

DetECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL *Potato mop-top virus* (PMTV) EN COLOMBIA MEDIANTE qRT-PCR

Detection and quantification of *Potato mop-top virus* (PMTV) in Colombia using qRT-PCR

Nevar García Bastidas¹; Pablo Gutiérrez Sánchez² y Mauricio Marín Montoya³

¹Químico MSc. en Biotecnología, Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. nevar.garcia@gmail.com

²Profesor Asociado, PhD. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. paguties@unal.edu.co

³Profesor Asociado, PhD. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. mamarinm@unal.edu.co

Rec.: 28.08.12 Acept.: 01.10.13

Resumen

El *Potato mop-top virus* (PMTV) es uno de los virus re-emergentes en cultivos de papa en Colombia. Es transmitido por *Spongospora subterranea*, el agente causal de la sarna polvosa. La detección del PMTV presenta dificultades debido a su distribución irregular en las plantas, bajo título y movimiento sistémico como ARN desnudo. Con el fin de ampliar el rango de herramientas disponibles para detectar el PMTV en los programas de certificación de tubérculo-semilla, en este estudio se evaluó la prueba de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) en dos pasos: con los cebadores PMTV-1948F/PMTV-2017R y la sonda Taqman® PMTV-1970, dirigidos al gen CP-RT del ARN2 viral. Se construyó una curva estándar a partir de la transcripción *in vitro* de un fragmento de 1513 pb de este gen. Posteriormente, se evaluó la utilidad de la técnica a partir de tres tipos de muestras: plantas señuelo de *Nicotiana benthamiana* y *Solanum phureja* inoculadas con quistosoros de Sss, raíces de papa con síntomas de sarna polvosa del municipio de La Unión (Antioquia) y tubérculos-semilla. Mediante qRT-PCR fue posible detectar el virus en 11 de las 20 muestras de raíz de plantas señuelo, mientras que 14 de las 15 muestras de raíces de papa resultaron positivas, estimándose una concentración entre 4.72×10^{11} y 7.60×10^{13} partículas virales/ μ l. Adicionalmente, en el ensayo de tubérculo-semilla se determinó la presencia del PMTV en una de las 16 muestras. Estos resultados indican la viabilidad de utilizar rutinariamente la técnica de qRT-PCR para la detección de PMTV en Colombia.

Palabras clave: RT-PCR en tiempo real, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*, *Spongospora subterranea*

Abstract

Potato mop-top virus (PMTV) is a re-emerging virus in potato crops in Colombia. It is transmitted by *Spongospora subterranea*, the causal agent of Powdery scab. Detection of PMTV is difficult due to its irregular distribution in infected plants, low titer and systemic movement of naked RNA. To increase the number of diagnostic tools available to detect the PMTV strains present in Colombia and to support seed certification schemes, a two-step qRT-PCR test using primers PMTV-1948F/ PMTV-2017R and the Taqman® probe PMTV-1970 targeted to the CP-RT gene of RNA2 from PMTV was evaluated. A standard curve was obtained from *in vitro* transcripts of a 1513 pb fragment of this gene. The qRT-PCR test was evaluated using *Nicotiana benthamiana* and *Solanum phureja* bait plants inoculated with Sss

cystosori, root-tissue from plants of potato showing symptoms of Powdery scab in La Unión (Antioquia, Colombia) and commercial tuber seeds. qRT-PCR was able to detect PMTV from roots in 11 out of 20 bait plants; while in the case of field samples 14 out 15 plants tested positive with concentration between $4,72 \times 10^{11}$ - $7,60 \times 10^{13}$ viral particles/ μ L. Finally, PMTV was detected in one out of 16 tuber seeds tested. These results demonstrate that qRT-PCR can be used routinely in the detection of PMTV strains affecting potato in Colombia.

Key words: Real time RT-PCR, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*, *Spongospora subterranea*

Introducción

El *Potato mop-top virus* (PMTV) (*Pomovirus*, *Virgaviridae*) es un virus prevalente en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la región Andina (Salazar, 2006). Su presencia en Colombia, aunque reconocida desde los años 1970, fue confirmada tan sólo en 2007 (Vélez, 2007). Es transmitido por *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson (Sss) (Jones y Harrison, 1969), agente causal de la sarna polvosa de la papa, una de las enfermedades más limitantes para la producción de este cultivo en Colombia (Osorio *et al.*, 2012). El PMTV también puede ser transmitido por tubérculo-semilla, especialmente cuando se obtienen tubérculos de plantas con síntomas foliares de la enfermedad (Santala *et al.*, 2010). La enfermedad inducida por PMTV se manifiesta por un amplio rango de síntomas. En cultivos de Europa y Norte América es frecuente la presencia de anillos sobre la superficie de los tubérculos, que internamente se observan como arcos necrosados ‘spraing’, siendo posible confundir estos síntomas con los causados por el *Tobacco rattle virus* (TRV) o por la raza NTN de *Potato virus Y* (PVY) (Calvert y Harrison, 1966; Santala *et al.*, 2010). A nivel foliar, las plantas presentan moteados cloróticos con formas de V (tipo ‘Aucuba’), además de la reducción en la longitud de los entrenudos (‘mop-top’) (Calvert y Harrison, 1966). En la región Andina no se manifiestan los síntomas en los tubérculos; mientras que a nivel foliar se presentan amarillamientos, enanismos y acortamiento de entrenudos (Tenorio *et al.*, 2006), aunque en muchas ocasiones pueden ocurrir infecciones asintomáticas (Latvala-Kilby *et al.*, 2009). No obstante, hasta el presente la sintomatología que ocasiona este virus en las variedades cultivadas de papa en

Colombia no se ha determinado claramente (Osorio *et al.*, 2012).

