

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL *Potato yellow vein virus* (PYVV) EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*) EN COLOMBIA

Genome Sequencing of *Potato yellow vein virus* (PYVV) Strain Infecting *Solanum lycopersicum* in Colombia

Laura MUÑOZ BAENA¹, Pablo Andrés GUTIÉRREZ SÁNCHEZ¹, Mauricio MARÍN MONTOYA¹.

¹ Laboratorios de Microbiología Industrial y Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Calle 59A n.º 63-20, bloque 19A. Medellín, Colombia.

For correspondence. mamarinm@unal.edu.co

Received: 21st July 2016, **Returned for revision:** 22nd August 2016, **Accepted:** 15th September 2016.

Associate Editor: Geraldo Mäder.

Citation/Citar este artículo como: Muñoz Baena L, Gutiérrez Sánchez PA, Marín Montoya M. Secuenciación del genoma completo del *Potato yellow vein virus* (PYVV) en tomate (*Solanum lycopersicum*) en Colombia. Acta biol. Colomb. 2017;22(1):5-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n1.59211>

RESUMEN

Potato yellow vein virus (PYVV), es uno de los fitopatógenos más limitantes para la producción de papa en la región de Los Andes. A pesar que se le ha detectado infectando tomate en Colombia, el conocimiento de las características biológicas de las cepas presentes en este hospedante es muy limitado. En este estudio, utilizando secuenciación masiva de nueva generación (NGS), se obtuvo la secuencia completa de los tres segmentos genómicos del PYVV en plantas de tomate en Marinilla (Antioquia) y se evaluó la utilidad de tres juegos de cebadores para su detección mediante pruebas de RT-PCR convencional y en tiempo real (RT-qPCR). El genoma de la secuencia consenso presentó tamaños de 8043 nt (ARN1), 5346 nt (ARN2) y 3896 nt (ARN3) y se identificaron los diez ORF previamente reportados en este virus, aunque, en general, éstos presentaron menores niveles de identidad que los registrados entre cepas de PYVV de papa. Análisis de variación y de selección identificaron dos regiones en los ORF MET/HEL y CPm que presentan selección positiva, lo que podría estar asociado a la adaptación por hospedante. Los tres juegos de cebadores amplificaron las regiones esperadas de la cápside de PYVV, siendo posible identificar, por diferencias en valores de temperatura de fusión (T_m) y por secuenciación Sanger, la ocurrencia de al menos dos variantes principales de este virus en el Oriente Antioqueño, lo que concuerda con los niveles moderados de polimorfismos encontrados en las secuencias obtenidas por NGS.

Palabras clave: *Crinivirus*, RT-PCR, RT-qPCR, secuenciación de nucleótidos de alto rendimiento, Solanaceae.

ABSTRACT

Potato yellow vein virus (PYVV) is one of the most important pathogens of potato in the Andean region. In spite of having been detected in tomato crops in Colombia, knowledge on the biological characteristics of PYVV is limited on this host. In this study, next-generation sequencing (NGS) of a PYVV strain infecting tomato in Marinilla District (Antioquia) was performed; additionally, three primer set useful in RT-PCR and RT-qPCR detection were also tested. The consensus genome consisted of three RNA segments of 8043 nt (RNA1), 5346 nt (RNA2) and 3896 nt (RNA3) encoding ten ORF with slight lower sequence identity in relation to PYVV isolates from potato. Sequence analysis suggests the presence of regions potentially undergoing positive selection in the ORFs coding for MET/HEL and CPm possibly as a result of host adaptation. Experimental validation of primers resulted in amplicon with the expected size while melting temperature analysis and sequencing suggest the presence of at least two PYVV infecting *S. lycopersicum* in east Antioquia in agreement with the NGS data.

Keywords: *Crinivirus*, high-throughput nucleotide sequencing, RT-PCR, RT-qPCR, Solanaceae.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los principales renglones agrícolas de diferentes regiones de los tres pisos térmicos en Colombia, tanto en explotaciones bajo invernadero como a libre exposición, con una producción cercana a 412.351 t, una superficie cultivada de 14.321 ha y un rendimiento promedio de 28,8 t/ha (Agronet, 2016). Los principales departamentos cultivadores de tomate en Colombia son Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Huila, Santander, Norte de Santander y Valle del Cauca y, aunque su área cosechada creció a una tasa de 3,6 % anual entre 2010 y 2013, su rendimiento cayó en 2,9 % para este mismo período (Agronet, 2016). Al compararse dichos rendimientos con los obtenidos en países como China y Estados Unidos, dos de los principales productores de tomate en el mundo, se encuentran grandes diferencias, pues el primero con una producción anual de 48,6 millones de toneladas tiene un rendimiento de 56,7 t/ha y el segundo con 12,79 millones de toneladas presenta rendimientos de 92,4 t/ha; incluso el rendimiento de tomate obtenido en Colombia es inferior al registrado como promedio para Suramérica (56,4 t/ha) (Faostat, 2016).

Entre diferentes factores bióticos y abióticos, uno de los que más afecta la producción de tomate en Colombia, y otros países tropicales y subtropicales, son las enfermedades virales, especialmente aquellas cuyos agentes causales son transmitidos por insectos vectores como moscas blancas, trips, áfidos y cicadélidos (Prasannath *et al.*, 2014). Algunas de las especies de virus más limitantes para la producción de tomate en el mundo incluyen el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) y *Beet curly top virus* (BCTV); el primero es un begomovirus de la familia *Geminiviridae* transmitido por *Bemisia tabaci*, mientras que el TSWV es un tospovirus (*Bunyaviridae*) de gran importancia en cultivos bajo invernadero, transmitido por trips como *Frankliniella occidentalis* y el BCTV es especialmente limitante en regiones subtropicales y es transmitido por el saltahojas de la remolacha (*Circulifer tenellus*) (Prasannath *et al.*, 2014).

En Colombia se han identificado al menos 14 virus diferentes afectando el cultivo de tomate y pertenecientes a los géneros *Tobamovirus* (*Tobacco mosaic virus* -TMV- y *Tomato mosaic virus* ToMV), *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus* -CMV-), *Potyvirus* (*Pepper deforming mosaic virus* -PepDMV- y *Potato virus Y* -PVY-), *Tospovirus* (TSWV e *Impatiens necrotic spot virus* -INSV-), *Begomovirus* (*Tomato yellow mosaic virus* -ToYMV-, *Potato yellow mosaic virus* -PYMV-, *Tomato Venezuela virus* -ToVEV- y la especie propuesta: *Tomato mild mosaic virus* -TMMV-), *Nepovirus* (*Tobacco ringspot virus* -TRSV-), *Torradovirus* (*Tomato torrado virus* -ToTV-) y *Crinivirus* (*Potato yellow vein virus* -PYVV-) (Martínez *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2009; Vaca-Vaca *et al.*, 2012; Verbeek y Dulleman, 2012; Tamayo y Jaramillo, 2013; Muñoz-Baena *et al.*, 2016).

Aunque la infección de este último virus (PYVV) ha sido reportada desde el año 1988 en plantas de tomate en Colombia (Saldarriaga *et al.*, 1988), y confirmada su

patogenicidad sobre el cultivar Rutgers (Salazar *et al.*, 2000), son muy pocos los estudios que se han realizado sobre este virus en este hospedante en el país y en otros lugares de Suramérica (Morales *et al.*, 2004), lo que claramente contrasta con el mejor conocimiento que se tiene del patógeno en cultivos de papa (Gúzman-Barney *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2013; Gil *et al.*, 2013; Hernández-Gúzman y Gúzman-Barney, 2014); en donde se ha encontrado que puede ocasionar reducciones en el rendimiento de entre 33-48 % en cultivos de papa criolla (*Solanum phureja* Juz. et Buk.) (Gúzman-Barney *et al.*, 2012) y del 25 al 50 % en *S. tuberosum* subsp. andigena (Salazar *et al.*, 2000). El PYVV, en conjunto con *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), son los tres crinivirus que se han reportado en el mundo afectando tomate (Jacquemon *et al.*, 2009); sin embargo a diferencia de estos dos últimos que tienen genomas bipartitos de ARN positivo, el PYVV presenta tres segmentos genómicos individualmente encapsidados en partículas flexuosas entre 650 y 900 nm. El primer segmento (ARN1) codifica para una proteína pequeña que tiene un dominio trans-membranal (p7) y para las proteínas asociadas a la replicación del virus: papaín-proteasa (L-Pro), metiltransferasa (MTR), helicasa (HEL) y polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp). El ARN2 codifica para cinco proteínas: una chaperona homóloga a la proteína de choque térmico 70 (HSP70h), la proteína estructural p60, la cápside viral (CP) y para dos proteínas de función desconocida (p7 y p10). El ARN3, que aparentemente se derivó del ARN2, codifica para la cápside menor (CPm) y para dos proteínas de función desconocida (p4 y p26) (Livieratos *et al.*, 2004; King *et al.*, 2012).

