

DETECCIÓN SEROLÓGICA DEL VIRUS MOP-TOP DE LA PAPA (PMTV) CON  
ANTICUERPOS POLICLONALES OBTENIDOS A PARTIR DE PÉPTIDOS  
SINTÉTICOS DEL GEN CP-RT

DERLY MADELEINY ANDRADE MOLINA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO

2012

DETECCIÓN SEROLÓGICA DEL VIRUS MOP-TOP DE LA PAPA (PMTV) CON  
ANTICUERPOS POLICLONALES OBTENIDOS A PARTIR DE PÉPTIDOS  
SINTÉTICOS DEL GEN CP-RT

DERLY MADELEINY ANDRADE MOLINA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga.

DIRECTOR

MAURICIO MARÍN MONTOYA  
I.A., PhD. Fitopatología

ASESORES

LUZ ESTELA LAGOS MORA.  
Biol. MSc. Ciencias Biológicas

PABLO ANDRÉS GUTIÉRREZ  
Biol., PhD. Bioquímica

YULIANA MARCELA GALLO  
I.Biol. MSc. Bioquímica

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2012

ESTA INVESTIGACIÓN FUE FINANCIADA POR EL PROYECTO DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL: Bases para la implementación de prácticas de exclusión de *Spongospora subterranea* y el virus asociado *Potato mop-top virus* (PMTV) en cultivos de papa mediante el desarrollo de herramientas de diagnóstico *in situ* y en laboratorio (contrato: 090-2007S4527-87-08).

CONVENIO UNIVERSIDAD DE NARIÑO Y UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1ro del acuerdo No 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

---

Luz Estela Lagos Mora

Asesor

Pablo Andrés Gutiérrez Sánchez

Asesor

Yuliana Marcela Gallo García

Asesor

Edith Mariela Burbano Rosero

Jurado

Carlos Arturo Betancourt García

Jurado

San Juan de Pasto, Junio de 2012

A la memoria de mi padre  
Porfirio Andrade y mi hermano  
Jonier Andrade.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MARCO TEÓRICO.....	29
4.1 Cultivo de papa .....	29
4.2 Problemas virales del cultivo de papa.....	32
4.3 Familia Virgaviridae.....	34
4.4 Generalidades del género <i>potomovirus</i> .....	36
4.5 Descripción de <i>Potato mop-top virus</i> (PMTV).....	37
4.6 Métodos de diagnóstico utilizados para PMTV.....	42
4.6.1 Técnicas basadas en características biológicas de los patógenos.....	43
4.6.2 Técnicas basadas en características intrínsecas de los agentes patogénicos.....	47
4.6.2.1 Métodos serológicos.....	47
4.6.2.2 Métodos moleculares.....	52
4.7 Control del virus PMTV.....	64
5. METODOLOGÍA.....	67

5.1	Secuenciación parcial del RNA2 de PMTV.....	67
5.2	Clonación del dominio RT del RNA 2 de PMTV.....	71
5.3	Expresión y purificación de proteína recombinante.....	74
5.4	Producción de péptidos y anticuerpos específicos para el dominio RT del RNA2 del PMTV.....	75
5.5	Métodos para la detección de PMTV.....	77
5.5.1	Detección de PMTV mediante ELISA indirecto .....	77
5.5.2	Detección de PMTV mediante IC-PCR y RT-PCR.....	78
5.6	Prueba piloto de detección de PMTV en campo.....	79
6.	RESULTADOS.....	81
6.1	Secuenciación parcial del RNA2 de PMTV .....	81
6.2	Clonación del dominio RT del RNA2 de PMTV.....	89
6.3	Producción de péptidos y anticuerpos específicos para el dominio RT del RNA 2 del PMTV.....	95
6.4	Detección de PMTV mediante ELISA indirecto.....	101
6.5	Detección de PMTV mediante IC-PCR y RT-PCR.....	105
6.6	Prueba piloto de detección de PMTV en campo.....	109
7.	DISCUSIÓN.....	116
8.	CONCLUSIONES.....	125
9.	AGRADECIMIENTOS.....	126
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	129
11.	ANEXOS.....	151

