

SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DEL *Potato yellow vein virus* (PYVV) Y DESARROLLO DE UNA PRUEBA MOLECULAR PARA SU DETECCIÓN

Daniela Álvarez-Yepes¹, Pablo A. Gutiérrez-Sánchez¹ y Mauricio Marín-Montoya¹

RESUMEN

El *Potato yellow vein virus* (PYVV) es uno de los virus más limitantes en cultivos de papa de la región andina. Es transmitido por moscas blancas y por tubérculos-semilla, por lo que la disponibilidad de métodos de detección resulta fundamental para su manejo. En este estudio se secuenció completamente el genoma de un aislamiento de PYVV de *Solanum phureja* en La Unión (Antioquia, Colombia), utilizando la secuenciación de nueva generación (NGS) y con base en dicha secuencia se diseñaron tres pares de cebadores para la detección del virus mediante RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). Estas pruebas fueron evaluadas en 12 muestras asintomáticas y en cuatro sintomáticas. El genoma del virus consistió en tres segmentos de ARN con tamaños de 8032, 5330 y 3891 nt y 10 marcos abiertos de lectura (ORF). Al comparar los niveles de identidad de los tres segmentos con aquellos del único genoma disponible en GenBank (PRJNA14924), se encontraron niveles superiores al 99,2 %. Los cebadores para la cápside (CP) permitieron la detección del PYVV por RT-qPCR en cinco de las muestras foliares asintomáticas (Ct=16,55-29,34; Tm=77,3-77,8 °C) y en las cuatro muestras con amarillamiento de venas. Los cebadores para RT-PCR convencional amplificaron los productos esperados de CP (496 pb) y de la cápside menor (793 pb) en las muestras sintomáticas, pero no en aquellas asintomáticas. Se sugiere el uso de RT-qPCR en programas de certificación de tubérculo-semilla de papa y de RT-PCR convencional para apoyar los análisis filogenéticos y de variabilidad molecular del virus.

Palabras clave adicionales: *Crinivirus*, NGS, RT-PCR en tiempo real, secuenciación masiva, *Solanum phureja*

ABSTRACT

Genome sequencing of *Potato yellow vein virus* (PYVV) and development of a molecular test for its detection

Potato yellow vein virus (PYVV) is one of the most limiting viruses of potato crops in the Andean region. This virus is transmitted by whiteflies and infected tuber-seeds making the availability of adequate detection tools a very important need for management of the disease. In this study, the genome sequence of a PYVV isolate was obtained using the next generation sequencing (NGS) of infected leaves from a *Solanum phureja* plant in La Unión (Antioquia, Colombia) and, based on the genome data, three primer pairs for PYVV detection by RT-PCR and RT-qPCR were designed and tested in asymptomatic (12) and symptomatic (4) samples. The PYVV genome comprised three RNA segments of 8032, 5330 and 3891 nt containing a total of ten open reading frames. Comparison with the only PYVV genome sequence (PRJNA14924) available revealed an identity above 99.2 %. Primers targeting the coat (CP) sequence detected PYVV by RT-qPCR in five asymptomatic leaf samples (Ct=16.55-29.34; Tm=77.3-77.8 °C) and in the four samples showing vein-yellowing symptoms. Detection by RT-PCR resulted in fragments of the expected size for both the CP (496 bp) and the minor coat (793 bp) in symptomatic leaves. No amplification products were observed in asymptomatic material using these primers. We propose the use of RT-qPCR in tuber-seed certification programs and RT-PCR in phylogenetic and molecular variability studies of PYVV.

Additional key words: *Crinivirus*, deep sequencing, NGS, real-time RT-PCR, *Solanum phureja*

INTRODUCCIÓN

El *Potato yellow vein virus* (PYVV) (*Crinivirus*, *Closteroviridae*) es uno de los virus más incidentes y limitantes en la producción de papa (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena* y *S. phureja*) en la región andina suramericana

(Salazar et al., 2000; Guzmán et al., 2012). Este virus fue inicialmente registrado en el departamento de Antioquia (Colombia) en 1943 (Alba, 1950) y actualmente se encuentra en todas las regiones productoras de papa de Colombia, además de Venezuela, Ecuador y Perú (Salazar et al., 2000; Hernández y Guzmán, 2014; Osorio et

Recibido: Junio 14, 2016

Aceptado: Diciembre 27, 2016

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

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

al., 2016). Se ha encontrado experimentalmente que la infección de PYVV en *S. phureja* puede causar reducciones en el rendimiento y número de tubérculos en niveles de entre 33-48 % y 48-57 %, respectivamente (Guzmán et al., 2012); mientras que en *S. tuberosum* subsp. *andigena* dichas reducciones se estiman entre el 25 y 50 % (Salazar et al., 2000).

En las plantas de papa este virus causa síntomas de amarillamiento de venas secundarias y terciarias, seguidos de un color amarillo intenso en la lámina foliar, y es reconocido como un virus restringido al floema. Además de papa, se ha encontrado que el PYVV puede infectar tomate (*S. lycopersicum*) y algunas plantas arvenses como *Polygonum* sp., *Tagetes* sp., *Rumex* sp., *Malva* sp. y *Catharanthus roseus* (Salazar et al., 2000; Guzmán y Rodríguez, 2010). El PYVV es transmitido de manera semi-persistente por moscas blancas de la especie *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y además es de fácil dispersión por tubérculos-semilla, pero no mecánicamente o por semilla sexual (Salazar et al., 2000; Guzmán et al., 2013a).