El PYVV causa síntomas de amarillamientos de venas secundarias y terciarias, acompañados de un color amarillo intenso en la lámina foliar (Salazar *et al.*, 2000) en plantas de papa; mientras que en tomate, además del amarillamiento intervenal, se reportan síntomas asociados a diversos tipos de clorosis y necrosis, arrugamiento foliar y deformación de frutos (Morales *et al.*, 2009; Tamayo y Jaramillo, 2013). Además de estos cultivos, diferentes plantas arvenses como la batatilla (*Ipomoea trifida*), el diente de león (*Cacalia sonchifolia*), el nudillo (*Panicum zizonooides*), la yerba mora (*Solanum americanum*) y la remasa (*Rumex obtusifolius*), entre otras, son hospederos alternos de este virus (Salazar *et al.*, 2000; Gúzman-Barney y Rodríguez, 2010; Tamayo y Jaramillo, 2013). El PYVV es transmitido de manera semi-persistente por la especie de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) y también es de fácil dispersión por tubérculos de papa (Salazar *et al.*, 2000; Gúzman-Barney *et al.*, 2013).

A pesar de la importancia económica y cuarentenaria del PYVV, hasta el momento sólo existen dos genomas completamente secuenciados de este virus: uno obtenido en papa en la región de Cajamarca (Perú) (Livieratos *et al.*, 2004), y otro recientemente reportado por Álvarez (2016) a

partir de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de una muestra de folíolos de *S. phureja* cv. Criolla Colombia del municipio de La Unión (Antioquia). Adicionalmente, Villamil-Garzón *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). Análisis realizados a partir de la comparación de los dos genomas completos de PYVV disponibles en GenBank, mostraron niveles de identidad superiores al 99,2 % entre éstos, presentándose tan sólo 38, 40 y 21 cambios para los segmentos ARN1, ARN2 y ARN3, respectivamente (Álvarez, 2016). Este resultado, confirmó los diversos trabajos anteriores que, utilizando secuenciación Sanger, RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) de secuencias de los genes CP, CPm y Hsp70h, reportaban muy bajos niveles de diversidad genética entre aislamientos de este virus procedentes de varias regiones geográficas de Colombia (Offei *et al.*, 2004; Guzmán-Barney *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2010; Chaves *et al.*, 2013; Gil *et al.*, 2013; Chaves *et al.*, 2014; Cubillos-Abello y Guzmán-Barney, 2015).

Con el fin de aumentar el nivel de conocimiento que se tiene del PYVV en cultivos de tomate de Colombia, los objetivos del presente trabajo fueron: obtener las secuencias completas de los tres segmentos genómicos de aislamientos de PYVV que infectan tomate en cultivos de Antioquia y determinar los niveles de variación genómica de este virus respecto a los aislamientos obtenidos en papa. Adicionalmente, se evaluó la efectividad de tres juegos de cebadores previamente reportados en la literatura (Offei *et al.*, 2004; Álvarez, 2016) para la detección de PYVV en plantas de tomate mediante RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Para la ejecución de este trabajo se realizaron dos visitas de colección de plantas de tomate var. Chonto en los municipios de Marinilla (años 2015 y 2016) y El Peñol (año 2015) (Antioquia). En el primer año, se tomaron en cada uno de tres cultivos, tres muestras consistentes de cinco submuestras asintomáticas de tejido foliar de tomate, así como una muestra con síntomas de amarillamiento de venas y enrollamiento foliar (Figura suplementaria 1). En el año 2016, la colección sólo se realizó en el municipio de Marinilla, y en esta ocasión se obtuvieron cinco muestras compuestas (cinco submuestras foliares/muestra) en igual número de lotes de cultivos de tomate. Adicionalmente, se obtuvieron dos muestras de papa (*S. tuberosum* en 2015 y *S. phureja* en 2016) con síntomas severos de amarillamiento de venas para ser utilizados como controles positivos en el estudio.

Secuenciación masiva de nueva generación (NGS)

Con el fin de obtener la secuencia completa del genoma de PYVV infectando plantas de tomate, se realizó la

secuenciación masiva del transcriptoma de un *bulk* de muestras aleatorias de tejido foliar colectadas en Marinilla; dicho *bulk* fue nombrado como T(NGS). Esta muestra fue macerada en nitrógeno líquido y extraído su ARN total utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification Mini (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Posteriormente, con el fin de evitar la presencia de ARN ribosomal, se eliminaron las cuatro especies de este ARN (5S, 5.8S, 18S y 28S) mediante Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina, San Diego, CA), evaluándose el RIN (*RNA Integrity Number*) del ARN obtenido en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La librería de ADN copia (ADNc) fue construída con el kit TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina, San Diego, CA) y, finalmente, la secuenciación se realizó en un equipo Illumina HiSeq-2000 de la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Evaluación de cebadores para RT-qPCR

En todas las muestras de tomate obtenidas en la investigación en los dos años de estudio y en las dos muestras de tejido foliar de papa con síntomas de amarillamiento de venas (utilizadas como controles positivos), se evaluó la utilidad de los 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, para la detección de PYVV en este hospedante (Álvarez, 2016). Las pruebas de RT-qPCR se realizaron en dos pasos con SYBR Green I, a partir del ARN total extraído con el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron aquellas reportadas por Álvarez *et al.* (2016), 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*) similares a los controles positivos, siguiendo los criterios de Schena *et al.* (2004). Todas las reacciones de RT-qPCR incluyeron un control negativo libre de ADNc viral. La naturaleza viral de seis de los amplicones que cumplieron estas condiciones, incluyendo los controles positivos de papa, fue reconfirmada por secuenciación Sanger en ambos sentidos en un equipo ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur), previa purificación directa del gel mediante el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Evaluación de cebadores para RT-PCR

Utilizando el ARN total extraído en las cinco muestras de tejido foliar de tomate var. Chonto colectadas durante el año 2016 en el municipio de Marinilla, además de la muestra *bulk* secuenciada por NGS y de las dos muestras sintomáticas de tejido foliar de papa, se evaluó la utilidad para la detección de PYVV en tomate con pruebas de RT-PCR convencional, de los juegos de cebadores PYVCPF (5'-ATG GAA ATC CGA TCG TGG AAC CT-3') y PYVCPR (5'-CTA CTC AAT

AGA TCC TGC TA -3') (Offei *et al.*, 2004) y PYVV_F_CP (5'-TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG -3') y PYVV_R_CP (5'-AGT TGC TGC ATT CTT GAA CAG G -3') (Álvarez, 2016) que amplifican una región del gen CP de 758 pb y 495 pb, respectivamente. Las reacciones de retrotranscripción consistieron de 20 µL con 200 U de la enzima Máxima Reversa Transcriptasa, 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 pmol del primer reverso, 20 U de inhibidor de RNasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y 2 µL del ARN total. Las reacciones se incubaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) a 65°C por 5 min, 50°C por 30 min y 85°C por 5 min (para inactivar la enzima). El PCR se realizó en 25 µL con 17,8 µL de agua, 1X de buffer de enzima (10X), 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 1 µL de 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, 52 °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, Alemania). Todos los amplicones obtenidos con el tamaño esperado para cada par de cebadores, fueron purificados directamente del gel mediante el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y secuenciados en ambos sentidos por el método de Sanger.

Análisis bioinformáticos

Una vez obtenidas las secuencias de NGS, se procedió a remover las bases de baja calidad con el programa Seqtk (Li, 2008) y se realizó el ensamblaje de contigs con Trinity (Grabherr *et al.*, 2011). Aquellos *contigs* correspondientes al genoma de PYVV fueron identificados por BLASTN (Gish y States, 1993) y confirmados los ensamblajes de los tres segmentos genómicos del virus mediante mapeo con respecto al genoma de referencia disponible en GenBank para este virus (ARN1: NC_006061, ARN2: NC_006062 y ARN3: NC_006063) utilizando Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012); finalmente se evaluaron y corrigieron inconsistencias en los ensamblajes por visualización con el programa Tablet (Milne *et al.*, 2010). Las secuencias consenso fueron depositadas en GenBank con los códigos de acceso KX573901, KX573902 y KX573903 y PYVV_S_lycopersicum como nombre del aislamiento.