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación por RT-PCR de diferentes regiones del RNA2 de PMTV .....	70
Tabla 2. Matriz de identidad para nucleótidos (Arriba) y aminoácidos (Abajo) del RNA2 de PMTV secuenciado para la cepa R25 de Colombia y otros aislamientos del mundo. ....	86
Tabla 3. Matriz de identidad de un fragmento de la región 5' de CP-RT a partir de secuencias obtenidas con el cebador CPRT_SacI relacionados con aislamientos de diferentes orígenes geográficos .....	91
Tabla 4. Matriz de identidad de un fragmento de la región 5' de CPRT a partir de una secuencia obtenida con el cebador CPRT_PstI relacionada con aislamientos de diferentes orígenes geográficos .....	92
Tabla 5. Resultados del análisis BLAST para el segmento de CP-RT de PMTV clonado en pQE80L. ....	93
Tabla 6. Matriz de identidad de un fragmento de la región CP-RT clonado en el vector Pqe80I relacionados con aislamientos de diferentes orígenes geográficos	94
Tabla 7. Resultados de ELISA indirecto utilizando diluciones de Anti_CP_RT de PMTV para detectar Pep_CP_RT .....	98
Tabla 8. Límites de detección de la proteína CP-RT de PMTV, a partir del uso de los anticuerpos Anti_CP_RT en pruebas ELISA indirecto, utilizando diferentes concentraciones del Pep_CP_RT .....	99

Tabla 9. Detección de PMTV mediante pruebas de ELISA indirecto en raíces y tejido foliar de plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con quistorosos de Sss obtenidos en suelos de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño ..... 100

Tabla 10. Detección del virus PMTV en muestras de tejido foliar y de raíz de *S. tuberosum* y plantas de *N. benthamiana* sembradas en turba inoculada con *S. subterranea*, empleando metodologías serológicas y moleculares (ELISA, IC-PCR y RT-PCR). ..... 106

Tabla 11. Resultados de pruebas de ELISA indirecto para detectar el PMTV con Anti\_CP\_RT, a partir de muestras foliares y radiculares de plantas de papa obtenidas en diferentes lotes de cultivo del municipio de La Unión (Antioquia)... 110

Tabla 12. Resultados del análisis BLAST de secuencias parciales del gen CP obtenidos de aislamientos de la Unión, Antioquia..... 113

Tabla 13. Matriz de identidad de un fragmento de la región CP de aislamientos de la Unión, Antioquia y de diferentes orígenes geográficos ..... 114

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de producción primaria de papa en Colombia .....	30
Figura 2. Sintomatología típica de PMTV en papa.....	32
Figura 3. Organización del genoma de los seis géneros incluidos en la familia <i>Virgaviridae</i> .....	35
Figura 4. Genoma de PMTV .....	42
Figura 5. Contextualización de cebadores utilizados para la secuenciación parcial del RNA2 de PMTV mediante RT-PCR traslapados .....	71
Figura 6. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460 pb) a partir de tejido de raíz de plantas de <i>N. benthamiana</i> cultivadas en suelos infestados con <i>S. subterranea</i> .....	82
Figura 7. Amplicones obtenidos con los cebadores PMTV71F y C819 (~650 pb) a partir de tejido de raíz de plantas de <i>N. benthamiana</i> cultivadas en suelos infestados con <i>S. subterranea</i> . .....	82
Figura 8. Amplicones obtenidos con los cebadores PMTV759-PMTV1552R (~816 pb) a partir de tejido de raíz de <i>N. benthamiana</i> cultivada en suelos infestados con <i>S. subterranea</i> . .....	83

Figura 9. Amplicones obtenidos con los cebadores PMTV759-PMTV2017R (~1513 pb) a partir de tejido de raíz de <i>N. benthamiana</i> cultivada en suelos infestados con <i>S. subterranea</i> .....	83
Figura 10. Amplicones obtenidos con los cebadores H360-123 end (~2978 pb) a partir de tejido de raíz de <i>N. benthamiana</i> cultivada en suelos infestados con <i>S. subterranea</i> .....	84
Figura 11. Árbol filogenético basado en una secuencia de 2394 nt del RNA2 de PMTV, del aislamiento R25 de Colombia y de otras cepas de diferentes partes del mundo.....	85
Figura 12. Árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos del RNA2 de PMTV, del aislamiento R25 de Colombia y de otras cepas de diferentes partes del mundo.....	86
Figura 13. Sitios variables en las secuencias de aminoácidos del gen CP-RT del RNA2 de PMTV. ....	88
Figura 14. Esquema de los cebadores diseñados para el gen CP-RT de PMTV ..	89
Figura 15. Amplicones obtenidos con los cebadores CPRTF_SacI y CPRTR_PstI (1944 pb) a partir de tejido de raíz de plantas de <i>N. benthamiana</i> cultivadas en suelos infestados con <i>S. subterranea</i> .....	91
Figura 16. Análisis de la región C-terminal de la proteína CP-RT de PMTV y otros virus transmitidos por protozoos y hongos del suelo .....	96