El genoma de PMTV consta de tres moléculas de ARN de cadena sencilla, encapsuladas en forma individual en partículas con forma de varilla rígida (Savenkov *et al.*, 1999). El ARN1 codifica para la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) (Savenkov *et al.*, 2003). El ARN2 contiene un ORF para la proteína de la cápside (CP) y para una proteína CP-RT generada por lectura continua (‘readthrough’) asociada con la transmisión del PMTV por Sss (Sandgren *et al.*, 2001). El ARN3 codifica para el triple bloque de genes (TGB) cuyas proteínas asisten el movimiento célula a célula del virus en forma de ARN desnudo; además de una proteína de 8 kDa, rica en cisteína (CRP) (Savenkov *et al.*, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la proteína TGBp1 actúa en asociación con los microtúbulos y plasmodesmos, lo cual soporta su función como proteína de movimiento (Shemyakina *et al.*, 2011).

El manejo de las enfermedades virales se sustenta en la disponibilidad de herramientas eficientes de detección que apoyen los programas de certificación de semilla, manejo de vectores y mejoramiento genético. Para el caso del PMTV, el desarrollo de dichas técnicas ha sido difícil debido a su distribución errática en las plantas, bajo título viral en los tejidos e infección sistémica en forma de ARN desnudo (Xu *et al.*, 2004; Santala *et al.*, 2010). En adición, McGeachy y Barker (2000) encontraron que no todas las células infectadas por PMTV contienen viriones, lo que puede explicar la amplia gama de síntomas inducidos por el virus, ya que la cápside es requerida para la expresión de dichos síntomas.

Entre las metodologías desarrolladas para la detección de PMTV se incluyen bioensayos con plantas señuelo como *N.*

benthamiana (Vélez, 2007), pruebas de ELISA con anticuerpos mono- y policlonales (Arif y Torrance, 1996; Cerovska *et al.*, 2003), RT-PCR convencional (MacKenzie, 1996; Xu *et al.*, 2004), RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) (Mumford *et al.*, 2000) y macro- (Maoka *et al.*, 2010) y microarreglos (Nicolaisen, 2011) que permiten la detección de diferentes virus simultáneamente.

Los primeros estudios de detección del PMTV en Colombia se realizaron con el uso de pruebas de RT-PCR con cebadores dirigidos a los genes CP y TGB2 (Vélez, 2007) y posteriormente por secuenciación parcial de los ARN2 y 3 (Gil *et al.*, 2011; Osorio, 2012). Recientemente, Gallo (2012) y Andrade (2012) diseñaron péptidos sintéticos basados en las secuencias de aislamientos colombianos de PMTV para la generación de anticuerpos policlonales, dirigidos al reconocimiento de regiones N-terminal de CP y C-terminal de CP-RT. A pesar de que el uso de plantas señuelo, en conjunto con el uso de técnicas serológicas o moleculares, ha brindado una alternativa para la detección de PMTV, el tiempo requerido (> 1 mes) hace poco práctico su empleo para el diagnóstico rutinario del virus. Por el contrario, la técnica de qRT-PCR ofrece una alta celeridad (< 6 h), altos niveles de sensibilidad y la posibilidad de cuantificar el título viral en los tejidos (Schena *et al.*, 2004). La utilización de métodos altamente sensibles para la detección de PMTV, es un factor fundamental para el apoyo de los programas de mejoramiento genético y certificación de tubérculos-semilla de papa en Colombia, más aún cuando hasta el momento no se conoce con precisión cuáles son los efectos de este virus sobre las variedades de papa cultivadas en el país. En esta investigación se evaluó la utilidad de la técnica de qRT-PCR para la detección de aislamientos colombianos de PMTV, estimando las concentraciones virales en tejidos de papa y *N. benthamiana*, a partir de comparaciones con curvas estándar generadas por la transcripción *in vitro* de una porción del genoma del virus.

Materiales y métodos

Muestras utilizadas. Para las pruebas iniciales de qRT-PCR se utilizaron 20 muestras

de ARN total, obtenidas previamente por Osorio (2012). La validación de la técnica se realizó a partir de la inoculación con quistosoros de Sss de 10 plantas señuelo de *Nicotiana benthamiana* Domin. y 10 de *Solanum phureja* Juz. et. Buk. Estas plantas fueron mantenidas en casa de malla del Centro Experimental Paysandú (6° 12' 37" N y 75° 30' 11" O), Medellín, departamento de Antioquia. Igualmente fueron recolectadas raíces de 15 plantas de papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*) con síntomas de sarna polvosa de cultivos del municipio de La Unión (5° 58' 38" N y 75° 24' 54" O), departamento de Antioquia, así como 16 tubérculos-semilla asintomáticos de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, comercializados en este municipio.