Los viriones del PYVV consisten en tres partículas filamentosas de 650-900 nm que albergan tres moléculas de ARN de cadena sencilla positiva de 8035 nt (ARN1), 5399 nt (ARN2) y 3892 nt (ARN3). El ARN1 codifica para un pequeño péptido con un dominio transmembranal (proteína p7) y para diferentes proteínas asociadas a la replicación del virus incluyendo una papain-proteasa (L-Pro), metiltransferasa (MTR), helicasa (HEL) y una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp). El ARN2 codifica para cinco productos: una chaperona homóloga a la proteína de choque térmico 70 (HSP70h), para la proteína estructural p60, para las proteínas de función desconocida p7 y p10, y para la cápside viral (CP). Por su parte, el ARN3 codifica para las proteínas de función desconocida p4 y p26 y para la cápside menor (CPm) del virus (Livieratos et al., 2004; King et al., 2012).

Diferentes estudios moleculares tendientes a evaluar los niveles de variación del PYVV empleando análisis directos como la secuenciación Sanger e indirectos como RFLPs (*restriction fragment length polymorphism*) o SSCP (*single strand conformation polymorphism*) de secuencias del gen CP indican que existen

bajos niveles de diversidad genética entre aislamientos de este virus procedentes de diversos países de Suramérica (Offei et al., 2004; Rodríguez et al., 2010; Gil et al., 2011); sin embargo, trabajos más recientes en los que se analizaron secuencias de Cpm han encontrado la existencia de mayores niveles de variación en esta región (diversidad nucleotídica $d=0,064$) que los previamente reportados para CP y Hsp70h ($d=0,010$); e incluso se ha registrado la ocurrencia de eventos putativos de recombinación en la región Cpm de PYVV (Chaves et al., 2014; Cubillos y Guzmán, 2015).

El PYVV es considerado como un virus reemergente en Suramérica (Salazar, 2006) y cuarentenario para Estados Unidos (USDA-APHIS) y Europa (EPPO) (Guzmán et al., 2013b), por lo que la disponibilidad de métodos eficientes, altamente sensibles y específicos para la detección de este virus resulta un aspecto fundamental para evitar su dispersión a otras regiones del mundo; así como para apoyar los programas de certificación de tubérculo-semilla por su sanidad viral en las regiones donde ya se encuentra presente. En este sentido, diferentes metodologías se han diseñado para la detección del PYVV incluyendo el diagnóstico basado en pruebas de RT-PCR (Offei et al., 2004; Guzmán et al., 2006, Guzmán et al., 2010), NASH (Salazar et al., 2000) y RT-qPCR (López et al., 2006, Hernández et al., 2014). Además, recientemente, se obtuvo un anticuerpo específico (denominado anti-PYVV) para la detección serológica de este virus y fue efectivamente evaluado en pruebas de inmunopresión (IMI) utilizando diferentes órganos de plantas de papa, como pecíolos, folíolos o tubérculos (Guzmán et al., 2013b).

A pesar de la gran importancia económica y cuarentenaria que representa el PYVV para el cultivo de la papa, hasta el momento sólo existe un genoma completamente secuenciado de un aislamiento de la región de Cajamarca en Perú (Livieratos et al., 2004). En Colombia, recientemente, utilizando la secuenciación de nueva generación (NGS) de micro-ARNs (siRNAs), Villamil et al. (2014) lograron obtener el 46 % del ARN1 y el 76 % de los ARN2 y ARN3 de un aislamiento de PYVV de Chipaqué (Cundinamarca); sin embargo, dichas secuencias fueron depositadas en GenBank sin anotación específica. Con el fin de aumentar la información

de secuencias disponibles para PYVV, el objetivo del presente estudio fue secuenciar completamente los tres segmentos del genoma de un aislamiento de este virus procedente de una planta sintomática de *S. phureja* obtenida en el municipio de La Unión (Antioquia), utilizando el sistema NGS Illumina HiSeq-2000, como base para el diseño de cebadores específicos útiles para la detección de PYVV en pruebas de RT-qPCR con el sistema SYBR Green y de RT-PCR convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Para la secuenciación del genoma de PYVV se obtuvo una muestra compuesta de folíolos de una planta de *S. phureja* cv. Criolla Colombia con síntomas de amarillamiento de venas en un cultivo del municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). Los cebadores diseñados fueron evaluados en muestras obtenidas en cuatro lotes de cultivo de *S. phureja* de los municipios de Entreríos (un lote), Marinilla (dos lotes) y El Peñol (un lote) (Antioquia, Colombia). En cada lote se obtuvieron tres muestras asintomáticas y una sintomática, para un total de 16 muestras evaluadas.

Secuenciación NGS. El ARN total del tejido foliar fue extraído utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo), a partir de 100 mg de tejido macerado con nitrógeno líquido, siguiendo las instrucciones del fabricante y eluido en 50 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Su concentración y pureza fueron determinadas por lecturas de absorbancias a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo). Con el fin de eliminar el ARN ribosomal, las muestras de ARN total fueron tratadas con el kit TruSeq Stranded Total RNA - Ribo-Zero Plant (Illumina) y evaluado su número de integridad (RIN) en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Posteriormente, se procedió a la síntesis de las librerías de ADN copia (ADNc) con el kit TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina) y a la secuenciación masiva en un equipo HiSeq-2000 (Illumina) de la compañía Macrogen. Una vez obtenidas las secuencias, se removieron las bases de baja calidad (Phred <30) utilizando el programa SeqTK (<https://github.com/lh3/seqtk>). Las lecturas de secuencias o *reads* correspondientes al genoma de PYVV fueron identificadas por mapeo contra los tres segmentos

del único genoma completo disponible en GenBank para este virus (PRJNA14924 - ARN1: NC_006061, ARN2: NC_006062 y ARN3: NC_006063) utilizando el programa Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012). La anotación de los marcos abiertos de lectura (ORF) del genoma se realizó por comparaciones con las bases de datos moleculares con BLASTX (Gish y States, 1993) y el ensamblaje final fue realizado con rutinas propias en lenguaje de programación Perl.