Figura 17. Análisis de la región C-terminal de la proteína CP-RT de diferentes aislamientos de PMTV .....	97
Figura 18. Detección de CP-RT de PMTV a partir de diluciones de Anti_CP_RT en pruebas <i>dot-blot</i> .....	98
Figura 19. Límites de detección de CP-RT de PMTV, a partir del uso de los anticuerpos Anti_CP_RT en pruebas <i>dot-blot</i> , utilizando diferentes concentraciones del Pep_CP_RT .....	99
Figura 20. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460 pb) a partir de RT-PCR de PMTV. ....	105
Figura 21. Amplicones obtenidos con los cebadores PMTVF4 y PMTVR4 (~417 pb) a partir de RT-PCR de PMTV .....	105
Figura 22. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460 pb) a partir de IC-RT-PCR de PMTV.....	106
Figura 23. Expresión y purificación de la proteína recombinante del dominio RT de PMTV.....	108
Figura 24. Agallas observadas en algunas de las plantas de papa colectadas en lotes del municipio de La Unión (Antioquia), para el ensayo de prueba piloto de detección de PMTV con Anti_CP_RT .....	110
Figura 25. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460pb) a partir de tejido de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i> . ....	112

Figura 26. Árbol filogenético realizado a partir de secuencias parciales del gen CP de aislamientos de PMTV de Colombia (NOV 121, NOV123) y otros países del mundo.....	115
Figura 27. Amplicón obtenido del dominio RT de PMTV usando los cebadores CPRTFSacI y CPRTRPstI correspondiente a la región completa del dominio RT, a partir de la muestra R25 de la Unión- Antioquia .....	155
Figura 28. Gel de verificación de la primera digestión con SacI .....	155
Figura 29. Gel de verificación de la segunda digestión con PstI .....	156
Figura 30. Electroferograma de una región clonada correspondiente al dominio RT de PMTV.....	157
Figura 31. Resultados obtenidos a partir del BLAST del péptido CP_RT, excluyendo las secuencias de PMTV .....	168
Figura 32. Resultados obtenidos a partir del BLAST del péptido CP_RT, solo contra secuencias de plantas del orden Solanales .....	170
Figura 33. Detección mediante ELISA indirecto de CP-RT de PMTV en tejido foliar y raíces de plantas de <i>S. tuberosum</i> y <i>N. benthamiana</i> procedentes de muestras de los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Boyacá y Nariño .....	171

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de RNA total: RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)	151
Anexo 2. Proceso de clonación del dominio RT de la proteína CP-RT de PMTV.	153
Anexo 3. Transformación de células competentes DH5 $\alpha$ .....	158
Anexo 4. Preparación de células competentes .....	160
Anexo 5. Protocolo de purificación de plásmido usando QIAprep Spin Miniprep Kit	161
Anexo 6. Protocolo para la síntesis de péptidos y producción de anticuerpos policlonales. ....	162
Anexo 7. Protocolo de ELISA indirecto de PMTV usando anti_CP_RT .....	165
Anexo 8. Protocolo de DAS-ELISA de PMTV con anti_CP de la compañía BIOREBA.....	166
Anexo 9. Análisis Bioinformático del Péptido PMTV CP_RT. ....	168
Anexo 10. Placa de ELISA indirecto de PMTV en tejido foliar y raíces de plantas de <i>S. tuberosum</i> y <i>N. benthamiana</i> procedentes de muestras de los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Boyacá y Nariño.....	171