Evaluación de qRT-PCR para detección de PMTV. Esta evaluación se hizo en las 20 muestras de ARN total proveídas por Osorio (2012), con la amplificación y especificidad de los cebadores PMTV-1948F (5'-GTGAT-CAGATCCGCGTCCTT-3') y PMTV-2017R (5'-CCACTGCAAAGAACCGATTTTC-3'), así como la sonda Taqman® PMTV-1970 (5'-FAM-ACCAGAACTACGGTGCCGCGTCG-BHQ-1-3') (Mumford *et al.*, 2000). Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en dos pasos. Para la retrotranscripción se utilizaron 20 µl conteniendo 40 U de la enzima M-MuLV (Thermo, EEUU), 1X de buffer RT, 1 mM de dNTPs, 5 mM de MgCl₂, 1 µM del cebador reverso 123end (5'-GTGAAC-CACGGTTTARCCCTGKAAGC-3') (Savenkov *et al.*, 1999), 20 U de inhibidor de ARNasas y 5 µl de ARN. Las reacciones se incubaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) a 65 °C por 5 min, seguido de 37 °C por 60 min y 70 °C por 10 min. El qPCR se realizó con el kit Maxima Probe/ROX (Thermo) en 25 µl incluyendo 12.5 µl del kit, 9.5 µl de agua, 0.3 µM de cada cebador, 0.2 µM de sonda Taqman® y 1 µl de ADN copia (ADNc). Las pruebas se realizaron en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen) y consistieron de 95 °C por 4 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 25 s y 60 °C por 1 min. Los valores Ct (ciclo umbral) fueron definidos utilizando los parámetros por defecto del software Rotor-Gene Q ver.1.7, siendo consideradas como positivas aquellas muestras que superaron el valor del umbral antes del ciclo 40 (Schena

et al., 2004). La eficiencia de las reacciones se calculó con la fórmula $E = 10^{(-1/m)}$, donde E es la eficiencia de la amplificación y m la pendiente. En todos los ensayos se empleó un control negativo con agua destilada estéril y un control positivo consistente en ADNc del aislamiento NOV114 de PMTV, obtenido por Osorio (2012).

Con el fin de corroborar la naturaleza viral de los amplicones, se procedió a la purificación de cinco de estos mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), para su secuenciación directa en la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias fueron editadas con el software BioEdit 6.0.6 (Hall, 1999) y confirmadas por comparación con las bases de datos moleculares mediante BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Preparación de la curva estándar. Se obtuvo por RT-PCR convencional un producto de 1513 pb del ARN2 del genoma del aislamiento SRL5 de PMTV (Santa Rosa de Osos, Antioquia), utilizando el cebador 123end en la RT y los cebadores PMTV_759F (5'-ACCTGAGGTCAGAGTTATCGACG-3') (Gil *et al.* 2011) y PMTV_2017R (5'-CCACTGCAAAAGAACCGATTTC-3') (Mumford *et al.*, 2000), en la PCR. Esta última se realizó en un volumen de 25 μ l que incluía 17.8 μ l de agua, 1X buffer de enzima (10X), 1.8 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa (Thermo) y 1 μ l de ADNc. El programa de amplificación consistió en 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 extensión final a 72 °C por 5 min.

Este fragmento se clonó utilizando el kit CloneJET PCR Cloning (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante y se transformó en células competentes DH5 α de *Escherichia coli* utilizando choque térmico (Sambrook y Rusell, 2001). La selección de las bacterias recombinantes se estableció en cultivos con medio LB conteniendo ampicilina (100 mg/ml). Se seleccionaron y cultivaron seis colonias durante 16 - 18 h, a 37 °C en 5 ml de medio LB líquido que contenía ampicilina, para proceder a la extracción de los plásmidos utilizando el kit Plasmid Miniprep (Qiagen). La concen-

tración de plásmidos fue determinada en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo); 3 μ g de este producto fueron linearizados con la enzima NcoI (Thermo). El vector linearizado se sometió a transcripción *in vitro* con el kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription (Thermo). El ARN obtenido se purificó por el método del fenol:cloroformo y su posterior precipitación con etanol absoluto (Sambrook y Rusell, 2001), cuantificándose nuevamente en Nanodrop 2000C (Thermo). 600 ng/ μ L del ARN transcrito fueron utilizados como molde para su retrotranscripción con el cebador PMTV_2017R y 20 U de M-MuLV reversa transcriptasa (Fermentas). Finalmente, se prepararon diluciones seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} , a partir de una concentración inicial de 1000 ng/ μ l de ADNc, equivalente a 1.20×10^{18} copias virales/ μ l, de acuerdo con la fórmula:

$$pmol \text{ de ADNc} = \mu g(\text{de ADNc}) \times (10^6 \text{ pg}/1\mu g) \times (1 \text{ pmol}/330 \text{ pg}) \times (1/\# \text{bases del transcrito}),$$