Los niveles de profundidad, cobertura y número de sitios polimórficos de cada uno de los segmentos genómicos de PYVV fueron obtenidos con rutinas en Perl escritas para este fin y los marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para las proteínas del virus fueron identificados con BLASTX (Gish y States, 1993). Los cocientes de las sustituciones no-sinónimas a sinónimas (Ka/Ks) fueron estimadas para cada ORF por el método de Nei-Gojobori usando ventanas de lectura desde 140 hasta 10 codones (Nei y Gojobori, 1986).

El análisis filogenético de ocho secuencias obtenidas en este estudio para la región CP de PYVV y para otras 56 obtenidas de GenBank para este virus, fue realizado con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) por el método de Máxima verosimilitud con el modelo de Tamura-3-parámetros con 1000 réplicas de *bootstrap*. La tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución Gamma (5 categorías, +G = 0.2842).

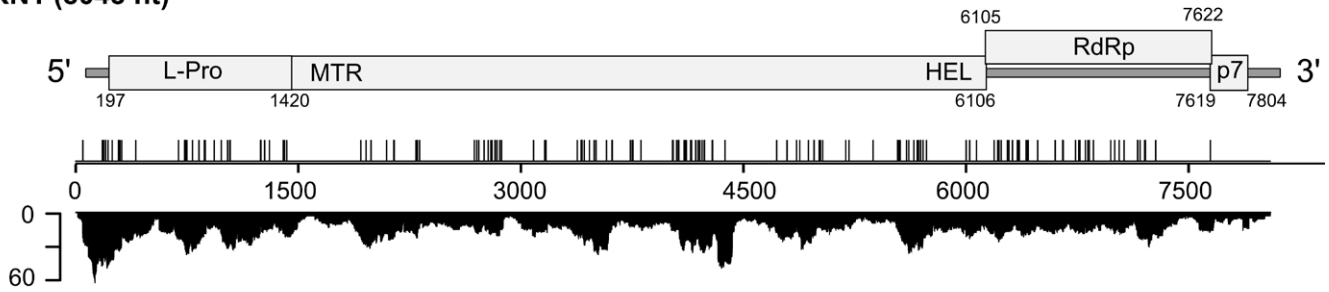
RESULTADOS

Secuenciación masiva de nueva generación (NGS)

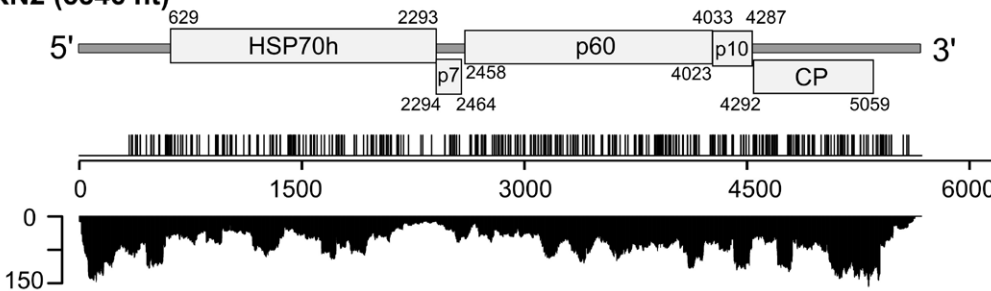
Con el fin de obtener la secuencia completa del primer genoma de PYVV infectando plantas de tomate, en este trabajo se secuenció mediante NGS el transcriptoma de tejido foliar de la variedad Chonto procedente del oriente antioqueño. En total se obtuvieron 5.571.097 *reads* pareados para un total de 4456.877.600 pb secuenciadas. Los análisis bioinformáticos permitieron identificar 714 *reads* por millón (RPM) atribuidos al genoma de PYVV. El ensamblaje resultó en tres secuencias consenso que representan los tres segmentos genómicos de este virus: el ARN1 presentó una extensión de 8043 nt con regiones 5' y 3' UTR de 196 y 239 nt; el ARN2 tiene 5346 nt y regiones 5' y 3' UTR de 628 y 287 nt, y el ARN3 fue el más pequeño con 3896 nt y regiones UTR 5' y 3' de 636 y 227 nt. Los niveles de profundidad alcanzados para la secuenciación de estos genomas fueron de 18,4x, 56,6x y 88,5x, respectivamente (Fig. 1). Los análisis de variación realizados para cada posición del genoma identificaron 162, 401 y 42 sitios polimórficos y tasas de transición/transversión de 7,2, 6,4 y 6,0 para los segmentos ARN1, ARN2 y ARN3, respectivamente (Fig. 1). Estas comparaciones, evidenciaron la ocurrencia de mayores niveles de diversidad en el ARN2 del genoma viral, pues se presentaron casos como los de los ORF que codifican para p10 y p60, en donde las identidades fueron tan bajas como 92,2 % y 93,1 % para la secuencia de nucleótidos y de 91,7 % y 96,9 % para aminoácidos, respectivamente (Tabla 1). La ocurrencia de estos niveles moderados de polimorfismos sugieren la presencia de diferentes variantes del virus en los tejidos foliares de tomate evaluados.

La anotación del genoma viral permitió identificar los diferentes ORF presentes en cada segmento; así, en ARN1 se encontraron en el ORF1 (a y b) los motivos conservados para los diferentes componentes del módulo de replicación del virus que incluyen la proteasa L-Pro, metil-transferasa, helicasa de ARN de la superfamilia 1 y la RdRp. Cerca al extremo 3' de este segmento también se presenta un segundo ORF que codifica para p7, una pequeña proteína hidrofóbica de 61 residuos. Los niveles de identidad de las secuencias consenso de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas para las que codifica el ARN1 con respecto a aquellas de los genomas de referencia de PYVV de Colombia y Perú fueron superiores al 98,4 % para nucleótidos y al 96,7 % para aminoácidos, siendo p7 la región que presentó

ARN1 (8043 nt)



ARN2 (5346 nt)



ARN3 (3896 nt)

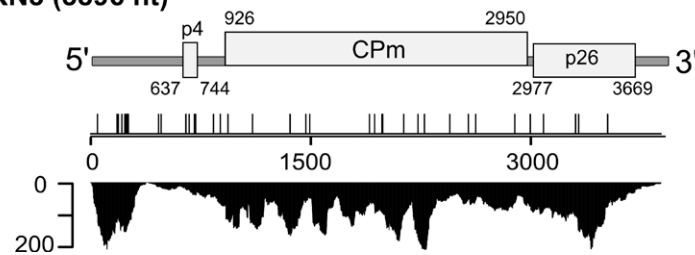


Figura 1. Profundidad de secuenciación y posiciones de polimorfismos encontrados en los tres segmentos genómicos del *Potato yellow vein virus* (PYVV) en tejido foliar de tomate en Marinilla (Antioquia). En la parte superior se presenta el diagrama de cada segmento de ARN de PYVV, indicándose los nombres de los ORF y sus posiciones en nucleótidos. La barra intermedia indica los sitios polimórficos y en la parte inferior se indica la profundidad de secuenciación.

menor identidad (98,4 % en nt y 96,7 % en aa respecto a PYVV_ La Unión) (Tabla 1).

El segmento de ARN2 presentó los cinco ORF característicos del arreglo general de los virus de la familia *Closteroviridae*: Hsp70h, p7, p60, p10 y CP. Los niveles de identidad para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas para las que codifica este segmento fueron evidentemente menores que los encontrados para los ARN1 y ARN3, pues alcanzaron valores tan bajos como 92,5 % en nucleótidos y 94 % en aminoácidos para p10, mientras que para los otros cuatro ORF los valores de disimilitud fueron cercanos al 5 % para nucleótidos y del 2-3 % para aminoácidos. Aunque CP fue la región menos disímil (96,1 %-96,2 % en nt y 97,6 %-98 % en aa) de este segmento de ARN2, se detectaron entre 29 y 30 cambios

en la secuencia de nucleótidos y de cinco a seis cambios de aminoácidos entre las cepas de PYVV de papa y la secuencia consenso obtenida en este trabajo (Tabla 1).

