAS-ELISA, esta prueba detectó el PVY en muestras del primer lote, lo cual corrobora varios reportes en los que se indica que la RT-qPCR ofrece niveles superiores de sensibilidad, del orden de 10^4 a 10^8 veces, con respecto a pruebas de ELISA (Mumford et al., 2000; Bertolini et al., 2008). Así por ejemplo, específicamente para PVY, Kogovsek et al. (2008) en un estudio tendiente a diseñar pruebas de RT-qPCR para diferenciar aislamientos recombinantes de PVY^{NTN}, encontraron que las pruebas en tiempo real presentaban sensibilidades superiores entre

10^5 y 10^7 veces con respecto a las pruebas de ELISA comerciales, mientras que Medina et al. (2015) al evaluar la capacidad de las pruebas de RT-qPCR para detectar este virus en tubérculos-semilla de dos variedades de papa (ICA-Capiro y Criolla Colombia) en Antioquia, registraron que esta prueba detectó el PVY en el 80,6 % de las muestras, mientras que con TAS-ELISA tan sólo se encontró en el 37,5 % de éstas. La especificidad de los amplicones de RT-qPCR fue confirmada por el análisis de las curvas de desnaturalización utilizando la herramienta de HRM (*High Resolution Melting*), al encontrarse que los valores de Tm de todas las muestras se presentaban en el rango de $77 \text{ °C} \pm 1,5 \text{ °C}$, es decir, en valores cercanos al encontrado para el Tm del control positivo de Agdia ($77,5 \text{ °C}$) (Figura 2B). Sin embargo, la amplitud del rango de temperaturas de fusión, claramente indican la ocurrencia de diferentes variantes de PVY que están infectando plantas de tomate en el oriente Antioqueño. Tal como ocurrió para las pruebas de IC-RT-qPCR, la naturaleza de dos de los amplicones y del control

positivo fue además reconfirmada por secuenciación de Sanger (Accesiones KJ865800, KJ847046 y KJ847048, Identidad = 98-100 %).

Secuenciación NGS. La secuenciación NGS del transcriptoma de tomate generó una librería pareada de 5.571.097 *reads* (100 nt/*read*) para un total de 1.114.219.400 nt. Los análisis de mapeo contra genomas de referencia y de BLASTX identificaron la presencia de dos variantes de PVY (PVY_Var A y PVY_Var B) en este hospedero en proporción 3:2; cuyos genomas completos fueron ensamblados *de novo* a partir de 2.954 y 1.943 *reads* pareados, con un promedio de profundidad (número promedio de nucleótidos obtenidos para

cada sitio secuenciado del genoma) de 59,6X y 39,2X, para PVY_Var A (accesión KT290511) y PVY_Var B (accesión KT290512), respectivamente (Figura 3), según información presentada en las secuencias que fueron depositadas en GenBank. Para nuestro conocimiento y según se deriva de búsquedas en GenBank éstos son los primeros genomas completos de PVY obtenidos directamente a partir de plantas de tomate infectadas con este virus en América y el segundo en el mundo, luego de la accesión EU482153 de Italia, pues solamente se presentan registros de secuencias de PVY en tomate para algunas regiones codificantes como CP y NIb.

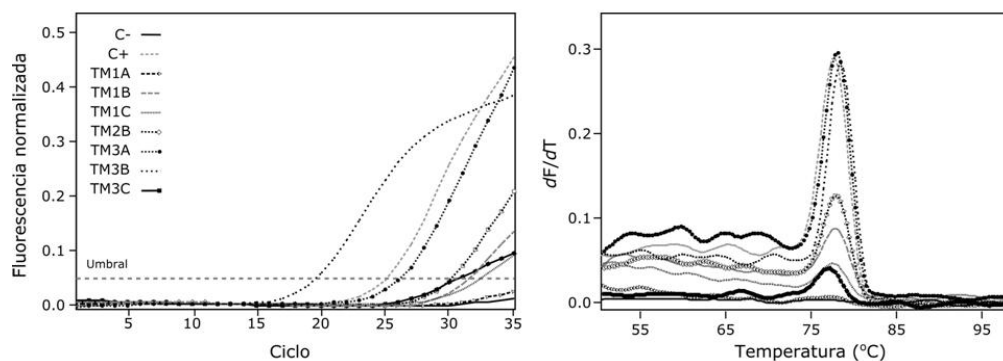


Figura 2. (A) Curvas de amplificación por RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores PVY-1 FP y PVY-1 RP para la detección de *Potato virus Y* (PVY) en tejidos foliares de tomate obtenidos en el oriente del departamento de Antioquia, Colombia. Las muestras TM2A y TM2C fueron evaluadas en otras corridas. (B) Perfiles de la curva de desnaturalización de amplicones específicos de PVY obtenidos por RT-qPCR