Diseño de cebadores para RT-qPCR. Con base en la secuencia obtenida en el estudio para el ARN2 por NGS, se diseñó el par de cebadores PYVV_F_CP (5'-TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG-3') y qPYVV_R_CP (5'-AGG TCT CAG GAT CTG GAT CAA CT-3') que amplifican un fragmento de la región CP de 115 pb ubicado entre las posiciones 4493 y 4608 de este segmento genómico. Estos cebadores se evaluaron en pruebas de RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I, a partir de ARN total extraído con el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo) en las 12 muestras asintomáticas y en las cuatro sintomáticas. Las condiciones de amplificación fueron aquellas reportadas por Medina et al. (2015), siendo definidas como muestras positivas las que presentaron valores de ciclo umbral (Ct) menores de 35 y amplicones con temperatura de fusión (Tm) de ± 1 °C con respecto al control positivo (muestra foliar sintomática utilizada en NGS). Todas las reacciones de RT-qPCR también incluyeron un control negativo libre de cDNA viral. La naturaleza viral de cuatro de los amplicones que cumplieron estas condiciones y del control positivo fue reconfirmada por secuenciación de Sanger.

Diseño de cebadores para RT-PCR convencional. Con base en las secuencias obtenidas en el estudio para el ARN2 de PYVV se diseñaron los cebadores PYVV_F_CP (el mismo utilizado para RT-qPCR) y PYVV_R_CP (5'-AGT TGC TGC ATT CTT GAA CAG G-3') que amplifican un fragmento de 495 pb en la región CP, ubicado entre las posiciones 4493 y 4988; mientras que se diseñaron los cebadores PYVV_F_MCo (5'-GAA CTC TTG ACC CAT CCA GC-3') y PYVV_R_MCo (5'-GTG TTC GGA CTG TTC AAT GCC-3') para amplificar un fragmento de 803 pb ubicado entre las posiciones 2087 y 2890, de la región que codifica para CPm

en el ARN3. Las reacciones de RT-PCR se realizaron en dos pasos siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo); para la retrotranscripción se empleó un volumen de 20 µL que contenía 200 U de la enzima Maxima Reversa Transcriptasa (Thermo), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 pmol del primer reverso, 20 U de inhibidor de RNasa (RiboLock, Thermo) y 2 µL del ARN total. Las reacciones se incubaron en un termociclador T3 (Biometra) a 65 °C por 5 min, 50 °C por 30 min y 85 °C por 5 min (para inactivar la enzima). El PCR se adelantó en 25 µL de volumen que incluían 17,8 µL de agua, 1X buffer de enzima (10X), 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq ADN polimerasa (Thermo), 1 µL de ADN copia (ADNc) y 0,2 µM de cada par de cebadores. El programa de amplificación se inició a 95 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 50 °C por 45 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. El tamaño de los amplicones fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa al 1,8 %, suplementado con GelRed 1X (Biotium, EEUU), y visualizado en un equipo Bio Doc Analyze (Biometra). Posteriormente, al menos tres amplicones, del tamaño esperado para cada par de cebadores evaluado, fueron purificados directamente del gel mediante el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo) y secuenciados por el método de Sanger en ambos sentidos en un equipo ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen.

Las secuencias obtenidas para las regiones CP y CPM fueron utilizadas como base para realizar análisis filogenéticos a partir de su alineamiento con respecto a secuencias de cepas de PYVV disponibles en GenBank y utilizando como grupo externo de análisis las secuencias del crinivirus *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV). Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal W y fueron empleados para la generación de matrices de porcentajes de identidad de nucleótidos para ambas regiones. Dichos alineamientos fueron la base de los análisis de agrupamiento con el algoritmo de máxima verosimilitud y el modelo Jukes-Cantor con el programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuenciación NGS. La secuenciación NGS del transcriptoma de tejido foliar de *S. phureja* con

síntomas de amarillamiento de venas generó una librería pareada de 23.986.627 *reads* (100 nt/*read*), para un total de 4.797.325.400 nt. Las secuencias completas de los tres segmentos genómicos de PYVV presentaron tamaños y niveles de profundidad de ARN1: 8032 nt y 1785x; ARN2: 5330 nt y 4347x, y ARN3: 3891 nt y 3834x (Figura 1). Al evaluar los niveles de identidad de dichos segmentos con las secuencias del único genoma de PYVV completamente secuenciado y disponible en GenBank (Cajamarca, Perú), se encontraron niveles superiores al 99,2 %, presentándose 38, 40 y 21 cambios entre ambos genomas para los segmentos ARN1, ARN2 y ARN3, respectivamente. El primer segmento de ARN tiene un ORF con dos regiones (1a y 1b) relacionado con el módulo de replicación del virus en el que se encontraron los dominios conservados para una proteasa L-Pro (YP_054415) de 408 residuos, una MTR viral (pfam01660, dominio: 472-786 nt), una HEL de ARN viral de la superfamilia 1 (pfam01443, dominio 1672-1936 nt) y de la RdRp (pfam00978, dominio: 60-496 nt). Cerca al extremo 3' terminal, este segmento presenta un segundo ORF que codifica para una proteína putativa hidrofóbica de 61 residuos denominada p7. Los niveles de identidad de las secuencias de aminoácidos de las proteínas para las que codifica este segmento de ARN con respecto a aquellas del genoma de referencia son de 99 y 98 % para la poliproteína de replicación y p7, respectivamente.