## RESUMEN

El *Potato mop-top virus* (PMTV) es uno de los virus re-emergentes en los cultivos de papa de Colombia, como resultado del aumento creciente en las regiones productoras de su vector natural, el protozoo *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (Sss), agente causal de la sarna polvosa de la papa. El diagnóstico del PMTV presenta múltiples dificultades debido a su distribución irregular en las plantas, bajo título en los tejidos, movimiento sistémico de RNA virales infectivos y a la gran variedad de síntomas que induce en las diferentes variedades de papa. Por lo anterior, para la detección del virus se recomienda la realización simultánea de diferentes pruebas, así como la evaluación de múltiples submuestras por cada planta o tejido bajo análisis. Con el fin de ampliar el rango de herramientas de diagnóstico disponibles para la detección de PMTV, en este estudio se planteó el desarrollo de anticuerpos dirigidos al dominio RT de la proteína CP-RT codificada por el RNA2 del genoma viral. Para esto se secuenció parcialmente dicho segmento en un aislamiento colombiano de PMTV y se realizaron análisis bioinformáticos para ubicar en el dominio RT, regiones peptídicas con alto potencial inmunogénico. El péptido seleccionado fue inoculado en conejos para la obtención de anticuerpos policlonales, cuya utilidad fue evaluada a partir de pruebas de ELISA indirecto en muestras de plantas señuelo de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con quistosoros de Sss y en plantas de papa directamente obtenidas de cultivos del municipio de La Unión (Antioquia). Estas pruebas estuvieron acompañadas con evaluaciones de RT-PCR dirigidas a

confirmar la validez de la detección serológica. Los resultados indicaron que el segmento secuenciado del RNA2 contenía la totalidad del dominio RT, así como 441 nt del gen CP; los análisis filogenéticos y de identidad genética correspondientes, permitieron identificar a la cepa R25 como asociada al linaje de PMTV mundialmente distribuido. La inoculación del péptido sintetizado, permitió generar 19,26 mg de anticuerpos, los que resultaron efectivos para determinar la presencia de viriones de PMTV provistos de proteínas CP-RT, tanto en las muestras foliares y raíces de plantas señuelo como en aquellas de papa obtenidas directamente en el campo. La mínima concentración de antígeno detectable en ELISA indirecto fue del orden de  $5 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ , mientras que el título viral de los anticuerpos fue de 1:256.000. Por el método de *dot-blot*, el mínimo de detección de los anticuerpos anti\_CP\_RT fue de 1:8500 y la concentración mínima de péptido detectable de 5  $\mu\text{M}$ . Considerando estos resultados, los anticuerpos generados en este estudio son altamente eficientes y sensibles para su utilización en diferentes métodos serológicos. Ya que se ha planteado que la proteína CP-RT es responsable de la transmisión del PMTV por Sss, la utilización de los anticuerpos reportados permitirán no sólo apoyar los programas de diagnóstico viral, sino también los estudios básicos y epidemiológicos tendientes a evaluar las interacciones del PMTV y su vector natural Sss.

Palabras claves: ELISA, RT-PCR, *Solanum tuberosum*, virus de RNA

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa es una de las principales actividades agrícolas en Colombia. Sin embargo, su productividad es drásticamente afectada por diversas plagas y enfermedades, entre las que se destacan las de origen viral, al reducir el rendimiento y la calidad de los tubérculos (Estrada, 2000; Arciniegas, 2003).

Uno de los principales virus que afecta el cultivo de la papa es el *Potato mop-top virus* (PMTV) del género *Pomovirus* (Torrance *et al.*, 1997), causando un amplio rango de síntomas en folíolos y tubérculos, que varían dependiendo del cultivar de papa y de las condiciones ambientales, situación que dificulta su detección. Este virus es transmitido por el protozoo *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (Sss), agente causal de la sarna polvosa de la papa, y puede ser propagado entre cultivos mediante el tubérculo semilla o alternativamente permanecer en estado latente en el suelo en los quistosoros de su vector (Savenkov *et al.*, 1999).

El diagnóstico del PMTV presenta muchas dificultades dada la distribución no uniforme de este virus en tubérculos y tallos aéreos y a las bajas concentraciones que alcanza en los tejidos foliares. Adicionalmente, la variación en la expresión de los síntomas de mop-top causa gran dificultad en la identificación de la enfermedad por parte de los agricultores y técnicos. Hasta el momento no se dispone de un control químico eficaz y ambientalmente aceptable del vector, y no existen fuentes de resistencia o tolerancia a PMTV utilizadas en programas de mejoramiento genético (Čeřovská, N *et al.*, 2003). Por lo anterior, el manejo del

virus se basa principalmente en la regulación de la dispersión del vector y en el uso de métodos preventivos, como la producción de semilla sana y certificada (Mumford *et al.*, 2000).