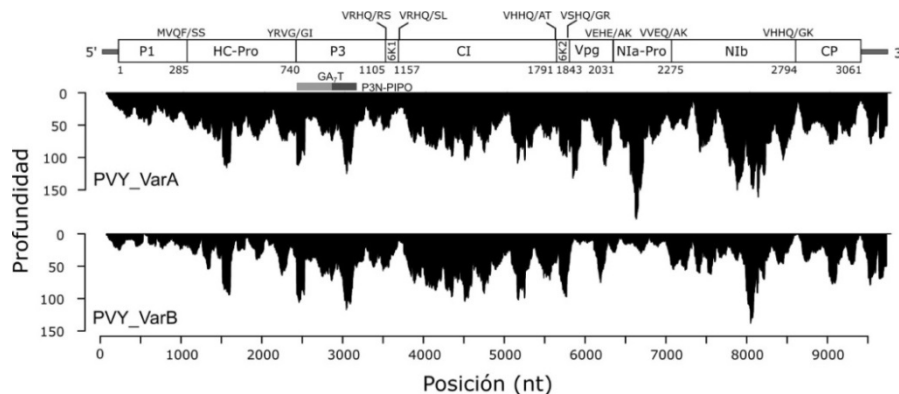


Figura 3. Profundidad de secuenciación obtenida mediante NGS para los genomas de dos variantes de PVY (VarA y VarB) que infectan plantas de tomate en el oriente del departamento de Antioquia, Colombia. Las posiciones de aminoácidos para los sitios de clivaje por proteasas virales que dan origen a las proteínas maduras de PVY son indicados con respecto a la poliproteína potyviral

Los genomas de las dos variantes de PVY encontradas tienen 9726 nt (Figura 3) y comparten

97,5 % de identidad en toda su secuencia de nt; aunque en la región que codifica para P1 la

identidad cae en algunos sitios hasta cerca del 88 % y presenta una identidad promedio de 93,9 % en nt y 94,37 % en aminoácidos (aa) (Figura 4). Dichos genomas presentan un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína de 3061 aa, flanqueado por regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' de 218 y 325 nt (excluyendo la cola de poli-A), respectivamente

(Figura 3), con un alto grado de conservación al presentarse solo una transición (T9643C) en la región 3' UTR (ver accesiones KT290511 y KT290512). En el extremo 5' UTR se detectan las secuencias específicas de *Potyvirus* denominadas como *potyboxes* A y B (Turpen, 1989) con las secuencias TCAATACAACAT en las posiciones 43-54 y TCAAACAA entre los sitios 100 y 107.

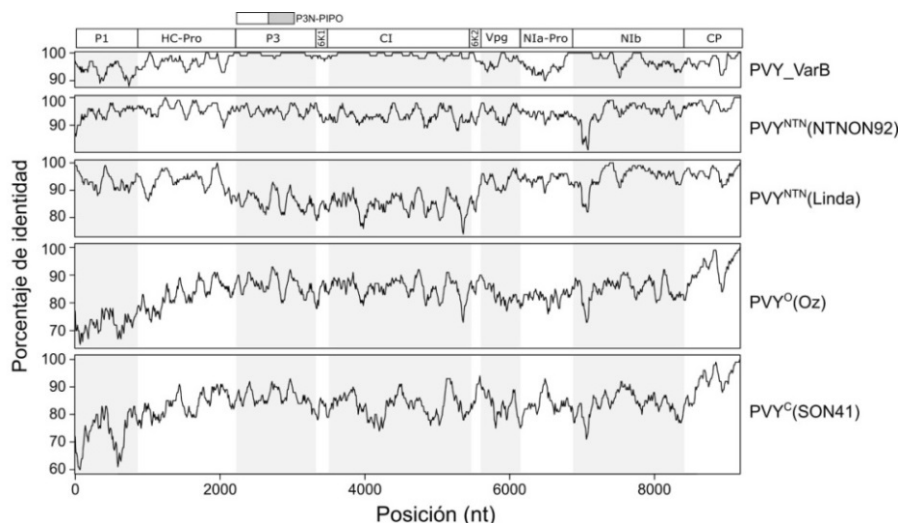


Figura 4. Niveles de identidad entre la variante A (representada por el diagrama del genoma en la parte superior) de PVY y la variante B encontradas en plantas de tomate en el oriente del departamento de Antioquia, Colombia, y otras cepas de PVY que representan diferentes razas de este virus