El ARN2 presentó los cinco ORF reportados por King et al. (2012) como parte del arreglo general de los genomas de los miembros de la familia *Closteroviridae* (Hsp70h, p7, p60, p10 y CP), siendo identificados los motivos conservados para la proteína chaperona Hsp70h (70-kDa, pfam00012) en la posición 6-630; p60, que aparentemente participa en el ensamblaje de las regiones terminales del virión y además tiene un dominio homólogo a Hsp90 (pfam03225) en la posición 7-515, y la proteína de la cápside (CP) de closteroviridos (pfam01785, posición 67-253). Por su parte, p7 y p10 corresponden a pequeñas proteínas putativas cuya función no se conoce hasta el momento, aunque se ha encontrado que la primera es similar a una proteína también presente en el crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), mientras que la segunda no presenta homología con las secuencias disponibles

en las bases de datos moleculares (King et al., 2012). Los niveles de identidad para las secuencias de aminoácidos de este segmento de

ARN con respecto al genoma de referencia son de 99, 100, 99, 100 y 99 % para Hsp70h, p7, p60, p10 y CP, respectivamente.

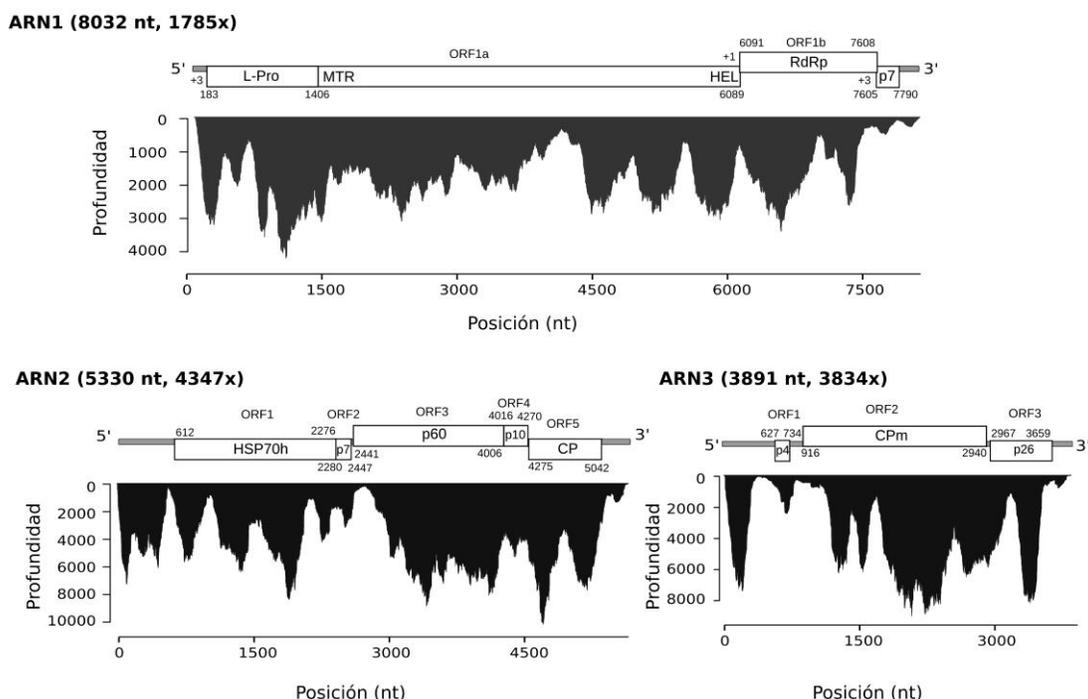


Figura 1. Profundidad de secuenciación obtenida mediante NGS para el genoma de un aislamiento de PYVV causando la enfermedad del amarillamiento de venas en plantas de *S. phureja* en La Unión (Antioquia, Colombia). En la parte superior de cada gráfica se presenta una representación de cada uno de los segmentos que conforman el genoma del virus, con los ORF respectivos y su ubicación nucleotídica

Para el ARN3 se identificaron los tres ORF (p4, CPm y p26) reportados por Livieratos et al. (2004), destacándose el dominio conservado *smaller cp2 coat* (dominio funcional central de la CPm) de los miembros de la familia *Closteroviridae* (pfam01785, posición 496-650) que se cree es fundamental en el ensamblaje de uno de los extremos de los viriones filamentosos de estos virus y en la transmisión por moscas blancas (Tian et al., 1999); mientras que p4 y p26 corresponden a proteínas putativas con función desconocida; aunque el ORF que codifica para p26 también se ha encontrado en el ARN2 de los virus LIYV (Klaassen et al., 1995), CYSDV (Aguilar et al., 2003) y otros crinivirus (King et al., 2012). Los niveles de identidad para las secuencias de aminoácidos para este segmento de ARN con respecto al genoma de referencia son de 100, 99 y 100 %, para p4, CPm y p26,

respectivamente. Las secuencias de los tres segmentos genómicos de la cepa denominada como PYVV_La Unión, se depositaron en GenBank con los códigos de acceso: KR998193, KR998194, KR998195 y la ubicación de los ORF en cada segmento se presentan en la Figura 1.