Finalmente, para el tercer segmento se identificaron los tres ORF (p4, CPm y p26) reportados para este ARN, destacándose en CPm el dominio conservado *smaller cp2 coat protein* característico de los miembros de la familia *Closteroviridae*, que, aparentemente, participa en el ensamblaje de uno de los extremos de los viriones y en la transmisión de los crinivirus por moscas blancas; mientras que p4 y p26 corresponden a proteínas putativas con función desconocida (Livieratos *et al.*, 2004; King *et al.*, 2012). Los niveles de identidad para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas para las que codifica este segmento con respecto a aquellas de referencia

Tabla 1. Porcentajes de identidad de los ORF presentes en los tres segmentos genómicos de aislamientos del *Potato yellow vein virus* (PYVV) procedentes de papa y tomate.

	RNA 1*				RNA 2					RNA 3		
	L-Pro	MTR/HEL	RdRp	p7	HSP70h	p7	p60	p10	CP	p4	CPm	p26
T(NGS)	96.6	96.7	96.1	96.2	94.3	94.0	93.1	92.2	95.4	91.7	98.6	99.4
Variación interna	(42)	(154)	(59)	(7)	(95)	(10)	(108)	(20)	(35)	(9)	(28)	(4)
	97.8	97.8	98.8	96.7	97.8	98.2	96.9	91.7	98.0	85.7	98.5	100
	(9)	(35)	(6)	(2)	(12)	(1)	(16)	(7)	(5)	(5)	(10)	(0)
PYVV_ La Unión (Colombia)	99.6	99.2	99.5	98.4	95.1	95.9	94.7	92.5	96.2	99.1	98.6	99.0
	(5)	(38)	(7)	(3)	(82)	(8)	(83)	(19)	(29)	(1)	(28)	(7)
	99.7	99.0	99.8	96.7	98.0	98.2	97.1	94.0	98.0	97.1	99.0	99.1
	(1)	(16)	(1)	(2)	(11)	(1)	(15)	(5)	(5)	(1)	(7)	(2)
PYVV_Cajamarca (Perú)	99.6	99.0	99.5	99.9	94.9	95.2	94.8	92.5	96.1	99.1	98.4	98.7
	(6)	(45)	(7)	(3)	(84)	(8)	(82)	(19)	(30)	(1)	(32)	(9)
	99.5	98.3	99.4	98.4	97.6	98.2	96.9	94.0	97.6	97.1	98.0	99.1
	(1)	(26)	(3)	(1)	(13)	(1)	(16)	(5)	(6)	(1)	(13)	(2)

* En la primera y tercera línea se presentan los porcentajes de identidad para nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Las líneas con valores entre paréntesis corresponden al número de cambios correspondientes.

obtenidas en papa, fueron superiores al 98,4 % y 97,1 %, respectivamente, aunque para el caso de CPm se detectaron hasta 32 cambios en nucleótidos y 13 en la secuencia de aminoácidos (Tabla 1).

La identificación de niveles de variación moderados entre la cepa de PYVV_*S. lycopersicum* y aquellas obtenidas en papa, podría ser un indicativo de un proceso de diversificación mediado por hospedante. Para evaluar esta situación se realizaron mediciones globales del índice Ka/Ks para cada una de las regiones codificantes para proteínas en los tres segmentos genómicos del virus. Para la mayoría de ORF, los valores globales de Ka/Ks fueron inferiores a 0,2, siendo la excepción la proteína p4, lo que sugiere que esta última está sometida a unas condiciones de selección más laxas que el resto de las proteínas de PYVV (Fig. 2). Como los valores globales de Ka/Ks pueden enmascarar los efectos de selección positiva que ocurren de forma local, se realizó un análisis por ventanas (para las proteínas pequeñas no se efectuó debido precisamente a su tamaño). Se ensayaron ventanas en un rango entre 140 y diez codones y se seleccionaron para un análisis más detallado aquellas que presentaron los mayores picos del índice Ka/Ks. De esta forma, 871 sitios mostraron una selección negativa fuerte (Ka/Ks=0), mientras que 891 posiciones presentaron selección negativa moderada (0 < Ka/Ks < 1). Se encontraron 21 posiciones con valores de Ka/Ks > 1 que sugieren selección neutral o positiva, con rangos de valores entre 1,01 a 2,14, destacándose en el segmento del ARN1 una región ubicada entre las posiciones 1659-1738 que

acumula un 15 % de cambios de aminoácidos (12/80) y que corresponde a una secuencia cercana a la lupa-P (*P-loop*) del dominio helicasa.

Para CPm se determinó el valor local de Ka/Ks para 575 posiciones usando una ventana de 100 codones; de éstos, 189 sitios mostraron una selección negativa fuerte (Ka/Ks=0), mientras que 370 posiciones presentaron selección negativa moderada (0 < Ka/Ks < 1) y se encontraron 18 posiciones con valores de Ka/Ks > 1 que sugieren selección neutral o positiva con rangos de 1,12 a 1,22 y un máximo valor en la posición 395 que incluye cinco cambios conservados: Y356F, I408V, A412V, N432S y K455R. Finalmente, en la proteína p60, a pesar de que no se encontraron regiones con valores locales de Ka/Ks > 1 usando diferentes ventanas, se pudieron diferenciar dos segmentos con selección negativa moderada centrados en las posiciones 58 (Ka/Ks=0,91, ventana= 10) y 405 (Ka/Ks=0.639, ventana=40).

Evaluación de cebadores para RT-qPCR

La utilización en pruebas de RT-qPCR de los cebadores PYVV_F_CP y qPYVV_R_CP, permitió la detección del PYVV en ocho de las 11 muestras foliares de tomate var. Chonto obtenidas durante el año 2015, incluyendo la muestra sintomática (TMS1) y la enviada para secuenciación NGS [T(NGS)]; los valores de Ct para dichas muestras se presentaron en el rango de 15,46 a 29,58. El PYVV fue también detectado en la muestra de *S. tuberosum* con síntomas severos de amarillamiento de venas utilizada como control positivo del ensayo (Ct=5,66). La especificidad de