La región codificante para la poliproteína corresponde a las posiciones 219-2404 de los dos genomas secuenciados en este trabajo. En esta región se encuentran localizadas la mayoría de las sustituciones entre las dos variantes de PVY (214 transiciones y 27 transversiones). Entre ambas variantes, la poliproteína comparte una identidad global del 98,7 % a nivel de aa y presenta sitios de corte proteolíticos con motivos conservados similares a los reportados por Adams et al. (2005a) y ubicados en las posiciones 284, 740, 1105, 1157, 1791, 1843, 2031, 2275 y 2794, para dar origen a cada una de las proteínas maduras de PVY: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb y CP (Figura 3).

La proteasa P1 (284 aa) es la proteína más variable de estos genomas, con un 94 % de identidad a nivel de aa entre ambas variantes. Los bajos niveles de conservación de P1 han sido previamente observados en el género *Potyvirus* (Rohozková y Navrátil, 2011) e incluso Adams et al. (2005b), señalan la ocurrencia de niveles de

identidad en esta región tan bajos como 41,4 % entre miembros de una misma especie potyviral. La proteína HC-Pro (456 aa) comparte un porcentaje de identidad del 99 % entre ambas cepas y presenta cinco cambios de aa (expresados en nomenclatura IUPAC): R16Q, N130S, C195S, S247A y R269K. Contiene los motivos conservados FRNK (residuos 463-466) e IGN (residuos 531-533) asociados a la supresión del silenciamiento de genes y a la replicación viral, respectivamente (Revers y García, 2015). El ORF correspondiente a P3 contiene la secuencia GA₇T en la posición (2949-2957) que da origen a la proteína P3N-PIPO (247 aa) resultante de un cambio en el marco de lectura identificado previamente por Chung et al. (2008); esta región tiene un codón de parada ocre (UAA) en la posición 3179. La P3 (365 aa) presenta un 99,4 % de identidad, con solo dos cambios: K183R y R206Q. La proteína de inclusión cilíndrica CI (634 aa) es una de las más conservadas entre especies de *Potyvirus* según lo reporta Adams et

al. (2005b) y por tanto es propuesta como base para la identificación de especies en este grupo, cuando no sea posible la secuenciación del genoma completo. En este trabajo, solo un cambio (I427T) fue observado entre las dos variantes de PVY identificadas en plantas de tomate.

La región CI contiene los motivos DECH (residuos 1331-1334) y GSGKSTGLP (residuos 1245-1253) típicos de la superfamilia de helicasas SF2 (Revers y García, 2015). Para la proteína viral de unión al genoma Vpg (188 aa) se observan dos cambios: M115L y R105K y un nivel de identidad entre las variantes del 96,8 % en nt y 98,9 % en aa. Esta proteína está involucrada en diferentes pasos del ciclo de infección potyviral, incluyendo su replicación y movimiento sistémico (Rajamäki et al., 2014). NIa-Pro (244 aa) presenta cinco cambios (I21V, I104V, K119R, G184E, D194N), entre las dos variantes de PVY aquí caracterizadas y 98 % de identidad. NIa-Pro, la cisteína proteasa responsable del corte en los sitios P3/6K1, 6K1/CI, CI/6K2, 6K2/VPg, VPg/NIa-Pro, NIa-Pro/NIb, NIb/CP con secuencia de reconocimiento V-X-(HE)-(QE) (Adams et al., 2005a). NIb (519 aa), la replicasa viral, tiene un 99 % de identidad a nivel de aa entre las dos variantes, con las siguientes sustituciones K233R, S364N, H429Y, D487N, R496K, F509L y presenta el motivo GDD conservado en las RdRp virales (residuos 2626 - 2628) y la secuencia de localización nuclear II (NSLII) TPISTPDGTIVKKFRGNNSGQPSTV (Revers y García, 2015). Finalmente, la proteína de la cápside (CP) (267 aa) tiene tres variaciones D3E, N11T y N138D y niveles de identidad de 96,5 % en nt y 98,8 % en aa, además de la presencia del motivo DAG (residuos 2780-2782) involucrado en la transmisión por áfidos de PVY (Revers y García, 2015).