Aunque el número de cambios encontrado a nivel de nucleótidos para el genoma completo de PYVV y de aminoácidos para las proteínas del virus es muy bajo, en comparación con los niveles de variación reportados recientemente en otros virus de solanáceas como PVY y PVS en estudios basados en NGS en Colombia (Muñoz et al., 2016; Muñoz et al., 2016; Vallejo et al., 2016), su ocurrencia revela niveles de variación hasta ahora no registrados en esta especie viral. Lo anterior se debe a que la mayor parte de los estudios de variabilidad genética de PYVV se han realizado con base en la región que codifica para CP. Así

por ejemplo, Chaves et al. (2013), al evaluar la estructura poblacional de PYVV con base en 69 secuencias de CP disponibles en GenBank procedentes de aislamientos del virus obtenidos en Colombia en diferentes años (de 2008 a 2011), departamentos (Cundinamarca, Antioquia y Nariño) y hospedantes (*S. tuberosum* y *S. phureja*) encontraron que los niveles de variación genética entre éstos no superaron el 3 %. Sin embargo, en dicho trabajo se detectaron dos codones (147 y 205) que presentaban selección positiva en la región CP, lo que representaría la ocurrencia de posibles procesos adaptativos mediados por su transmisión por *T. vaporariorum* o como resultado de la presión de selección que representan las diferentes variedades de papa cultivadas en Colombia. En este sentido, el hecho de que en el presente trabajo se hayan detectado para algunas proteínas como CPm y Hsp70h cambios de seis aminoácidos entre la cepa aquí secuenciada (KR998194, KR998195) y aquella de referencia de Cajamarca, Perú (PRJNA14924), abre la posibilidad de evaluar en estudios futuros los efectos biológicos de dichos cambios sobre las interacciones de PYVV con sus hospedantes cultivados y alternos, como las malezas, al igual que con la eficiencia de transmisión por parte de su vector natural.

Diseño de cebadores para RT-qPCR. La utilización de los cebadores PYVV_F_CP y qPYVV_R_CP mediante RT-qPCR permitió la detección del PYVV a partir de ARN total en cinco de las muestras asintomáticas, en las cuatro muestras con síntomas de amarillamiento de venas y en el control positivo, obteniéndose valores de Ct en el rango de 16,55 a 29,34 (\bar{x} =23,23; SD=4,5) (Cuadro 1). La especificidad de los amplicones fue confirmada por comparación con los valores de las temperaturas de fusión del control positivo (T_m =77,52 °C) utilizando la herramienta de HRM (*High Resolution Melting*), obteniéndose valores de T_m en el rango de 77,28-77,82 °C (\bar{x} =77,45; SD=0,16). La naturaleza viral de cuatro de los amplicones (incluyendo el control positivo) fue evaluada por secuenciación de Sanger y se encontraron niveles de identidad del 97-98 % con respecto a secuencias de PYVV de diferentes departamentos de Colombia previamente depositadas en GenBank, tales como KC257445, KC257446,

JN701955 y HQ620550. El diseño de esta prueba de RT-qPCR con el sistema SYBR Green se suma a otras disponibles en la actualidad para la detección de PYVV que incluyen una prueba de RT-qPCR basada en sondas TaqMan (sondas de hidrólisis con fluorocromo en 5' y atenuador en 3') (López et al., 2006), pruebas serológicas como la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico anti-PYVV, bajo proceso de patente en Colombia (Guzmán et al., 2013b) y al RT-PCR múltiple diseñado por Wei et al. (2009) que permite la detección simultánea de PYVV, TICV y TRV. Su uso presenta como ventaja ofrecer niveles de detección similares al RT-qPCR con sondas TaqMan, pero con menores costos, dado el uso en el laboratorio de virología de un reactivo general (SYBR Green I) para la generación de fluorescencia y no de sondas específicas con fluorocromos diseñadas para cada virus, como ocurre con el sistema TaqMan; además, utilizando RT-qPCR con SYBR Green es posible la identificación de SNP (*single nucleotide polymorphism*) y de variantes virales con la herramienta de análisis de curva de fusión. Sin embargo, esta técnica presenta como desventaja la detección de amplicones inespecíficos que pueden conducir a errores en la identificación de los virus bajo estudio, por lo que se requieren tomar medidas estrictas que eviten la contaminación de las muestras y garantizar una alta especificidad de los cebadores diseñados, situaciones ambas que fueron cuidadosamente consideradas en este trabajo.

Diseño de cebadores para RT-PCR convencional. La evaluación en pruebas de RT-PCR de los dos juegos de cebadores diseñados en el estudio para amplificar una región de 495 pb de CP y de 803 pb de CPm permitió confirmar la infección de PYVV en la muestra sintomática obtenida en el municipio de La Unión (Antioquia) y secuenciada por NGS. Con el uso de dichos cebadores también se detectó este virus en las cuatro muestras sintomáticas procedentes de los cuatro lotes de cultivo bajo evaluación, pero esto no ocurrió en ninguna de las muestras asintomáticas obtenidas en dichos lotes, lo que claramente contrasta con las evaluaciones de RT-qPCR antes descritas, en las que se detectó la infección de PYVV en las tres muestras del segundo lote y en dos del tercer lote (Cuadro 1). Estas diferencias en la sensibilidad de la RT-PCR

convencional y en tiempo real han sido reportadas previamente en la literatura. Así por ejemplo, Bertolini et al. (2008) en un estudio tendiente a detectar el *Citrus tristeza virus* (CTV) en diferentes tejidos de plantas de cítricos y en áfidos vectores, encontraron que el empleo de pruebas de RT-qPCR fue mil veces superior al método estándar de inmunocaptura-RT-PCR anidado que se emplea para la detección de este

virus en programas de indexación de material de siembra. Por su parte, Harju et al. (2005) desarrollaron un ensayo basado en RT-qPCR para la detección del *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), el agente causal de la rizomanía de la remolacha azucarera en Eurasia y determinaron niveles de sensibilidad del orden de 10 mil veces superior con respecto a la prueba convencional de RT-PCR.