Para la detección del PMTV se han utilizado varias técnicas como *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Nielsen *et al.*, 1997; Torrance *et al.*, 1993), *Immunocapture Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (IC-RT-PCR) (Sandgren *et al.*, 2001), *Reverse- Transcription polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Arif *et al.*, 1994; Rantanen *et al.*, 1999), y *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCRq) (Mumford *et al.*, 2000); esta última técnica es la prueba más sensible, pero de difícil uso rutinario en nuestro medio, pues requiere de equipos costosos, personal entrenado y de procesos complejos de extracción de ácidos nucleicos, que eviten inhibidores en las reacciones. En contraste, las pruebas serológicas son herramientas de diagnóstico de virus vegetales más accesibles, de menor costo y que ofrecen niveles aceptables de sensibilidad (Arif *et al.*, 1994). En los últimos años, se han empleado anticuerpos policlonales y monoclonales para la detección de PMTV (Torrance *et al.*, 1993; Kurppa, 1990; Nielsen *et al.*, 1997), generados a partir del virus purificado; aunque los resultados obtenidos con su utilización son muy variables, especialmente en los cultivos de papa de los Andes suramericanos, donde se presentan variantes del virus diferentes a las europeas y norteamericanas (Gil *et al.*, 2011). Adicionalmente, la purificación de partículas completas de PMTV es difícil, dada su naturaleza multipartita, su bajo título viral en las plantas y su tendencia a agregarse con los procedimientos convencionales de purificación viral (Kurppa, 1990; Torrance *et al.*, 1993). Es por

esto, que existe una clara necesidad de mejorar y estandarizar la preparación de antígenos para la producción de anticuerpos específicos para PMTV.

Análisis de secuencias nucleotídicas han mostrado que la región del genoma de la cápside viral de cepas de PMTV procedentes de diferentes países de la región templada son altamente conservadas, hecho que ha dado lugar al diseño de anticuerpos y de cebadores, que ofrecen niveles aceptables de detección (Mayo *et al.*, 1996; Sandgren *et al.*, 2001; Čeřovská *et al.*, 2003). Sin embargo, la presencia de variantes del PMTV en Colombia que pueden presentar valores de identidad tan bajas como 75% con respecto a las cepas europeas, hacen necesario considerar dicho nivel de variación en el diseño de herramientas de diagnóstico del PMTV en la región Andina (Gil, 2010).

El uso de proteínas recombinantes y de péptidos sintéticos generados a partir de estudios de modelamiento estructural, son una estrategia atractiva para la producción de anticuerpos contra los virus que están presentes en bajas concentraciones o que son difíciles de purificar (Vaira *et al.*, 1996). La proteína viral *Coat Protein Read-through* (CP-RT) podría ser un buen candidato para producir una reacción inmune y por tanto utilizarse en la generación de anticuerpos (Matthews, 1991; Gil, 2010). Esta proteína esta presuntamente involucrada en la transmisión del virus por Sss y se ha reportado que se localiza en forma externa cerca de uno de los extremos de la partícula del virus (Cowan *et al.*, 1997); ambas situaciones resultan deseables para su uso como blanco de

detección. Hasta el momento no se ha desarrollado una metodología serológica de detección de esta proteína en PMTV a partir de anticuerpos policlonales.

Teniendo en cuenta que el manejo de las enfermedades virales está fundamentado en la implementación de métodos de diagnóstico efectivos en material de siembra, plantas asintomáticas y en organismos vectores, es determinante investigar la posibilidad de producir anticuerpos específicos para la detección de cepas andinas del virus PMTV. Esta propuesta plantea el desarrollo de pruebas serológicas basadas en la identificación de un péptido con potencial inmunogénico usado en la detección de PMTV y dirigido al gen CP-RT, como una estrategia para el apoyo a los programas de certificación de semilla y del manejo integrado de enfermedades virales en los cultivos de papa de Colombia.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de la papa en Colombia ocupa el cuarto lugar en la producción agropecuaria nacional y cuenta con un área sembrada de 163000 ha (MADR, 2006), distribuidas principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Nariño, Cauca y Caldas. En la actualidad, Colombia sólo participa con el 0.3% del volumen de papa exportado mundialmente a pesar de tener un potencial exportador a gran escala de papa en fresco y procesada. Uno de los factores limitantes para la producción y comercialización de papa en los diferentes países productores de papa, se debe a la presencia plagas y enfermedades, entre ellas se destaca el *Potato mop-top virus* (PMTV) (Nakayama *et al.*, 2010). En condiciones naturales, este virus es transmitido por el protozoo, *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (Sss) (Jones *et al.*, 1969), el agente causal de la sarna polvosa (Harrison *et al.*, 1997, Merz, 2008).