Los análisis de variación realizados entre las secuencias de estas dos variantes con respecto a cepas representativas de diferentes razas de PVY reportadas en el mundo indican niveles de identidad de nt del 94,5 % (97,6 % en aa) y 90 % (94,5 % en aa) con respecto a aquellas de PVY^{NTN} NTNON92 de Japón y Linda de Alemania, respectivamente; siendo las regiones del genoma más variables, aquellas que codifican para CI y un *hot-spot* ubicado cerca al extremo 5' de NIb (Figura 4). Por su parte, los niveles promedio de identidad entre las cepas de PVY de tomate y representantes de PVY^C y PVY^O son del 83,3 % (90,1 % en aa) y 83,5 % (90,2 % en aa)

respectivamente; con las regiones que codifican para la proteasa P1 las más disímiles, con niveles de identidad entre 60 y 80 % (Figura 4).

Análisis filogenéticos. El árbol filogenético generado para la poliproteína de PVY presentó cuatro clados principales, correspondientes a los linajes que representan las razas PVY^{N/NTN}, PVY^{N:O}, PVY^C y PVY^O. El clado de PVY^{N/NTN} incluyó cepas tanto del tipo principal N como de la variante NTN y se presentó subdividido en dos grupos con 100 % de soporte del análisis *bootstrap*, siendo el primero de ellos el que albergó las dos secuencias obtenidas en este trabajo (Figura 5A). De forma interesante, el aislamiento LYE84.2 de Islas Canarias (España) también obtenido en tomate por Abad y Jordá (2000), se ubicó en el clado de PVY^C y se presentó distantemente relacionado con los aislamientos del presente trabajo sobre este hospedante.

Por otra parte, el árbol filogenético realizado para CP, presentó una topología similar al anterior, aunque las cepas de PVY^O y PVY^{N:O} se ubicaron en un solo clado, dado que las regiones de recombinación entre éstas se ubican en otras regiones del genoma diferentes a CP (Karasev y Gray, 2013). Los aislamientos de PVY secuenciados en este trabajo, nuevamente se ubicaron en el clado representativo de PVY^{N/NTN}, pero en esta ocasión las dos variantes se ubicaron en subclados separados, aunque únicamente conformados por aislamientos de este virus previamente reportados por Gil et al. (2011) en cultivos de papa de diferentes regiones de Colombia (Figura 5B).

Estos resultados confirman los hallazgos de la ocurrencia de variantes únicas de PVY en la región Andina de Colombia (Gil et al. 2011; Henao et al., 2013) y ponen de manifiesto la posible patogenicidad cruzada de estos aislamientos entre diferentes hospedantes de plantas solanáceas que comparten agroecosistemas en las regiones montañosas de Antioquia, situación que requiere ser evaluada experimentalmente, de manera que puedan valorarse sus implicaciones epidemiológicas y para el manejo de las virosis causadas por PVY en las zonas altoandinas. Finalmente, la secuencia del control positivo comercial empleado en los análisis de TAS-ELISA y RT-qPCR se ubicó en el clado PVY^O, lo que coincide con su origen en Estados Unidos (Agdia, Número LPC 20001) y confirma su utilidad en los análisis aquí realizados.