Cuadro 1. Detección del *Potato yellow vein virus* (PYVV) en tejidos foliares de plantas de *S. phureja* mediante RT-qPCR y RT-PCR convencional

Muestra ^a	Municipio de procedencia	RT-qPCR para CP		RT-PCR ^d	
		Valor de Ct ^b	Valor de Tm ^c	CP	CPm
C-		>35		-	-
C+	La Unión	18,32	77,52	+	+
M1S1	Entrerriós	>35		-	-
M1S2	Entrerriós	>35		-	-
M1S3	Entrerriós	>35		-	-
M2S1	Marinilla	26,01	77,28	-	-
M2S2	Marinilla	24,58	77,30	-	-
M2S3	Marinilla	27,03	77,30	-	-
M3S1	Marinilla	29,34	77,37	-	-
M3S2	Marinilla	26,19	77,48	-	-
M3S3	Marinilla	>35		-	-
M4S1	El Peñol	>35		-	-
M4S2	El Peñol	>35		-	-
M4S3	El Peñol	>35		-	-
Sint1	Entrerriós	16,55	77,82	+	+
Sint2	Marinilla	19,73	77,46	+	+
Sint3	Marinilla	22,45	77,55	+	+
Sint4	El Peñol	17,19	77,50	+	+

^aC- y C+: control negativo y positivo; M: se refiere a muestras asintomáticas; Sint: muestras con síntomas de amarillamiento de venas. ^bCt: corresponde al ciclo umbral de amplificación; Ct>35 representa resultados negativos en las pruebas de RT-qPCR. ^cTm: indica la temperatura de fusión, es decir aquella en la que el 50 % de la doble hélice de los amplicones se encuentran desnaturalizados. ^d+/-: corresponde a muestras en las que se obtuvo (+) o no (-) el amplicón del tamaño esperado en las reacciones de RT-PCR convencional.

Sharma y Dasgupta (2012) al establecer una prueba para la cuantificación absoluta de los agentes causales de la enfermedad del tungro del arroz (*Rice tungro bacilliform virus* -RTBV y *Rice tungro spherical virus* -RTSV) mediante PCR en tiempo real, encontraron que ésta presentaba un nivel de sensibilidad 100 mil veces superior a la prueba de PCR convencional. Para el caso específico de la detección de PYVV, López et al. (2006) diseñaron una prueba de RT-qPCR basada en sondas Taqman, que en comparación con la

prueba convencional de RT-PCR dirigida a la amplificación de la región CP de este virus, presentaba niveles de sensibilidad mil veces superior. Por lo anterior, se sugiere el empleo de la técnica de RT-qPCR para apoyar los programas de certificación de tubérculo-semilla de papa por su sanidad viral y para la detección del PYVV en muestras foliares asintomáticas en estudios epidemiológicos o de mejoramiento genético por resistencia a este virus, mientras que el uso de la RT-PCR convencional puede ser dirigida a

estudios que empleen muestras sintomáticas con alto título viral en los que se evalúen niveles de variación molecular de diferentes regiones del genoma del PYVV y análisis filogenéticos.

Por otra parte, los árboles filogenéticos generados con las secuencias obtenidas para CP y CPm de PYVV presentaron un solo clado que agrupó todos los aislamientos obtenidos en este trabajo (accesiones KR998189 a KR998192) con aquellos depositados en GenBank para este virus (Figura 2), los que en su mayoría fueron obtenidos en las regiones cultivadoras de papa de Colombia (Gil et al., 2011; Chaves et al., 2013; 2014). Los niveles de identidad entre todas las cepas de PYVV bajo análisis fueron superiores al 98,8 % para CP y al 98,0 % para CPm, mientras que dichos valores fueron de 47,6-47,9 % y 45,8-46,2 % con respecto a las secuencias de LIYV, virus utilizado como especie externa de análisis (Figura 3). Aunque, los niveles de variación encontrados entre las secuencias de PYVV para ambas regiones secuenciadas son muy bajos, se destaca que dicha variación es superior a 0,8 % (\bar{x} =

98,77 %, SD = 0,44) para CPm con relación a CP (\bar{x} = 99,58 %, SD = 0,30) (Figura 3), lo que confirma trabajos previos realizados por Chaves et al. (2014) y Cubillos y Guzmán (2015), en los que utilizando análisis de secuencias para el primer caso, o de perfiles electroforéticos obtenidos mediante la técnica de SSCP para el segundo, se identificó a CPm como la zona de mayor variabilidad entre aislamientos de PYVV obtenidos en *S. phureja*, al presentar tasas de diversidad nucleotídica de 0,084 en contraste con valores de 0,008 para CP; además de 12 perfiles de SSCP para CPm y de tan sólo tres para CP. En este sentido, Chaves et al. (2014), encontraron evidencia de recombinación genética en la región que codifica para CPm, por lo que se cree que esta proteína juega un papel clave en el proceso evolutivo de PYVV, al ser una de las responsables de la interacción del virus con su vector natural y fundamental para el correcto ensamblaje de las partículas virales de este crinivirus (Tian et al., 1999; King et al., 2012).