utilizando el número de Avogadro (6.023×10^{23}) para estimar el número de transcritos. De esta forma, se procedió a realizar por triplicado las reacciones de qPCR para cada una de las diluciones de ADNc y construir una curva estándar por comparación entre los valores de Ct para cada dilución y la concentración estimada de copias virales. Todas las reacciones de qRT-PCR fueron realizadas en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Validación de las pruebas de qRT-PCR. Se realizó una extracción de ARN total con el kit RNeasy Plant mini (Qiagen, EEUU), a partir de 100 mg de las porciones más jóvenes de los tejidos radicales y foliares de las plantas, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue eluido en 40 μ l de agua tratada con DEPC. Se evaluó la validez de la prueba de qRT-PCR en dos pasos, sobre 20 muestras tanto de tejido foliar como radicular de las plantas señuelo y de las 15 muestras radicales de papa con síntomas de sarna polvosa. Adicionalmente, se utilizó la prueba de qRT-PCR para detectar el PMTV en muestras compuestas de cuatro brotes de 2 cm, obtenidos de ocho tubérculos-semilla de la variedad Diacol-Capiro y ocho de la variedad Criolla Colombia.

Resultados y discusión

En el ensayo inicial de la técnica de qRT-PCR en dos pasos para la detección de PMTV tendiente a verificar la utilidad de los cebadores diseñados por Mumford *et al.* (2000) se detectó este virus en nueve de las 20 muestras de ARN total (Ct entre 21.72 y 38.34). El control negativo presentó un valor de Ct > 40 (Figura 1). La secuenciación de cinco de los amplicones permitió confirmar su origen en el dominio CP-RT de PMTV, con valores de identidad del 97% (valores e: 0.12 y 0.20) y porcentajes de cobertura de 100%, con respecto a secuencias de este virus depositadas en GenBank (HQ285252, FM205706 y AM503633). La curva estándar realizada presentó un coeficiente de correlación $R^2 = 0.99$, pendientes de -3.38 y eficiencia de la reacción de 0.97, lo que indica una respuesta lineal altamente confiable para la detección y cuantificación de los aislamientos colombianos de PMTV (Figura 2). En términos de copias virales/ μ l la curva estándar cubre un rango de 1.20×10^8 a 1.20×10^{11} . En trabajos posteriores será posible preparar un mayor número de diluciones que permitan alcanzar valores teóricos de 10 - 100 copias virales/ μ l. En este sentido, el estudio original de Mumford *et al.* (2000), indicó que esta técnica presentaba niveles

de sensibilidad 10,000 veces superior con respecto a ELISA; aunque en dicho trabajo no se detectó la cantidad absoluta de copias virales. Sin embargo, en un estudio realizado por Bertolini *et al.* (2008) para la detección del *Citrus tristeza virus* en plantas y áfidos, se determinó que con la técnica de qRT-PCR se pueden detectar hasta 17 copias del virus, presentando niveles de sensibilidad superiores en 100 - 500 veces a IC-RT-PCR anidada y de 1,000,000 veces con respecto a DAS-ELISA. Por esto no hay duda que la aplicación de esta prueba en la agroindustria de la papa en Colombia ofrecerá niveles de sensibilidad no alcanzados por otras metodologías hasta ahora empleadas para la detección de PMTV.

La herramienta desarrollada se fundamentó en la prueba de qRT-PCR en dos pasos, en lugar de la inicialmente planteada en un paso por Mumford *et al.* (2000); además se incluyó una curva estándar para la cuantificación absoluta del virus. La realización de estas modificaciones con respecto al procedimiento original se fundamentó en criterios económicos y prácticos. En el primer caso, se obvia la adquisición de kits de qRT-PCR que resultan hasta 30% más costosos que los de qPCR. Desde el punto de vista práctico, el formato seleccionado utiliza el sistema químico TaqMan®, con sus ventajas de alta