El manejo de las enfermedades ocasionadas por virus está estrechamente relacionado con la disponibilidad de herramientas de diagnóstico que permitan su detección incluso en material de siembra y en plantas asintomáticas. La importancia mundial de la agroindustria de semilla tubérculo de papa, ha llevado al desarrollo en varios países de métodos para detección de PMTV y otros virus, con base en pruebas biológicas, serológicas y moleculares.

En Colombia, a pesar de varios esfuerzos individuales realizados para investigar la biología, desarrollo de la enfermedad, mecanismos de infección y posibles estrategias de control de Sss y de su virus asociado PMTV, es necesario desarrollar estudios desde enfoques multidisciplinarios que conduzcan a la entrega de soluciones reales y aplicables por parte de los agricultores de papa del país. Así por ejemplo, el reciente desarrollo de un método serológico basado en un dispositivo de flujo lateral que utiliza anticuerpos contra la cápside de PMTV y desarrollado en la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, ha permitido un diagnóstico rápido y sensible de este virus, sin la necesidad del uso de infraestructura de alto costo (Gallo, 2012). Sin embargo, los resultados recientes de Gil (2010) sobre las diferencias encontradas con el uso de pruebas individuales (ELISA, RT-PCR, RT-PCRq) para la detección de PMTV en el país, conducen a la necesidad de implementar otras metodologías que en conjunto amplíen el rango de detección alcanzado con pruebas basadas sólo en la cápside viral. Desde esta perspectiva, esta propuesta plantea el desarrollo de una metodología serológica, que permita la detección de PMTV con base en el empleo de anticuerpos policlonales generados contra el gen de CP-RT.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

Las pruebas de detección serológica diseñadas a partir de la generación de anticuerpos contra péptidos sintéticos obtenidos del gen CP-RT de PMTV permiten una detección confiable del virus en extractos de *Nicotiana benthamiana* y *Solanum tuberosum*?

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Generar pruebas de detección serológicas del *Potato mop-top virus* mediante la producción de anticuerpos obtenidos a partir de péptidos sintéticos, diseñados por análisis bioinformáticos de la proteína viral CP-RT.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar y caracterizar las secuencias de la región CP-RT de PMTV para diseñar el mejor péptido antigénico para la producción de anticuerpos policlonales.
- Clonar y expresar la secuencia codificante de la proteína CP-RT para su utilización como control positivo en las pruebas de detección serológica de PMTV.
- Determinar la utilidad de los anticuerpos generados en pruebas ELISA, realizándose comparaciones con las pruebas serológicas comerciales y de RT-PCR para PMTV.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Cultivo de papa.

En Colombia, el cultivo de papa ocupa el primer lugar en cuanto a producción y el tercer lugar en área sembrada aproximándose a 163.000 ha de siembra distribuidas en 14 departamentos, de los cuales Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño (Figura 1) son responsables del 80% de la producción, que asciende a cerca de 2.8 millones de Tn/año y de la cual dependen más de 90.000 familias del sector rural de Colombia (Alonso *et al.*, 2002, MADR, 2006). La papa es uno de los cuatro alimentos básicos del mundo; en Colombia, el consumo *per capita* aparente anual de papa es de unos 60 kilos, lo cual ratifica la importancia del tubérculo en la canasta familiar de alimentos, especialmente de los habitantes de menores ingresos económicos. El cultivo de papa es la principal actividad agrícola de clima frío, distribuida en unos 250 municipios, con predominio de agricultores minifundistas, quienes en general, tienen un limitado acceso a los factores de producción, servicios públicos, educación, salud, asistencia técnica agrícola, obras de infraestructura y recreación (MADR, 2004).

Cabe destacar que el cultivo de papa es una fuente directa de empleo rural en zonas andinas que no sólo impacta a los productores, sino también a una red de producción y distribución de insumos, empaques, transporte terrestre, maquinaria, producción de semilla, procesamiento y comercialización, representados por la cadena productiva de la papa.