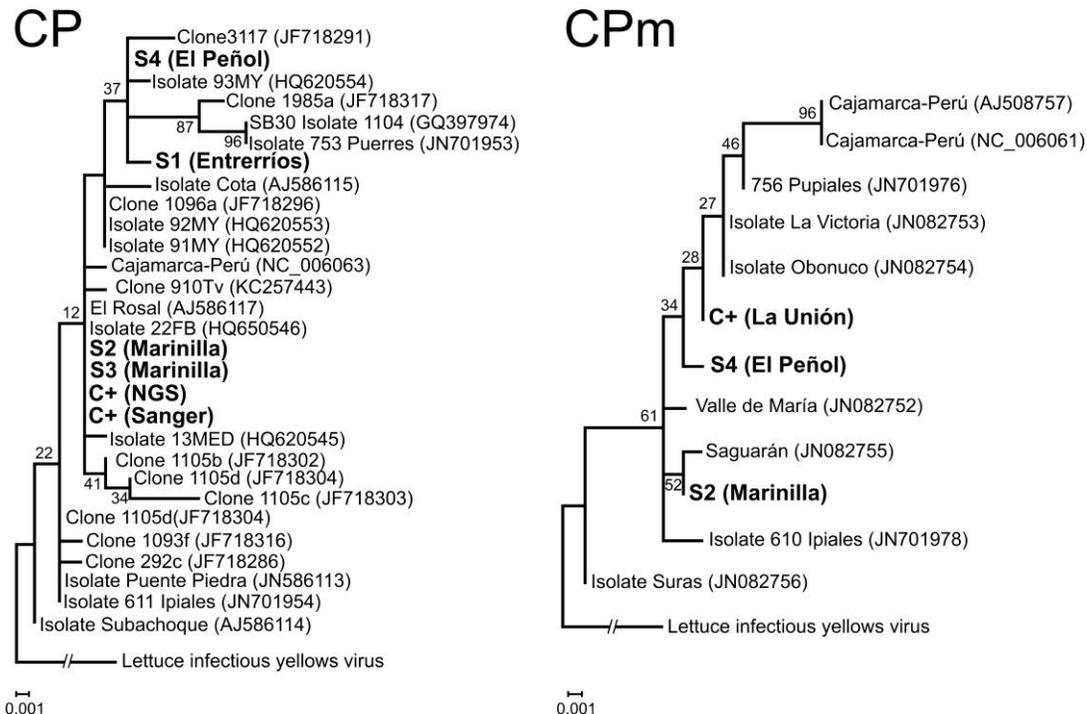


Figura 2. Árboles filogenéticos basados en secuencias de las regiones que codifican para la cápside viral (CP) y la cápside menor (CPm) de aislamientos de PYVV procedentes de cultivos de papa de Antioquia (Colombia) y otras regiones de Colombia y Perú. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap*. Las muestras resaltadas corresponden a las secuenciadas en este trabajo y el *Lettuce infectious yellows virus* corresponde a la especie externa de análisis.

uso de un par de cebadores para la detección asintomática de PYVV utilizando el sistema RT-qPCR con SYBR Green I, mientras que para realizar estudios de afinidad filogenética y variación genética de este virus, se proponen dos pares de cebadores dirigidos a amplificar fragmentos de 496 pb y 793 pb para CP y CPM, respectivamente. La utilización de dichos cebadores en aislamientos de PYVV obtenidos en cultivos de *S. phureja* de diferentes municipios de Antioquia, confirmó una vez más la ocurrencia de los bajos niveles de diversidad genética que presenta este virus en Colombia, lo que podría representar una oportunidad para generar materiales con resistencia duradera a la enfermedad del amarillamiento de venas de la papa.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (Código 34585) y por International Foundation for Science (IFS) de Suecia (Código C/4634-2).