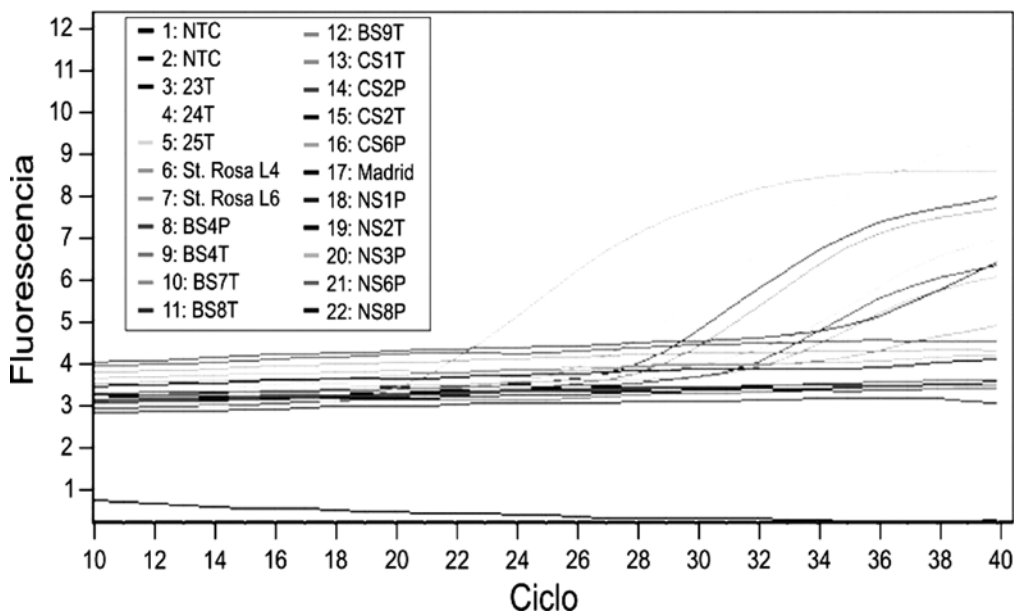


Figura 1. Curva de amplificación por qRT-PCR en dos pasos utilizando el sistema Taqman®, a partir de 20 muestras de ARN total de plantas señuelo inoculadas con quistosoros de *Spongospora subterranea*.

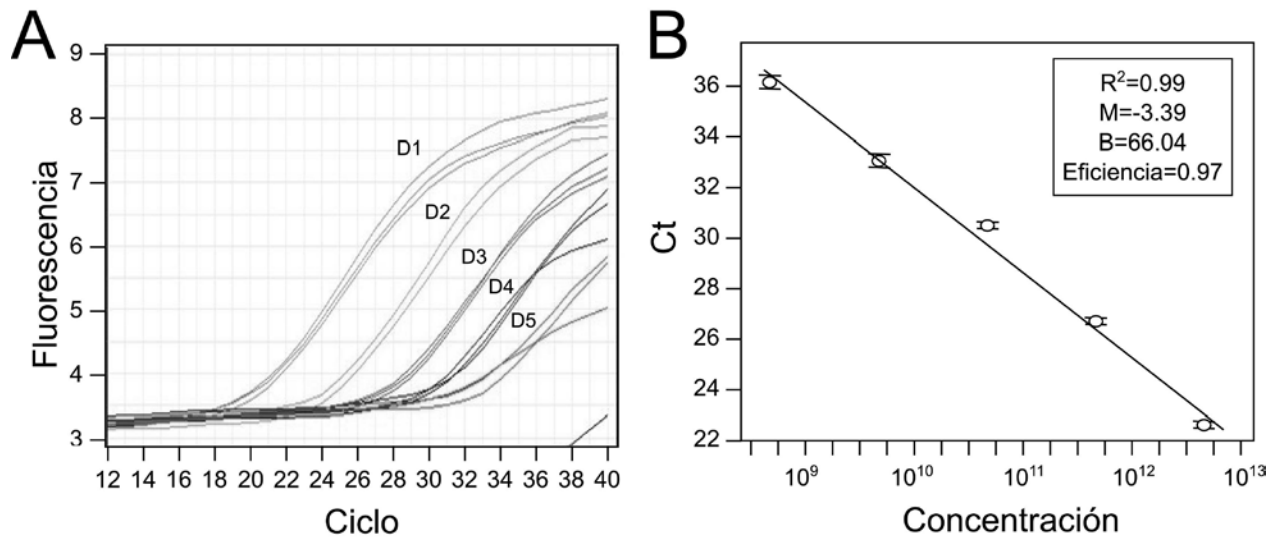


Figura 2. Curva estándar construida con las pruebas de qRT-PCR en dos pasos para la cuantificación de PMTV en Colombia **(A)**. Curvas de amplificación. **(B)**. Curva estándar. Se presentan los valores del coeficiente de correlación (R^2), la pendiente (M), el intercepto (B) y la eficiencia de la reacción (E).

sensibilidad, mayores niveles de especificidad que otros sistemas y facilidad en su aplicación masiva y rutinaria (Schena *et al.*, 2004; Bertolini *et al.*, 2008). Así mismo, la prueba en dos pasos posibilita el uso de SYBR Green cuando no sea posible la adquisición del kit TaqMan® y es factible combinarla con la prueba de qPCR implementada por los autores de esta investigación para la detección de Sss (García, 2012). Esto último es posible, si se utilizan fluorocromos diferentes en las sondas TaqMan® específicas para cada patógeno (Qu *et al.*, 2011).

La validación de la qRT-PCR en dos pasos, a partir de las 20 plantas señuelo, permitió detectar la presencia del PMTV en 11 de las muestras de raíz y en seis de las muestras de tejido foliar, con la presencia de valores de Ct entre 36.74 - 39.69 y 36.26 - 39.37, respectivamente, -Ct para controles positivos de 20.05 para raíces y 33.62 para tejido foliar y > 40 para controles negativos-. La cuantificación del número de copias virales/ μl por comparación con la curva estándar varió entre 6.03×10^7 y 4.49×10^8 para raíz, mientras que para el tejido foliar fue de 7.48×10^7 a 6.23×10^8 (Cuadro 1). Por tanto, se demostró que el empleo de tejido radicular es más propicio para la detección del PMTV que aquel de origen foliar. Un resultado similar

halló Andrade (2012) quien desarrolló anticuerpos policlonales dirigidos a la proteína CP-RT del PMTV y observó que su empleo en pruebas de ELISA indirecto permitía detectar el virus en niveles superiores a 50%, cuando se utilizaban raíces para la evaluación. Esto se puede explicar por la ubicación de las estructuras del vector Sss en las raíces de las plantas, lo que supone la presencia de un mayor título del virus en dicho tejido; más aún cuando se ha reportado que el movimiento sistémico del PMTV es parcial y erráticamente distribuido (Santala *et al.*, 2010). No obstante, dicha situación puede cambiar para aquellas variedades de papa, especialmente de la región templada, donde se presentan síntomas conspicuos causados por PMTV en el tejido foliar de las plantas infectadas.