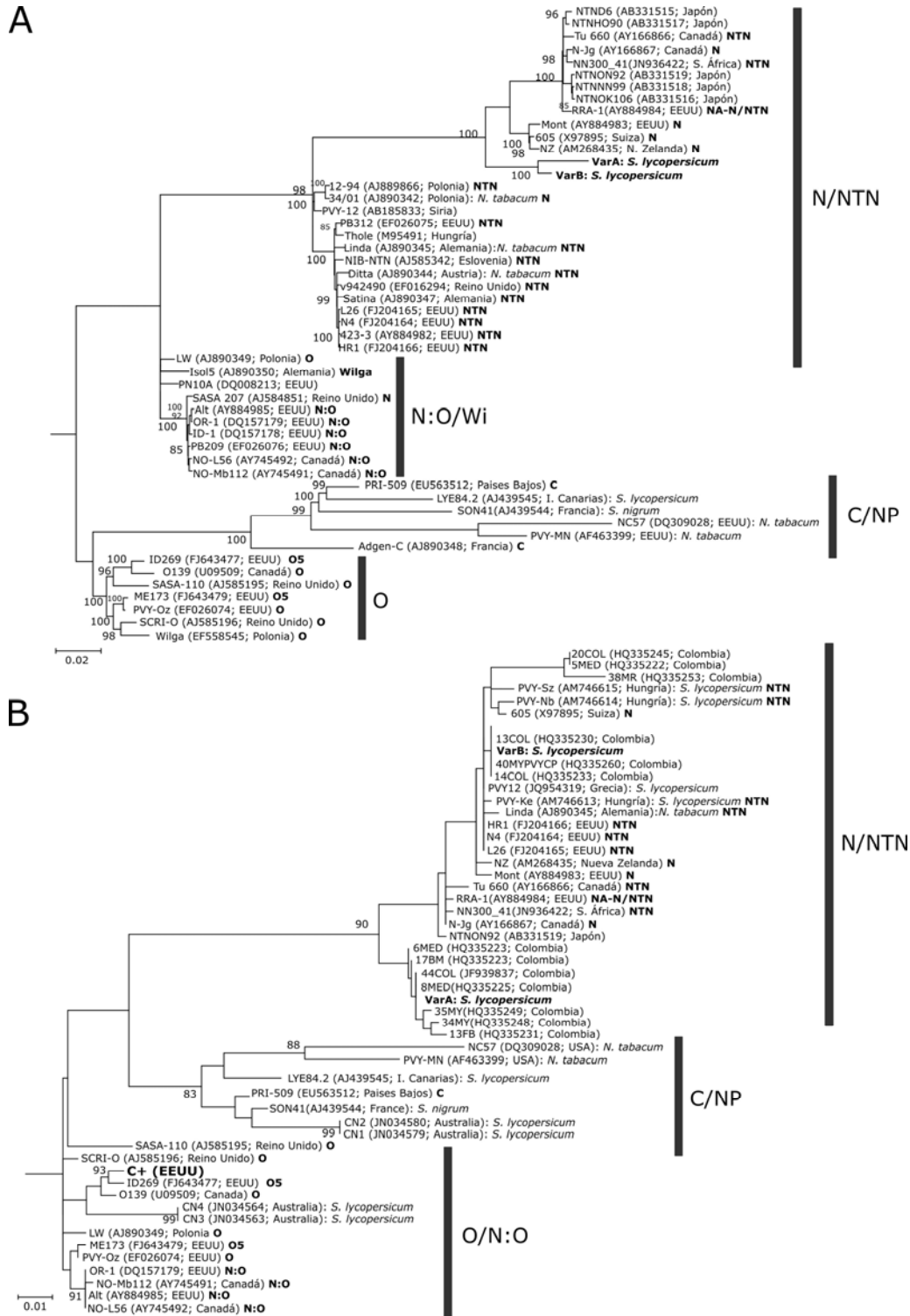


Figura 5. Árbol filogenético basado en secuencias de las regiones que codifican para la poliproteína (A) y la cápside viral de aislamientos del *Potato virus Y* (PVY) (B), procedentes de cultivos de tomate del oriente de Antioquia, Colombia, y otros lugares del mundo. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap* >80 % y las denominaciones externas se refieren a las razas que representan los clados principales definidos en los análisis filogenéticos. Las muestras resaltadas corresponden a las secuenciadas en este trabajo