LITERATURA CITADA

1. Aguilar, J.M., M. Franco, C.F. Marco, B. Berdiales, E. Rodríguez, V. Truniger y M.A. Aranda. 2003. Further variability within the genus *Crinivirus*, as revealed by determination of the complete RNA genome sequence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Journal of General Virology* 84: 2555-2564.
2. Alba, V.R. 1950. Viropatógenos. Conferencia Latinoamericana de Especialistas en Papa. Bogotá. pp. 52-58.
3. Bertolini, E., A. Moreno, N. Capote, A. Olmos, A. de Luis, E. Vidal, J. Pérez 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.
4. Chaves, G., M. Guzmán y L. Ortíz. 2013. Genetic structure and evidence of putative Darwinian diversifying selection in the *Potato yellow vein virus* (PYVV). *Agronomía Colombiana* 31: 161-168.
5. Chaves, G., K. Cubillos y M. Guzmán. 2014. First report of recombination in *Potato yellow vein virus* (PYVV) in Colombia. *Tropical Plant Pathology* 39: 234-241.
6. Cubillos, K.A. y M.M. Guzmán. 2015. Molecular variability of three genes of *Potato yellow vein virus* infecting *Solanum tuberosum* using single strand conformational polymorphism. *Acta Biológica Colombiana* 20: 233-237.
7. 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.
8. Gish, W. y D.J. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3: 266-272.
9. Guzmán, M., E., Ruíz, N. Arciniegas y R. Coutts. 2006. Occurrence and variability of *Potato yellow vein virus* in three departments of Colombia. *Journal of Phytopathology* 154: 748-750.
10. Guzmán-Barney, M. y P. Rodríguez. 2010. Susceptibility of *Solanum phureja* (Juz. et Buk.) to *Potato yellow vein virus*. *Agronomía Colombiana* 28: 219-224.
11. Guzmán, M., L. Franco, D. Rodríguez, L. Vargas y J.E. Fierro. 2012. Yield losses in *Solanum tuberosum* group Phureja cultivar Criolla Colombia in plants with symptoms of PYVV in field trials. *American Journal Potato Research* 89: 438-447.
12. Guzmán, M., A.K. Hernández y L. Franco. 2013a. Tracking foliar symptoms caused by tuber-borne *Potato yellow vein virus* (PYVV) in *Solanum phureja* (Juz et Buk) cultivar Criolla Colombia. *American Journal Potato Research* 90: 284-293.
13. Guzmán, M., P.A. Rodríguez y J. Calderón. 2013b. Detección por inmunopresión de *Potato yellow vein virus* (PYVV). Herramienta sencilla y útil para diagnóstico del Virus de amarillamiento de nervaduras de papa y la certificación de semillas en diferentes órganos de papa. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. 28 p.
14. Harju, V.A., A. Skelton, G.R. Clover, C. Ratti, N. Boonham, C.M. Henry y R.A. Mumford.

2005. The use of real-time RT-PCR (TaqMan) and post-ELISA virus release for the detection of *Beet necrotic yellow vein virus* types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 123: 73-80.
15. Hernández A.K. y M.M. Guzmán. 2014. Detección del virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de la papa en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* grupo Phureja cv Criolla Colombia utilizando RT-PCR convencional y en tiempo real. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16: 74-85.
 16. King, A.M., M.J. Adams, E.B. Carstens y E.J. Lefkowitz. 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. San Diego. 1327 p.
 17. Klaassen, V.A., M.L. Boeshore, E.V. Koonin, T. Tian y B.W. Falk. 1995. Genome structure and phylogenetic analysis of *Lettuce infectious yellows virus*, a whitefly-transmitted, bipartite closterovirus. *Virology* 208: 99-110.
 18. Langmead, B. y S. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.
 19. Livieratos, I., E. Eliasco, G. Muller, R. Olsthoorn, L. Salazar, W. Pleij y R. Coutts. 2004. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus *Crinivirus*. *Journal of General Virology* 85: 2065-2075.
 20. López, R., C. Asensio, M. Guzmán y N. Boonham. 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of *Potato yellow vein virus* (PYVV). *Journal of Virological Methods* 136: 24-29.
 21. 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.
 22. Muñoz, D., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Detección y caracterización molecular del *Potato virus Y* (PVY) en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) del norte de Antioquia, Colombia. *Revista Protección Vegetal* 31: 9-19.
 23. Muñoz-Baena, L., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Detección y secuenciación del genoma del *Potato virus Y* (PVY) que infecta plantas de tomate en Antioquia, Colombia. *Bioagro* 28: 69-80.
 24. Offei, S.K., N. Arciniegas, G. Muller, M. Guzmán, L.F. Salazar y R.H. Coutts. 2004. Molecular variation of *Potato yellow vein virus* isolates. *Archives of Virology* 149: 821-827.
 25. Osorio, M.E., A.F. Marques, G.J. Romay, S.E. Roa, J.R. Demey y A.L. Vegas. 2016. Adaptación de la técnica RT-PCR para el diagnóstico del virus del amarillamiento de las venas de papa en Venezuela. *Bioagro* 28: 47-52.
 26. Rodríguez, P., G. Chaves, L. Franco y M. Guzmán. 2010. Low molecular variability of *Potato yellow vein virus* (PYVV) isolates of *Solanum phureja* and *Solanum tuberosum* from Colombia. *Phytopathology* 100: S176.
 27. Salazar, L., G. Muller, M. Querci, J. Zapata y R. Owens. 2000. *Potato yellow vein virus*: its host range, distribution in South America and identification as a *Crinivirus* transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology* 137: 7-19.
 28. Salazar, L. 2006. Emerging and re-emerging potato diseases. *Potato Research* 49: 43-47.
 29. Sharma, S. y I. Dasgupta. 2012. Development of SYBR Green I based real-time PCR assays for quantitative detection of *Rice tungro bacilliform virus* and *Rice tungro spherical virus*. *Journal of Virological Methods* 181: 86-92.
 30. 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.
 31. Tian, T., L. Rubio, H. Yeh, B. Crawford, y B.W. Falk. 1999. *Lettuce infectious yellows virus*: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology* 80: 1111-1117.
 32. Vallejo, D., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Genome characterization of a *Potato virus S* (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. *Agronomía Colombiana*

- 34: 51-60.
33. Villamil, A., W.J. Cuellar y M. Guzmán. 2014. Natural co-infection of *Solanum tuberosum* crops by the *Potato yellow vein virus* and potyvirus in Colombia. *Agronomía Colombiana* 32: 213-223.
34. Wei, T., G. Lu y G.R. Clover. 2009. A multiplex RT-PCR for the detection of *Potato yellow vein virus*, *Tobacco rattle virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in potato with a plant internal amplification control. *Plant Pathology* 58: 203-209.