Por otra parte, en la evaluación realizada a partir de raíces de plantas de papa, fue posible detectar el PMTV en 14 de las 15 muestras, con valores de Ct de 25.56 a 33.04 y concentraciones estimadas entre 4.72×10^{11} y 7.6×10^{13} copias virales/ μl -Ct de 20.05 para control positivo y > 40 para control negativo- (Cuadro 2). Este resultado brinda un soporte experimental a la hipótesis planteada por Gil *et al.* (2011) en el sentido de que los aumentos de niveles de incidencia

Cuadro 1. Detección y cuantificación por qRT-PCR en dos pasos de PMTV en muestras de tejido radicular y foliar de plantas señuelo de *N. benthamiana* y *S. phureja* inoculadas con quistosoros de *Spongospora subterranea* provenientes de suelos de diferentes departamentos de Colombia.

Muestra	Hospedante	Raíces		Folículos	
		Ct*	CV/μl**	Ct	CV/ μl
BS9-P	<i>S. phureja</i>	38.4	1.45x10 ⁸	>40	-
CS10-P	<i>S. phureja</i>	>40***	-	36.26	6.23x10 ⁸
BS7-P	<i>S. phureja</i>	38.11	1.76x10 ⁸	>40	-
BS7P-II	<i>S. phureja</i>	39.69	6.03x10 ⁷	>40	-
BS10-P	<i>S. phureja</i>	36.88	4.07x10 ⁸	>40	-
BS4-P	<i>S. phureja</i>	>40	-	>40	-
BS4-P II	<i>S. phureja</i>	>40	-	38,25	1.61x10 ⁸
CS4-P	<i>S. phureja</i>	>40	-	>40	-
CS4-P II	<i>S. phureja</i>	>40	-	>40	-
BS2-P	<i>S. phureja</i>	39.45	7.09x10 ⁷	>40	-
BS1-T	<i>N. benthamiana</i>	37.65	2.42x10 ⁸	36.87	4.10x10 ⁸
ZIPAQUIRA-T	<i>N. benthamiana</i>	36.74	4.49x10 ⁸	37.63	2.46x10 ⁸
TUNJA-T	<i>N. benthamiana</i>	39.4	7.33x10 ⁷	37.88	2.06x10 ⁸
NS12-T	<i>N. benthamiana</i>	>40	-	>40	-
NS1-T	<i>N. benthamiana</i>	>40	-	>40	-
NS10-T	<i>N. benthamiana</i>	>40	-	>40	-
Sta Rosa L4-T	<i>N. benthamiana</i>	39.69	6.03x10 ⁷	39.37	7.48x10 ⁷
CS6-T	<i>N. benthamiana</i>	39.31	7.83x10 ⁷	>40	-
NS4-T	<i>N. benthamiana</i>	37.74	2.28x10 ⁸	>40	-
Madrid-T	<i>N. benthamiana</i>	>40	-	>40	-
Pos	Control positivo	20.05	3.79x10 ¹³	33.62	3.74x10 ⁹
Ntc	Control negativo	>40	-	>40	-

*Ct: Ciclo umbral. **CV: Copias virales. *** Valores Ct>40 indican resultados negativos.

Cuadro 2. Detección y cuantificación por qRT-PCR en dos pasos de PMTV en muestras de tejido radicular de plantas de papa con síntomas de sarna polvosa obtenidas en cultivos del municipio de La Unión (Antioquia).

Muestra	Hospedante	Ct*	CV/μl**
L1R1	<i>S. tuberosum</i>	28.53	1.01x10 ¹³
L1R2	<i>S. tuberosum</i>	26.12	5.20x10 ¹³
L1R3	<i>S. tuberosum</i>	31.53	1.32x10 ¹²
L2R1	<i>S. tuberosum</i>	33.04	4.72x10 ¹¹
L2R2	<i>S. tuberosum</i>	30.08	3.53x10 ¹²
L2R3	<i>S. tuberosum</i>	32.6	6.37x10 ¹¹
L3R1	<i>S. tuberosum</i>	26.08	5.37x10 ¹³
L3R2	<i>S. tuberosum</i>	30.87	2.07x10 ¹²
L3R3	<i>S. tuberosum</i>	31.98	9.66x10 ¹¹
L4R1	<i>S. tuberosum</i>	25.56	7.60x10 ¹³
L4R3	<i>S. tuberosum</i>	30.04	3.63x10 ¹²
L4R4	<i>S. tuberosum</i>	32.54	6.61x10 ¹¹
L4R2	<i>S. tuberosum</i>	>40	-
L3R4	<i>S. tuberosum</i>	28.1	1.35x10 ¹³
L3R5	<i>S. tuberosum</i>	29.31	5.94x10 ¹²
Pos	Control positivo	19.42	4.96x10 ¹⁵
Ntc	Control negativo	>40	-

*Ct: Ciclo umbral **CV: Copias virales *** Valores Ct > 40 indican resultados negativos.

de Sss en Colombia estarían acompañados por incrementos proporcionales de su virus asociado PMTV. En el futuro será de gran interés utilizar la herramienta qRT-PCR en dos pasos evaluada en el presente estudio, para estimar cuantitativamente dicha asociación.