De estos análisis filogenéticos se evidencia que los aislamientos de PVY de tomate presentan diferentes genotipos (PVY^{N/NTN}, PVY^C y PVY^O). Esta situación coincide con los reportes de literatura que señalan haber encontrado linajes diversos de PVY en este hospedero. Así por ejemplo, Mascia et al. (2010), indican la ocurrencia de una cepa de PVY^C causante de necrosis foliar de tomate en Italia, que presentaba una región del genoma recombinante con una cepa ordinaria de PVY (PVY^O) y que además causaba lesiones necróticas en los frutos, afectando drásticamente su calidad comercial. Ibaba y Gubba (2011) en un estudio tendiente a caracterizar la variación de PVY en KwaZulu-Natal (Sudáfrica) reportaron que las plantas de tomate eran infectadas por cepas de PVY^O; mientras que Aramburu et al. (2006) en España, encontraron cepas de PVY asociadas a PVY^N, PVY^{NTN} y PVY^{NP} en cultivos de tomate del nororiente de este país. Tal como lo señalan éstos últimos autores, el tomate parece ser un hospedero poco restrictivo para el PVY, por lo que es posible y frecuente encontrar gran diversidad genética en los aislamientos de este virus que lo infectan e incluso con ocurrencia de infecciones mixtas y presencia de cepas recombinantes, lo que complica aún más la adopción de medidas de manejo y el desarrollo de programas de mejoramiento genético.

Hasta el momento la ocurrencia de PVY en cultivos de tomate de Colombia se ha registrado de forma marginal y por asociación con reportes de la infección en cultivos de otros países (Jaramillo et al., 2007), e incluso trabajos como los realizados por Morales et al. (2009) sobre los virus del tomate en Colombia sólo reportan la presencia del potyvirus *Pepper deforming mosaic virus* (PepDMV) en este cultivo. Sin embargo, en este trabajo la detección de PVY mediante pruebas de TAS-ELISA y RT-qPCR en diferentes plantas de tomate de cultivos del oriente Antioqueño suponen que su incidencia es mayor a lo que hasta ahora se ha considerado en Colombia. Adicionalmente, la identificación por NGS de los genomas completos de cepas necrosantes de PVY indican lo que se ha demostrado en países tales como Brasil (Lourenção et al., 2005) y España (Aramburu et al., 2006), que la presencia de síntomas como mosaicos foliares severos, manchas cloróticas y necróticas en los frutos,

pueden ser erróneamente asociados a otros agentes etiológicos en cultivos de tomate. Por estas razones, será de gran interés en el corto plazo realizar análisis de incidencia utilizando técnicas altamente sensibles como la de RT-qPCR en diferentes regiones cultivadoras de tomate de Colombia y otros países andinos; así como adelantar estudios biológicos de los efectos de cepas necrosantes y no necrosantes de PVY en las variedades de tomate cultivadas en esta región.

CONCLUSIONES

Se encontró el PVY en el 13,3 % de 45 muestras foliares de tomate var. Chonto procedentes de tres lotes de cultivo del oriente de Antioquia, Colombia. Este resultado, obtenido mediante pruebas de TAS-ELISA fue confirmado por pruebas de RT-qPCR, las que detectaron los amplicones de este virus entre los ciclos umbral (Ct) 14,31 y 33,8, y con valores de Tm de $77 \pm 1,5$ °C.

Los análisis bioinformáticos de los resultados de secuenciación de nueva generación del transcriptoma de tejido foliar de tomate permitieron identificar la ocurrencia de dos variantes del PVY en el oriente de Antioquia. Sus genomas tienen un tamaño de 9726 nt, comparten 97,5 % de identidad y presentan afinidad filogenética con genotipos de las razas necrosantes de este virus (PVY^N y PVY^{NTN}). Para nuestro conocimiento, este reporte constituye el primero en América de secuencias de genomas completos de PVY que infectan en forma natural el tomate.

AGRADECIMIENTO

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia por el financiamiento a este trabajo (Proyecto 32098).

LITERATURA CITADA

1. Abad, P. y C. Jordá. 2000. Characterization of Potato Y potyvirus isolates from tomato crops in Islas Canarias (Spain). OEPP/EPPO Bulletin 30: 281-287.
2. Adams, M.J., J.F. Antoniw y F. Beudoin. 2005a. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. Molecular Plant Pathology 6: 471-487.