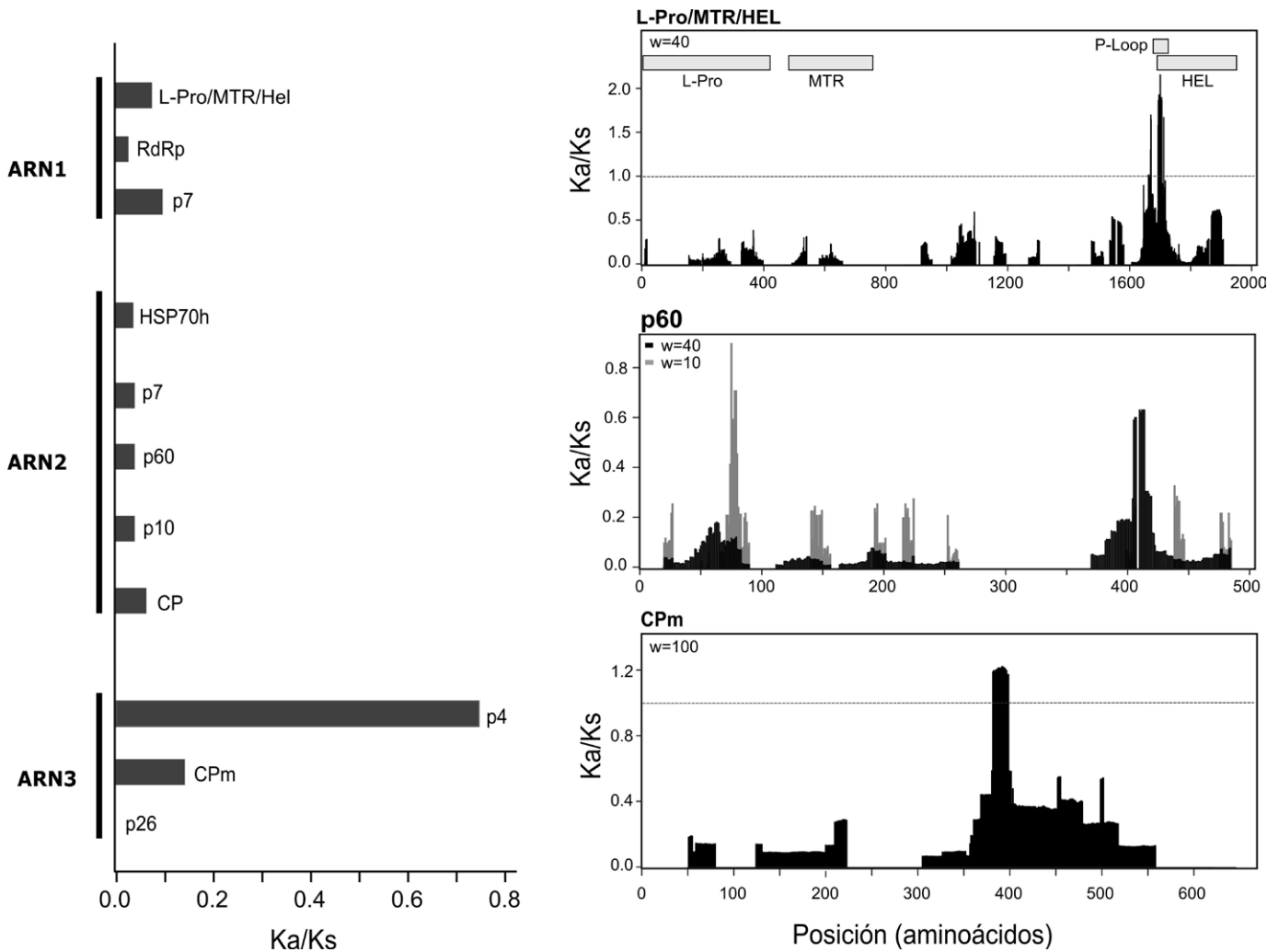


Figura 2. Análisis de selección utilizando el índice Ka/Ks para todos los ORF del genoma del *Potato yellow vein virus* (PYVV) en tejido foliar de tomate en Marinilla (Antioquia) (izquierda) y para tres ORF que presentan selección positiva (L-Pro/MTR/HEL y CPm) y negativa (p60), utilizando análisis local con ventanas de 140 a diez codones (derecha).

los amplicones fue confirmada por comparación con los valores de las temperaturas de fusión del control positivo ($T_m=77,57\text{ }^\circ\text{C}$) y de la muestra de tomate secuenciada por NGS ($T_m=79,84\text{ }^\circ\text{C}$) utilizando la herramienta de HRM (*High Resolution Melting*), obteniéndose valores de T_m en el rango de $77,57 - 80,78\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 3). Para el caso de las cinco muestras representando igual número de lotes evaluados en el año 2016, se detectó el PYVV en cuatro de los lotes con valores de Ct entre 15,28 y 29,08 y de T_m de $77,02\text{ }^\circ\text{C}$ a $79,84\text{ }^\circ\text{C}$. En este caso, el control positivo de papa también resultó efectivo, al presentar valores de Ct de 22,99 y de T_m de $77,38\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 3). La naturaleza viral de seis de los amplicones (incluyendo los dos controles positivos) fue evaluada por secuenciación de Sanger, encontrándose niveles de identidad del 93-98 % con respecto a secuencias de PYVV depositadas en GenBank (ej. KR998191, GQ397978, GQ397972).

Evaluación de cebadores para RT-PCR

La utilización mediante RT-PCR convencional de los cebadores PYVCPF y PYVPCR permitió generar los productos esperados de 758 pb en tres (T1, T2 y T3) de las cinco muestras de tomate evaluadas para este propósito y en los dos controles positivos de papa (Fig. 3). Las secuencias obtenidas para dichos amplicones presentaron niveles de identidad del 91,3 al 99,7 % con respecto a secuencias de la región CP de aislamientos de PYVV procedentes de papa y depositadas previamente en GenBank (ej. AJ586113, KC257446, HQ620547 y JF718296). De igual forma, los cebadores PYVV_F_CP y PYVV_R_CP resultaron efectivos para amplificar una región de 495 pb del gen CP de este virus en tres de las muestras de tomate (T1, T3 y T4) y en los dos controles positivos. Los niveles de identidad encontrados entre dichas secuencias y algunas obtenidas de

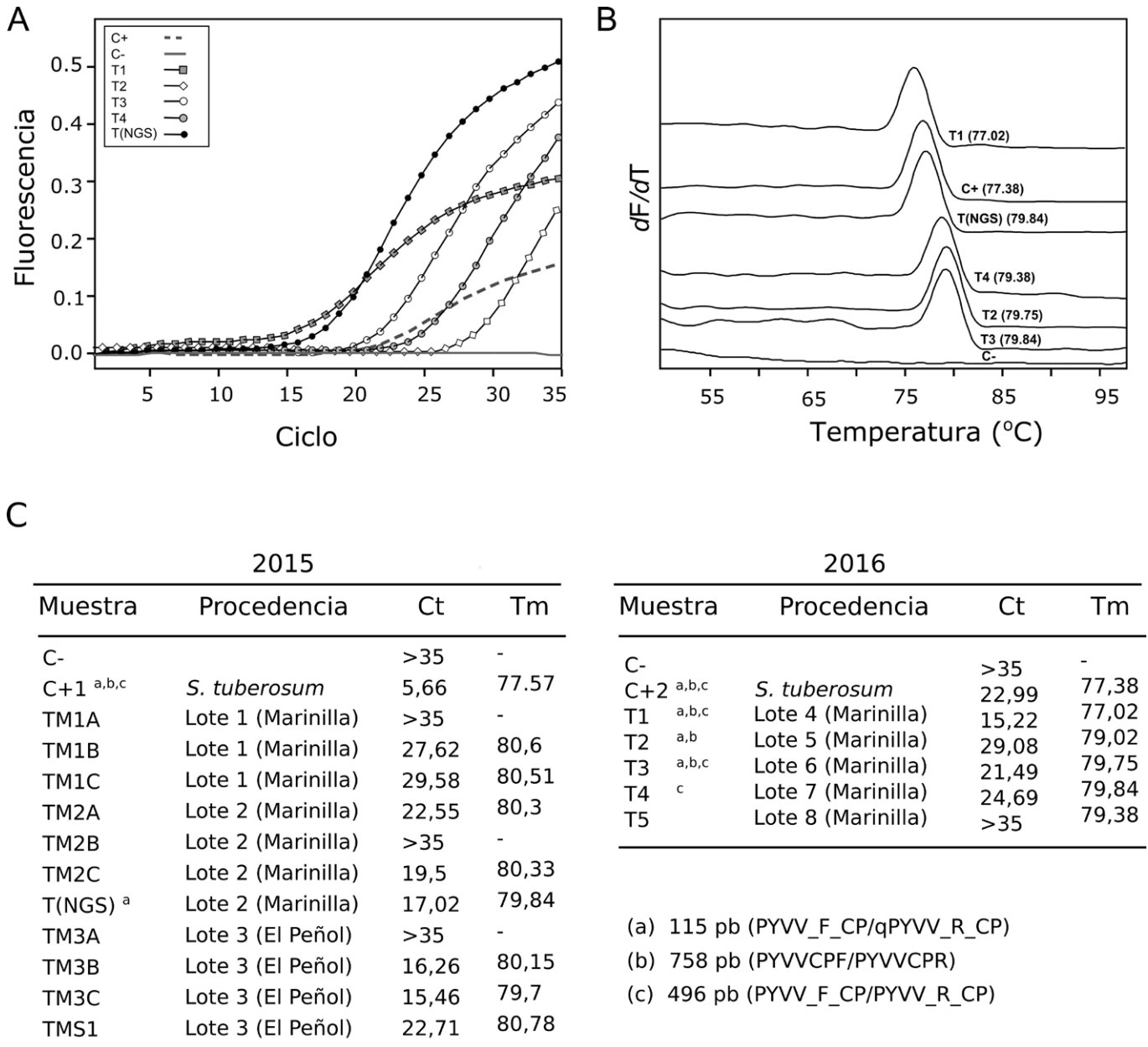


Figura 3. (A) Curvas de amplificación por RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores PYVV_F_CP y qPYVV_R_CP para la detección de *Potato yellow vein virus* (PYVV) en tejidos foliares de tomate obtenidos en el oriente de Antioquia (Colombia). **(B)** Perfiles de las curvas de desnaturalización de amplicones específicos de PYVV, con los valores de temperaturas de fusión (Tm). **(C)** Resultados de detección de PYVV por RT-qPCR en muestras de tejido foliar de tomate procedentes de cultivos del oriente de Antioquia (Colombia). a,b,c: corresponde a las muestras con secuencias confirmadas por Sanger para cada par de cebadores indicados.

GenBank para esta región de CP (ej. AJ586114, GQ397984, HQ620551, y JF718296) se presentaron en el rango de 91,7 % a 99,7 %.