Finalmente, en esta investigación se evaluó la ocurrencia del PMTV en tubérculos-semilla de papa utilizando el sistema pro-

puesto por Latvala-Kilby *et al.* (2009), a partir de brotes y no de los tejidos de la superficie de los tubérculos. En esta evaluación se encontró que uno de los tubérculos resultó positivo para PMTV (Ct 38.63), con una concentración estimada de 1.05 x 10¹⁰ copias virales/μl. Esto demuestra la utilidad de la técnica para esta otra aplicación, más aún cuando la detección del PMTV en tubérculos

conduce frecuentemente a falsos negativos, dado el bajo título viral que allí se presenta y a la distribución irregular del virus entre los diferentes tejidos de éste (Sokmen *et al.*, 1998; Latvala-Kilby *et al.*, 2009).

La detección de virus que presentan bajo título en las plantas infectadas y sistemicidad parcial, es compleja y requiere de la utilización complementaria de diferentes métodos de diagnóstico (Xu *et al.* 2004; Santala *et al.* 2010). Para el caso del PMTV, esto es más evidente, ya que existen reportes de la ocurrencia del movimiento célula-célula del ARN viral en ausencia de partículas ensambladas (Shemyakina *et al.*, 2011). Por esta razón, las técnicas serológicas deben estar acompañadas de evaluaciones moleculares para la detección del PMTV. La metodología de qRT-PCR evaluada en este trabajo, sumada a las pruebas de ELISA desarrolladas a partir de la generación de anticuerpos policlonales contra péptidos sintéticos diseñados por Andrade (2012) y Gallo (2012), además de la secuenciación parcial de genotipos del virus presentes en Antioquia y Boyacá (Osorio, 2012), que posibilitan el diseño de cebadores específicos para pruebas de RT-PCR convencional, ofrecen una amplia gama de herramientas de detección de este virus en Colombia. Se espera que los organismos de sanidad vegetal estatal, los gremios de productores y las empresas semilleras hagan uso de dichas metodologías, especialmente para los procesos de vigilancia cuarentenaria, certificación de tubérculo-semilla y generación de materiales resistentes en programas de mejoramiento genético de papa.

Conclusiones

- Se evaluó la metodología de qRT-PCR en dos pasos para la detección de genotipos colombianos de PMTV, a partir de tres tipos de muestras diferentes: plantas señuelo inoculadas con quistosoros de Sss, raíces de papa con síntomas de sarna polvosa y brotes de tubérculo-semilla. En los tres casos fue posible la detección de PMTV, así como la cuantificación de sus niveles de inóculo, por comparación con una curva estándar basada en la transcripción *in vitro* de una porción del ARN2 del genoma viral.

- A diferencia de los otros virus que afectan la papa, para la detección de PMTV se debe contemplar la evaluación del tejido radicular, por cuanto en las evaluaciones realizadas sobre plantas señuelo y de papa, fue evidente la presencia de mayores niveles de inóculo viral en dicho tejido, en comparación con aquel de tipo foliar.

Agradecimientos

A Inés Osorio por proveer el ARN total utilizado en las pruebas iniciales y las plantas señuelo para las evaluaciones bajo condiciones de casa malla. Esta investigación fue financiada por el proyecto 090-2007S4527-87-08 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia.

Referencias

- Andrade, D. M. 2012. Detección serológica del virus mop-top de la papa (PMTV) utilizando anticuerpos policlonales obtenidos a partir de péptidos sintéticos del gen CP-RT. Tesis de pregrado. Universidad de Nariño. Pasto, Nariño, Colombia. 169 p.
- Arif, M. y Torrance, L. 1996. Detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers. En: Proceedings Crop Protection in Northern Britain. Dundee, Reino Unido. p. 325 - 330.
- Bertolini, E.; Moreno, A.; Capote, N.; Olmos, A.; de Luis, A.; et al. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. Eur. J. Plant Pathol. 120:177 - 188.
- Calvert, E. y Harrison, B. 1966. Potato mop-top, a soil borne virus. Plant Pathol. 15:31 - 40.
- Cerovska, N.; Moravec, T.; Rosecka, P.; Dedic, P.; y Filigarova, M. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of Potato mop-top virus. J. Phytopathol. 151:195 - 200.
- Gallo, Y. 2012. Generación de antígenos derivados de la proteína de la cápside de PVY, TaLMV y PMTV, para la producción de anticuerpos útiles en el desarrollo de pruebas serológicas. Tesis de Maestría en Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Bogotá, Colombia. 146 p.
- García, N. 2012. Detección y cuantificación de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* y su virus asociado *Potato mop top virus* (PMTV) en cultivos de papa de Colombia, mediante PCR en tiempo real. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Medellín, Colombia. 229 p.