3. Adams M.J., J.F. Antoniw y C.M. Fauquet. 2005b. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* 150: 459-479.
4. Aramburu, J., L. Galipienso y M. Matas. 2006. Characterization of *Potato virus Y* isolates from tomato crops in northeast Spain. *European Journal of Plant Pathology* 115: 247-258.
5. Ayala, M., P. González, P. Gutiérrez, J. 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.
6. 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.
7. Chung, B., W. Miller, J. Atkins y A. Firth. 2008. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 5897-5902.
8. 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.
9. Gil, J., J. 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.
10. Gish, W. y D. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3: 266-272.
11. Glais, L., M. Tribodet y C. Kerlan. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. *Archives of Virology* 147: 363-378.
12. 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.
13. Ibaba, J. y A. Gubba. 2011. Diversity of *Potato virus Y* isolates infecting solanaceous vegetables in the province of KwaZulu-Natal in the Republic of South Africa. *Crop Protection* 30: 1404-1408.
14. Jaramillo, J., V. Rodríguez, M. Guzmán, M. Zapata y T. Rengifo. 2007. Manual Técnico: Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Editorial CTP. Medellín, Colombia. 314 p.
15. Jaramillo, M., P. Gutiérrez, L. Lagos, J. 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.
16. Karasev, A. y S. Gray. 2013. Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato. *Annual Review of Phytopathology* 51: 571-586.
17. Kerlan, C. 2008. Potato viruses. In: B. Mahy y M. van Regenmortel (eds.). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Academic Press. Oxford, Reino Unido. pp. 458-471.
18. Kogovsek, P., L. Gow, M. Pompe-Novak, K. Gruden, G.D. Foster, N. Boonham, y M. Ravnkar. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods* 149: 1-11.
19. Langmead, B. y S. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.
20. Lourenção, A., W. Siqueira, A. Melo, S. Palazzo, P. Melo y A. Colariccio. 2005. Resistência de cultivares e linhagens de tomateiros a Tomato chlorotic spot virus e a Potato virus Y. *Fitopatologia Brasileira* 30:609-614.
21. Mascia, T., M.M. Finetti-Sialer, F. Cillo y D. Gallitelli. 2010. Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of *Potato virus Y* associated with a tomato necrotic disease occurring in Italy. *Journal of Plant Pathology* 92: 131-138.
22. Medina, H.C., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2015. Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS-ELISA y qRT-PCR en Antioquia (Colombia). *Bioagro*

- 27:83-92.
23. Morales, F., P. Tamayo, M. Castaño, C. Olaya, A. Martínez y A. Velasco. 2009. Enfermedades virales del tomate (*Solanum lycopersicum*) en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 33: 23-27.
24. Morel, C., P. Gognalons, L. Guilbaud, C. Caranta, K. Gebre-Selassie, G. Marchoux y M. Jacquemond. 2000. Biological and molecular characterisation of two tomato strains of *Potato virus Y* (PVY). *Acta-Physiologiae-Plantarum* 22: 336-343.
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. Nava, A., G. Trujillo, D. Chirinos y G. Rivero. 1997. Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Venezuela. II. Estados andinos (Mérida, Táchira y Trujillo). *Revista de Facultad de Agronomía* 14: 611-624.
27. Ogawa, T., Y. Tomitaka, A. Nakagawa y K. Ohshimab. 2008. Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research* 131: 199-212.
28. Revers, F. y J. García. 2015. Molecular biology of potyviruses. *Advances in Virus Research* 92: 101-199.
29. Rajamäki, M., J. Streng y J. Valkonen. 2014. Silencing suppressor protein VPG of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27: 1199-1210.
30. Rohozková, J. y M. Navrátil. 2011. P1 peptidase-a mysterious protein of family *Potyviridae*. *Journal of Biosciences* 36: 189-200.
31. 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.
32. 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.
33. Shukla, D., C. Ward y A. Brunt. 1994. The *Potyviridae*. CAB International. Wallingford, Reino Unido.
34. Singh, R., J. Valkonen, S. Gray, N. Boonham, R. Jones, C. Kerlan y J. Schubert. 2008. Brief review: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of Virology* 153:1-13.
35. Singh, M., R. Singh, M. 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.
36. Soler, S., J. Prohens, C. López, J. Aramburu, L. Galipienso y F. Nuez. 2010. Viruses infecting tomato in Valencia, Spain: occurrence, distribution and effect of seed origin. *Journal of Phytopathology* 158: 797-805.
37. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
38. Thomas, J. y D. McGrath. 1988. Inheritance of resistance to *Potato virus Y* in tomato. *Australian Journal of Agricultural Research* 39: 475-479.
39. Turpen, T. 1989. Molecular cloning of a *Potato virus Y* genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *Journal of General Virology* 70: 1951-1960.
40. Villamil-Garzón, A., W. 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.
- Wetzel, T., T. Candresse, G. Macquaire, M. Ravelonandro y J. Dunez. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 39: 27-37.