Con las secuencias obtenidas con ambos juegos de cebadores por el método de Sanger para la región CP de PYVV en tomate y en los dos controles positivos en papa, se generó un alineamiento múltiple que incluyó además otras 56 secuencias obtenidas de GenBank para este virus en Colombia y Perú. El análisis filogenético generó

un dendrograma con dos clados principales (I y II) y una secuencia (T1) de PYVV de tomate que se presentó como una rama intermedia entre dichos grupos (Fig. 4). El Clado I fue el mayoritario al alojar todas las secuencias de PYVV procedentes de papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*) de diferentes departamentos de Colombia, así como la secuencia de referencia de Perú (NC_006063); de forma notable, de este grupo también hicieron parte las secuencias de la muestra consenso de PYVV en tomate secuenciada por NGS (T(NGS))

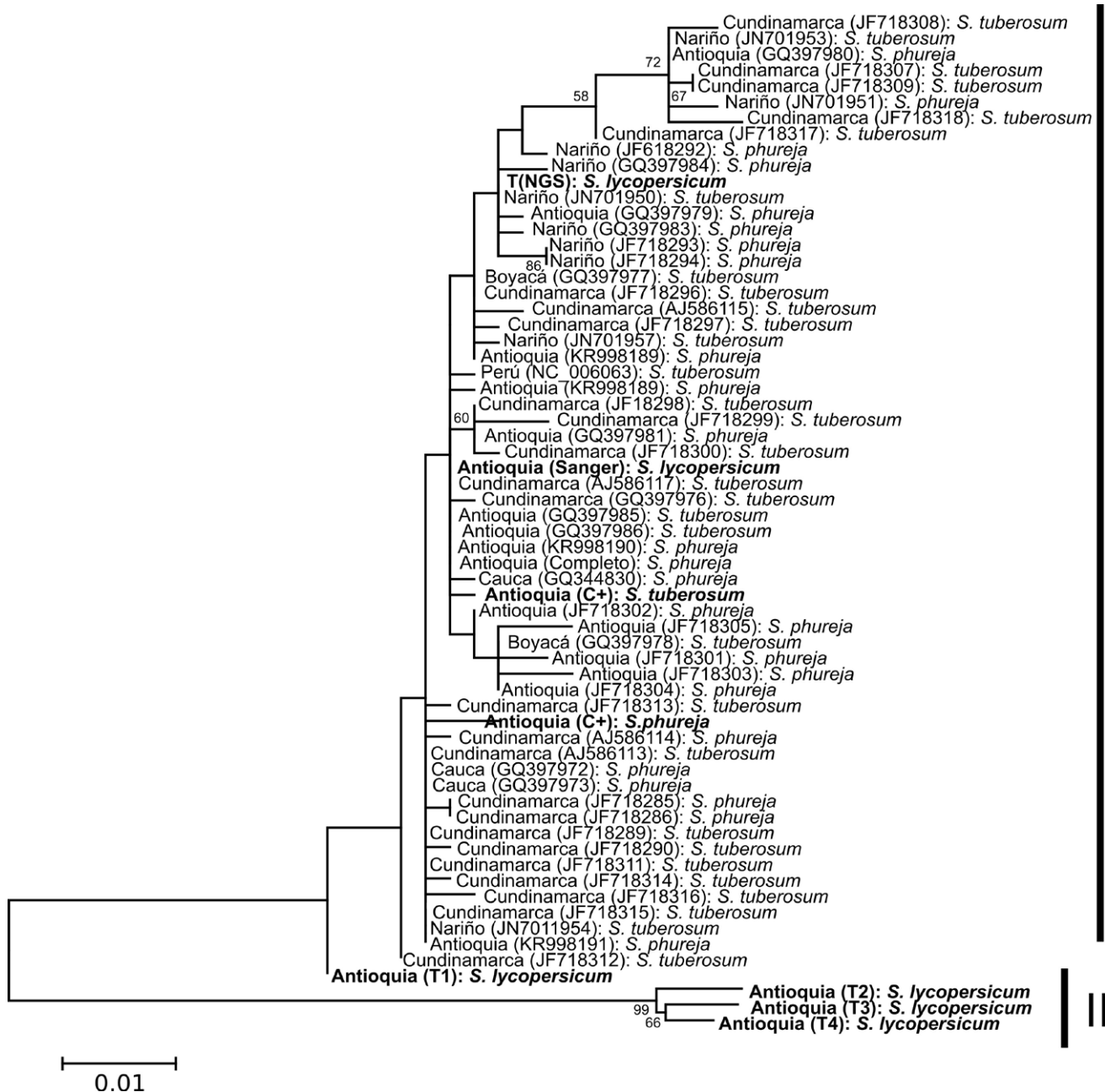


Figura 4. Árbol filogenético basado en secuencias parciales de la cápside viral de aislamientos del *Potato yellow virus V* (PYVV) procedentes de papa y tomate en Colombia y Perú. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap*. Las secuencias en negrita corresponden a las obtenidas en el presente estudio en el oriente de Antioquia (Colombia).

y aquella derivada de la confirmación de dicha muestra por Sanger [Antioquia (Sanger)]. El clado II, estuvo soportado por un valor de 99 % de *bootstrap*, e incluyó tres secuencias de PYVV en tomate obtenidas en este trabajo, que claramente representan un nuevo linaje de PYVV sobre este hospedante, y que explica en buena medida los bajos niveles de identidad (cerca al 91-92 %) que se encontraron al comparar las secuencias de algunos aislamientos de PYVV en tomate con respecto a los procedentes de papa.

DISCUSIÓN

En este trabajo utilizando un método de secuenciación masiva de nueva generación se obtuvo la secuencia del genoma completo de PYVV infectando tejido foliar de plantas de tomate var. Chonto, lo que representa el primer reporte disponible en GenBank de un genoma de este virus procedente de un hospedante diferente a papa. Durante el análisis bioinformático de la secuencia consenso, resultó evidente la ocurrencia de una mezcla de variantes en el

transcriptoma evaluado, identificándose 162, 401 y 42 sitios polimórficos para los segmentos genómicos ARN1, ARN2 y ARN3, respectivamente y niveles de variación internos para cada ORF viral en el rango de 92,2 % (p10) a 99,4 % (p26). Aunque la mayor parte de los cambios correspondieron al tercer nucleótido de codones redundantes, algunos condujeron a cambios putativos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas resultantes, siendo más numerosos en MTR/HEL (35 cambios), p60 (16 cambios), HSP70h (12 cambios) y CPm (diez cambios). Cuando se comparó la secuencia consenso aquí obtenida con los dos genomas completos de PYVV hasta ahora disponibles en papa (Livieratos *et al.*, 2004; Álvarez, 2016), los niveles de variación detectados fueron aún mayores, especialmente para el segundo segmento de ARN (entre 5,3 % y 7,5 %) que contiene parte del arreglo de genes característico de los virus de la familia *Closteroviridae*, e incluye una pequeña proteína hidrofóbica (p7), la proteína de choque térmico HSP70h, una proteína estructural de 60 kDa, la proteína de la cápside (CP) y un pequeño péptido (p10) de función desconocida (Livieratos *et al.*, 2004; King *et al.*, 2012). Tal como ocurrió con los análisis de variación encontrados en el transcriptoma de tomate aquí secuenciado, el mayor número de polimorfismos entre la secuencia consenso de PYVV y aquella obtenida en papa en Cajamarca (Perú) ocurrió en MTR/HEL, p60, HSP70h y CPm con 26, 16, 13 y 13 cambios putativos de aminoácidos en las proteínas resultantes. Estos hallazgos confirman los resultados recientemente encontrados por Chaves *et al.* (2014) y Cubillos-Abello y Guzmán-Barney (2015), en los que se señala la existencia en PYVV de mayores niveles de variación entre secuencias de CPm (diversidad nucleotídica $d=0,064$) que en CP ($d=0,010$), e incluso en dichos trabajos se sugieren eventos putativos de recombinación en dicha región del genoma de PYVV. Para el caso de CP, Chavés-Bedoya *et al.* (2013) evaluaron la estructura poblacional de PYVV con base en 69 secuencias disponibles en GenBank procedentes de aislamientos del virus obtenidos en Colombia en diferentes años (2008 a 2011), departamentos (Cundinamarca, Antioquia y Nariño) y hospedantes (*S. tuberosum* y *S. phureja*), hallando que los niveles de variación genética entre éstos no superaron el 3 %, un valor levemente inferior al encontrado en el presente estudio con respecto a las cepas de PYVV de papa (3,8 % a 3,9 %).