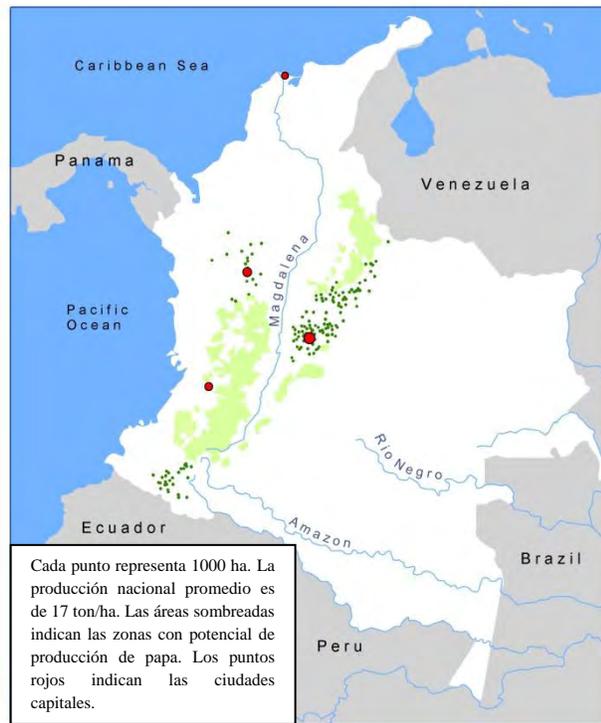


Figura 1. Áreas de producción primaria de papa en Colombia.

Fuente: Kelly Theisen.

<https://research.cip.cgiar.org/confluence/pages/viewpage.action?pageId=13605>

Actualizado en febrero de 2009.

La cadena agropecuaria de producción de papa enfrenta grandes desafíos en cuanto a disminución de competitividad con otros países productores, incluyendo los países vecinos. Los limitantes están relacionados con la carencia de tecnología en los sistemas de producción y de post-cosecha, la alta dependencia de insumos

agrícolas y el bajo nivel de acople entre el sector primario y el de procesamiento (MADR, 2006).

Desde el punto vista fitosanitario, el cultivo de la papa se ve afectado por diversos agentes patógenos como hongos, bacterias, virus, nematodos; además de gran cantidad de insectos plaga. Los virus se encuentran entre los patógenos más limitantes, pues causan grandes pérdidas en rendimiento y en la degeneración del tubérculo semilla (Estrada, 2000). Adicionalmente, en los últimos años una enfermedad que ha causado un gran impacto económico sobre el cultivo ha sido la denominada Sarna polvosa de la papa causada por Sss. Su efecto no solo se debe a la reducción en la producción, sino también al deterioro en la calidad y apariencia cosmética de los tubérculos. Sss es el vector natural del PMTV, el cual causa un deterioro en el tubérculo y la reducción en el vigor de las plantas infectadas (Figura 2). El control de la sarna polvosa de la papa es difícil de lograr debido a la carencia de variedades comerciales resistentes y de tratamientos químicos o biológicos efectivos. El manejo de la enfermedad debe estar enmarcado bajo un esquema integrado del cultivo (MIC), en el que se incluyan aspectos como la rotación, el manejo adecuado del riego y drenaje, la sanidad del tubérculo semilla, la utilización de organismos antagonistas (ej. *Trichoderma* spp.), utilización de cultivos trampa, desinfestación de herramientas de trabajo y, finalmente, una legislación que restrinja el movimiento de material contaminado y genere procesos de certificación de semilla. Desafortunadamente, en el país pocas de estas prácticas son utilizadas por los agricultores y por el contrario hay un desconocimiento generalizado del manejo de la enfermedad, llegándose

incluso a confundir con problemas bacteriales o de Rhizoctoniasis (Martin *et al.*, 1989; Tenorio *et al.*, 2006).