- Gil, J.; Gutiérrez, P.; Cotes, J.; González, E.; y Marín, M. 2011. Caracterización genotípica de aislamientos colombianos del *Potato mop-top virus* (PMTV, *Pomovirus*). *Actual. Biol.* 33:69 - 84.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95 - 98.
- Jones, R. A. y Harrison, D. B. 1969. The behaviour of *Potato mop-top virus* in soil, and evidence for its transmission by *Spongospora subterranea* (Wall.) Lagerh. *Ann. Appl. Biol.* 63:1 - 17.
- Latvala-Kilby, S.; Aura, J.; Pupola, N.; Hannukkala, A.; y Valkonen, J. 2009. Detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers and sprouts: combinations of RNA2 and RNA3 variants and incidence of symptomless infections. *Phytopath.* 99:519 - 531.
- MacKenzie, D.J. 1996. Detection of *Potato mop-top virus* in leaf or tuber tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. En: Centre for Plant Health, Agriculture and Agri-Food Canada. Document CPHBT96K03. Sidney (BC), Canada.
- McGeachy, K. D. y Barker, H. 2000. *Potato mop-top virus* RNA can move long distance in the absence of coat protein: Evidence from resistant, transgenic plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:125 - 128.
- Maoka, T.; Sugiyama, S.; Maruta, Y., y Hataya, T. 2010. Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. *Plant Dis.* 94:1248 - 1254.
- Mumford, R.; Walsh, K.; Barker, I.; y Boonham, N. 2000. Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopath.* 90:448 - 453.
- Nicolaisen, M. 2011. An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *J. Virol. Meth.* 173:137 - 143.
- Osorio, I. 2012. Variabilidad genética de *Spongospora subterranea* y su virus asociado PMTV en Colombia. Tesis de Maestría en Geomorfología y Suelos. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Medellín, Colombia. 139 p.
- Osorio, I.; Gutiérrez, P. y Marín, M. 2012. Revisión: *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* y su virus asociado *Potato mop-top virus* (PMTV), dos patógenos re-emergentes en los cultivos de papa de Colombia. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.* 65: 6361-6378.
- Qu, X. S.; Wanner, L. A.; y Christ, B. J. 2011. Multiplex real-time PCR (TaqMan®) assay for the simultaneous detection and discrimination of potato powdery and common scab diseases and pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 110:769 - 777.
- Salazar, L. F. 2006. Emerging and re-emerging potato diseases in the Andes. *Potato Res.* 49:43 - 47.
- Sambrook y Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344 p.
- Sandgren, M.; Savenkov, E.; y Valkonen, J. P. 2001. The readthrough region of *Potato mop-top virus* (PMTV) coat protein encoding RNA, the second largest RNA of PMTV genome, undergoes structural changes in naturally infected and experimentally inoculated plants. *Arch. Virol.* 146:467 - 477.
- Santala, J.; Samuilova, O.; Hannukkala, A.; Latvala, S.; Kortemaa, H.; et al. 2010. Detection, distribution and control of *Potato mop-top virus*, a soilborne virus, in northern Europe. *Ann. Appl. Biol.* 157: 163-178.
- Savenkov, E.; Sandgren, M.; y Valkonen, J. 1999. Complete sequence of RNA 1 and the presence of tRNA-like structures in all RNAs of *Potato mop-top virus*, genus. *Pomovirus*. *J. Gen. Virol.* 80:2779 - 2784.
- Savenkov, E.; Germundsson, A.; Zamyatnin, A.; Sandgren, M.; y Valkonen, J. 2003. *Potato mop-top virus*: The coat protein encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 84:1001 - 1005.
- Shemyakina, E. A.; Sclovjev, A. G.; Leonova, O. G.; Popenko, V. I.; Schiemann, J. S.; y Morozov, Y. 2011. The role of microtubule association in plasmodesmal targeting of *Potato mop-top virus* movement protein TGBp1. *Open Virol. J.* 5:1 - 11.
- Schena, L.; Nigro, F.; Ippolito, A.; y Gallitelli, D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:893 - 908.
- Sokmen, A.; Barker, H.; y Torrance, L. 1998. Factors affecting the detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers and improvement of test procedures for more reliable assays. *Ann. Appl. Biol.* 133: 55 - 63.
- Tenorio, J.; Franco, Y.; Chuquillanqui, C.; Owens, R. A.; y Salazar, L. F. 2006. Reaction of potato varieties to *Potato mop-top virus* infection in the Andes. *Am. J. Potato Res.* 83:423 - 431.
- Vélez, P. 2007. Detección e identificación del *Potato mop-top virus* (PMTV) en áreas de producción de papa donde se encuentra *Spongospora subterranea* en dos departamentos de Colombia. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Bogotá, Colombia. 115 p.
- Xu, H.; Dehaan, T. L.; y De Boer, S. H. 2004. Detection and confirmation of *Potato mop-top virus* in potatoes produced in the United States and Canada. *Plant Dis.* 88:363 - 367.