Con el fin de evaluar si los niveles de variación encontrados en estos ORF de PYVV estaban asociados a la ocurrencia de procesos de selección mediados posiblemente por hospedante, se realizó un análisis de selección utilizando el índice Ka/Ks , confirmándose la ocurrencia de selección positiva en algunas regiones que codifican para MET/HEL ($Ka/Ks=1,01$ a $2,14$) y CPm ($1,12$ a $1,22$), mientras que p60 presentó una selección negativa en algunas de sus regiones ($Ka/Ks=0,639$ a $0,91$); sin embargo para confirmar esta hipótesis que señala algún grado de especialización

de cepas de PYVV en tomate, será necesario en el futuro realizar evaluaciones biológicas que incluyan pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de PYVV obtenidos en papa y tomate, así como pruebas de eficiencia de transmisión por diferentes biotipos de *T. vaporariorum*, el insecto vector de este virus (Salazar *et al.*, 2000).

Por otra parte, en este trabajo se evaluó la efectividad de un par de cebadores diseñados por Álvarez (2016) para amplificar una región de 115 pb de CP mediante RT-qPCR (PYVV_F_CP-qPYVV_R_CP). Los resultados indicaron la utilidad de estos cebadores para detectar el PYVV en tomate, al obtenerse los amplicones del tamaño esperado y su confirmación por secuenciación de Sanger. Adicionalmente, las pruebas de RT-qPCR permitieron inferir altos niveles de incidencia de PYVV en cultivos de tomate en el Oriente Antioqueño, al ser detectado el virus en diez de 14 muestras compuestas (cinco submuestras foliares/muestra) asintomáticas obtenidas durante los años 2015 y 2016 con valores de Ct de 15,28 a 29,58; el virus también se detectó en una muestra con síntomas de amarillamiento de venas (TMS1), en la muestra secuenciada por NGS [T(NGS)] y en los dos controles positivos de papa utilizados en los ensayos. De gran interés resultó el hallazgo de dos valores de Tm entre los amplicones evaluados con la herramienta HRM (*High Resolution Melting*) del termociclador de tiempo real; el primer valor correspondiente a un promedio de 80,1 °C (SD=0,43) se presentó en 11 de las muestras de tomate, mientras que el otro valor (Tm promedio=77,32 °C; SD=0,27) se encontró en los dos controles de PYVV de papa y en una muestra de tomate del año 2016 (T1). Este último valor de Tm es cercano al encontrado por Álvarez (2016) cuando diseñó y validó los cebadores aquí evaluados (promedio=77,45 °C; SD=0,16) en cuatro muestras de papa con síntomas de amarillamiento de venas, lo que concuerda con el origen de los controles positivos.

Estos resultados, en su conjunto, señalan la ocurrencia de al menos dos variantes de PYVV en la región bajo estudio, con una de ellas predominando en tomate y la otra en papa. Para evaluar dichos hallazgos en el trabajo, se decidió definir durante el año 2016 la utilidad adicional de dos pares de cebadores dirigidos a amplificar por RT-PCR convencional una región de CP de 495 pb (PYVV_F_CP- PYVV_R_CP) (Álvarez, 2016) y otra de 758 pb (PYVVCPP y PYVVCPR) (Offei *et al.*, 2004), en muestras obtenidas en cultivos de tomate de Marinilla durante este año. Efectivamente, dichos cebadores permitieron obtener los amplicones del tamaño esperado en tres de las cinco muestras evaluadas y en los dos controles positivos de papa. Con las secuencias obtenidas para estas regiones se realizó un alineamiento múltiple que incluyó además la región de CP de la muestra (T(NGS)) secuenciada mediante NGS y confirmada por Sanger y 56 secuencias de CP depositadas en GenBank para aislamientos de PYVV de Colombia principalmente por Offei *et al.* (2004), Gil *et al.* (2013) y Chávez-Bedoya *et al.*

(2013; 2014). El análisis filogenético resultante permitió identificar dos clados principales, el primero incluyó todas las secuencias de PVV de papa, así como las secuencias de la muestra *bulk* de tomate secuenciada por NGS, mientras que el segundo clado sólo incluyó secuencias del virus procedentes de plantas de tomate, lo que confirma la existencia de las dos variantes detectadas por RT-qPCR y explica los niveles de variación internos encontrados en los análisis bioinformáticos realizados con los datos de NGS para diferentes regiones del genoma de PVV. De forma interesante, la muestra T1 se ubicó en una rama intermedia entre ambos clados, lo que sugeriría la existencia de un gradiente de variación entre cepas de PVV especializadas en dichos hospedantes, situación que requiere ser confirmada con el análisis de un mayor número de muestras no sólo de esta zona geográfica de Antioquia, donde se presentan arreglos mixtos o alternos de cultivos de papa y tomate, sino en otras del país donde confluya la siembra de ambos hospedantes.

Finalmente, de los resultados de RT-PCR obtenidos en el estudio, llama la atención el hecho que en dos muestras (T2 y T4) se haya detectado el PVV mediante RT-qPCR, pero no por uno de los pares de cebadores utilizados en RT-PCR convencional. Estas diferencias en la sensibilidad de dichas pruebas moleculares han sido frecuentemente reportadas en virus de plantas (Harju *et al.*, 2005; Bertolini *et al.*, 2008; Sharma y Dasgupta, 2012), siendo estimado que la RT-qPCR presenta niveles de sensibilidad superiores entre 1.000 y 100.000 veces con respecto a pruebas basadas en RT-PCR convencional; e incluso específicamente para PVV, López *et al.* (2006) señalan que la prueba de RT-qPCR con sonda Taqman diseñada para detectar una región de CP de PVV, presentaba niveles de sensibilidad superiores en 1000 veces a los encontrados con la prueba de RT-PCR convencional. Es por esto, que Álvarez (2016) en su trabajo de caracterización molecular de PVV en *S. phureja*, sugiere el empleo de la técnica de RT-qPCR para apoyar los programas de certificación de tubérculo-semilla y para la detección del virus en muestras foliares asintomáticas, mientras que indica que el uso de la RT-PCR convencional debe ser dirigido a estudios que empleen muestras sintomáticas con alto título viral, y, especialmente, en aquellos tendientes a evaluar niveles de variación molecular y de afinidad filogenética entre diferentes cepas de PVV y entre esta especie y otros crinivirus de interés agrícola.

Los hallazgos del presente estudio ponen de manifiesto la necesidad de emprender con prontitud trabajos que identifiquen los niveles de incidencia, variación genética, eficiencia de transmisión por biotipos de *T. vaporariorum*, rango de hospedantes y efecto sobre el rendimiento y la calidad de frutos de tomate en regiones cultivadoras de esta hortaliza en Colombia y otros países andinos donde se ha registrado la presencia del virus PVV.

CONCLUSIONES

En este trabajo se secuenció completamente el genoma del virus PVV infectando plantas de tomate var. Chonto en el municipio de Marinilla (Antioquia), utilizando el sistema NGS Illumina HiSeq-2000. Este virus presenta un genoma segmentado en tres moléculas de ARN de cadena sencilla positiva con tamaños de 8043 nt (ARN1), 5346 nt (ARN2) y 3896 nt (ARN3) y que codifican para las diez proteínas previamente reportadas para cepas de PVV en papa. Los niveles de identidad encontrados al interior del transcriptoma de tomate para las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas para las que codifica el segundo segmento de PVV, fueron menores que los encontrados para los ARN1 y ARN3, con valores tan bajos como 92,5 % en nucleótidos y 94 % en aminoácidos para p10, y cercanos al 5 % en nucleótidos y 2-3 % en aminoácidos para los demás ORF (Hsp70h, p7, p60 y CP) de este segmento genómico, lo que revela niveles de variación no registrados antes para este crinivirus.

Utilizando análisis de temperaturas de fusión (T_m) de amplicones obtenidos por RT-qPCR a partir de muestras de ARN total de plantas de tomate y papa del Oriente Antioqueño, se identificaron dos variantes principales de PVV, situación que fue confirmada por análisis filogenéticos utilizando secuencias de la cápside viral obtenidas a partir de la secuenciación Sanger de amplicones generados por RT-PCR convencional y que explican los niveles moderados de polimorfismo encontrados en el análisis bioinformático realizado a partir de los datos de NGS para la secuencia completa del genoma de PVV.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (Proyecto 32098). La figura suplementaria se encuentra disponible en la versión Online de la revista.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCIAS

- Agronet. Sistema de Estadísticas Agropecuarias. Available at: <http://agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%3ADsticas.aspx>. Cited: 10th July 2016.
- Álvarez D. Caracterización del viroma de tejido foliar de *Solanum phureja* en Antioquia utilizando secuenciación de nueva generación (NGS) (tesis de pregrado). Medellín: Ingeniería Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; 2016. 9 p.
- Álvarez D, Gutiérrez P, Marín M. Caracterización molecular del *Potato virus V* (PVV) infectando *Solanum phureja* mediante secuenciación de nueva generación. Acta biol Colomb. 2016;21(3):521-531. Doi:10.15446/abc.v21n3.54712

- Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, de Luis E, Vidal J, *et al.* Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathol.* 2008;120(2):177-188. Doi:10.1007/s10658-007-9206-9
- Chaves G, Guzmán M, Ortíz L. Genetic structure and evidence of putative Darwinian diversifying selection in the *Potato yellow vein virus* (PYV). *Agron Colomb.* 2013;31(2):161-168.
- Chaves G, Cubillos K, Guzmán-Barney M. First report of recombination in *Potato yellow vein virus* (PYV) in Colombia. *Trop Plant Pathol.* 2014;39(3):234-241. Doi:10.1590/S1982-56762014000300007
- Cubillos-Abello KA, Guzmán-Barney M. Molecular variability of three genes of *Potato vein yellow virus* infecting *Solanum tuberosum* using single strand conformational polymorphism. *Acta biol Colomb.* 2015;20(1):233-237. Doi:10.15446/abc.v20n1.40993
- Faostat. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. Available at: <http://faostat.fao.org/>. Cited: 10th July 2016.
- Gil JF, Cotes JM, Marín M. Incidencia visual de síntomas asociados a enfermedades virales en cultivos de papa de Colombia. *Rev Bio Agro.* 2013;11(2):101-110.
- Gish W, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.* 1993;3:266-272. Doi:10.1038/ng0393-266
- Graherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 2011;29(7):644-652. Doi:10.1038/nbt.1883
- Guzmán-Barney M, Ruíz E, Arciniegas N, Coutts R. Occurrence and variability of *Potato yellow vein virus* in three departments of Colombia. *J Phytopathol.* 2006;154(11-12):748-750. Doi:10.1111/j.1439-0434.2006.01174.x
- Guzmán-Barney M, Rodríguez P. Susceptibility of *Solanum phureja* (Juz. et Buk.) to *Potato yellow vein virus*. *Agron Colomb.* 2010;28(2):219-224.
- Guzmán-Barney M, Franco-Lara L, Rodríguez D, Vargas L, Fierro JE. Yield losses in *Solanum tuberosum* Group Phureja cultivar Criolla Colombia in plants with symptoms of PYV in field trials. *Am J Pot Res.* 2012;89(6):438-447. Doi:10.1007/s12230-012-9265-0
- Guzmán-Barney M, Hernández AK, Franco L. Tracking foliar symptoms caused by tuber-borne *Potato yellow vein virus* (PYV) in *Solanum phureja* (Juz et Buk) cultivar "Criolla Colombia". *Am J Potato Res.* 2013;90(3):284-293. Doi:10.1007/s12230-013-9303-6
- Harju VA, Skelton A, Clover GRG, Ratti C, Boonham N, Henry CM, *et al.* 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. *J Virol Methods.* 2005;123(1):73-80. Doi:10.1016/j.jviromet.2004.09.009
- Hernández-Guzmán AK, Guzmán-Barney M. 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. *Rev Colomb Biotecnol.* 2014;16(1):74-85. Doi:10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44226
- Jacquemond M, Verdin E, Dalmon A, Guilbaud L, Gognalons P. Serological and molecular detection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato. *Plant Pathol.* 2009;58(2):210-220. Doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01959.x
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editores. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Elsevier-Academic Press; 2012. p. 1327.
- Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9:357-359. Doi:10.1038/nmeth.1923
- Li, H. Seqtk. 2008. Available at: <http://github.com/lh3/seqtk>. Cited: 4th March 2016.
- Livieratos I, Eliasco E, Muller G, Olsthoorn R, Salazar L, Pleij W, *et al.* 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*. *J Gen Virol.* 2004;85(7):2065-2075. Doi:10.1099/vir.0.79910-0
- López R, Asensio C, Gúzman M, Boonham N. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of *Potato yellow vein virus* (PYV). *J Virol Methods.* 2006;136(1-2):24-29. Doi:10.1016/j.jviromet.2006.03.026
- Martínez AK, Morales FJ, Vallejo FA. Caracterización molecular de un begomovirus del tomate en el Valle del Cauca, Colombia, y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. *Acta Agron.* 2008;57(3):167-173.
- Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, Wright F, *et al.* Tablet-next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics.* 2010;26(3):401-402. Doi:10.1093/bioinformatics/btp666
- Morales FJ, Martínez AK, Olaya C, Velasco AC. Detección en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) del virus del amarillamiento de las nervaduras de la papa (*Potato yellow vein virus*) en Cundinamarca, Colombia. *Fitopatol Colomb.* 2004;28(1):40-44.
- Morales FJ, Tamayo PJ, Castaño M, Olaya C, Martínez AC, Velasco AC. Enfermedades virales del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia. *Fitopatol Colomb.* 2009;33(1):23-27.
- Muñoz-Baena L, Gutiérrez-Sánchez PA, Marín-Montoya M. Detección y secuenciación del genoma del *Potato virus Y* (PVY) que infecta plantas de tomate en Antioquia, Colombia. *Bioagro.* 2016;28(2):69-80.

- Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* 1986;3(5):418-426.
- Offei SK, Arciniegas N, Muller G, Guzmán M, Salazar LF, Coutts RH. Molecular variation of *Potato yellow vein virus* isolates. *Arch Virol.* 2004;49(4):821-827. Doi:10.1007/s00705-003-0250-2
- Prasannath K, Dharmadasa KNP, De Costa DM, Hemachandra KS. Variations of incidence, types of virus diseases and insect vector populations of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), grown in different agroecological regions of Sri Lanka under two crop management systems. *Trop Agric Res.* 2014;25(3):376-395.
- Rodríguez P, Chaves G, Franco L, Guzmán M. Low molecular variability of *Potato yellow vein virus* (PVV) isolates of *Solanum phureja* and *Solanum tuberosum* from Colombia. *Phytopathology.* 2010;100:S176. Doi:10.1094/PHYTO.2010.100.6.S172
- Salazar L, Muller G, Querci M, Zapata J, Owens R. *Potato yellow vein virus*: its host range, distribution in South America and identification as a Crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Ann Appl Biol.* 2000;137(1):7-19. Doi:10.1111/j.1744-7348.2000.tb00052.x
- Saldarriaga A, Alvarez AM, Jaramillo JE. Efecto del amarillamiento de venas transmitido por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en papa. *Rev Colomb Entomol.* 1988;14:3-8.
- Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur J Plant Pathol.* 2004;110(9):893-908. Doi:10.1007/s10658-004-4842-9
- Sharma S, Dasgupta, I. Development of SYBR Green I based real-time PCR assays for quantitative detection of *Rice tungro bacilliform virus* and *Rice tungro spherical virus*. *J Virol Methods.* 2012;181(1):86-92. Doi:10.1016/j.jviromet.2012.01.018
- Tamayo PJ, Jaramillo JE. Enfermedades del tomate, pimentón, ají y berenjena en Colombia. Bogotá: CORPOICA; 2013. 164 p.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-2729. Doi:10.1093/molbev/mst197
- Vaca-Vaca JC, Betancur-Pérez JF, López-López K. Distribución y diversidad genética de Begomovirus que infectan tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia. *Rev Colomb Biotecnol.* 2012;14(1):60-76.
- Verbeek M, Dulleman AM. First Report of *Tomato torrado virus* infecting tomato in Colombia. *Plant Dis.* 2012;96(4):592. Doi:10.1094/PDIS-11-11-1000
- Villamil-Garzón A, Cuellar WJ, Guzmán-Barney M. Natural co-infection of *Solanum tuberosum* crops by the *Potato yellow vein virus* and potyvirus in Colombia. *Agron Colomb.* 2014;32(2):213-223. Doi:10.15446/agron.colomb.v32n2.43968