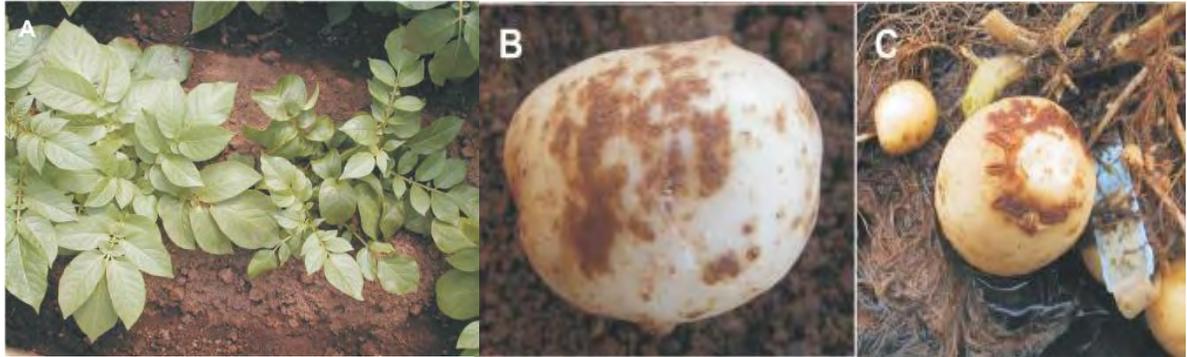


Figura 2. Sintomatología típica de PMTV en papa (A) enanismo y apariencia clorótica de infecciones secundarias. (B) cuarteamiento asociado a infección primaria. (C) cuarteamiento de tubérculo en crecimiento hipotónico. Tomado de Tenorio *et al.* (2006).

#### 4.2 Problemas virales del cultivo de papa

Los principales efectos de las enfermedades virales en la papa se ven reflejados principalmente en la reducción del rendimiento y la producción de semilla asexual adecuada para su propio cultivo (Salazar, 1997). Esta enfermedad disminuye el área fotosintética, la movilización de nutrientes y por tanto la acumulación de carbohidratos para la formación adecuada de los tubérculos, causando su degeneración (Sampol *et al.*, 2003). Además, la infección viral y la disminución en el contenido de almidón tienen un impacto negativo tanto sobre el valor nutricional y su utilidad en el procesamiento industrial. Es evidente que el desarrollo de

técnicas modernas de control virológico es una necesidad práctica para la producción de semilla élite (Vreugdenhil *et al.*, 2007).

Las enfermedades virales afectan en gran proporción al cultivo de papa en el mundo, siendo reportados al menos 25 virus y viroides (Salazar, 2006). El virus PLRV (*Potato leafroll virus, Polerovirus*) distribuido en todas las regiones donde se cultiva la papa en el mundo, es uno de los más importantes, al causar pérdidas que pueden alcanzar hasta el 90% de la producción. Por otra parte, los virus PVY y PVA (*Potyvirus*) provocan pérdidas en el rendimiento de hasta 80% y el PVX (*Potato virus X, Potexvirus*) puede disminuir el rendimiento en más del 10% según la variante del virus y el cultivar de papa. PVS (*Potato virus S, Carlavirus*) es común y puede causar síntomas suaves, presentando aparentemente poco efecto sobre el rendimiento. Además de los virus mundialmente reportados en el cultivo, PYVV (*Potato yellow vein virus, Crinivirus*), PVM (*Potato virus M, Carlavirus*), APMV (*Andean potato mottle virus, Comovirus*) y APLV (*Andean potato latent virus, Tymovirus*) son frecuentes en la región andina. Recientemente en Colombia, Vélez (2007) reportó la ocurrencia del PMTV en cultivos de Cundinamarca y Boyacá, rango que se extendió en el estudio de Gil (2010) a Antioquia y Nariño. Este virus puede producir pérdidas de hasta un 26% (Ryazantsev *et al.*, 2009), tiene una amplia distribución a nivel mundial y su efecto es aditivo con los daños que causa su vector Sss.

A continuación se describen con mayor detalle las características de la familia y género a la que pertenece el PMTV.

### 4.3 Familia *Virgaviridae*

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha aprobado recientemente una propuesta para crear la familia de virus patógenos de plantas: *Virgaviridae*. La familia se llama así porque sus partículas tienen forma de barra (del latín *virga* = vara), e incluye los géneros *Furovirus* (5 especies), *Hordeivirus* (4 especies), *Pecluvirus* (2 especies), *Pomovirus* (4 especies), *Tobamovirus* (25 especies) y *Tobravirus* (3 especies), para un total de 43 especies descritas (Adams *et al.*, 2009). Las principales características de los miembros de la familia son entre otras: proteínas de replicación Alfa que forman una familia filogenética distinta (Koonin *et al.*, 1993), su genoma de RNA en sentido positivo posee un motivo de RNA de transferencia asociado a su extremo 3' terminal, y no una cola poli-A; viriones en forma de bastón con 20-25 nm de diámetro y con un canal central, y finalmente, las proteínas de cápside poseen tamaños que oscilan entre 19 a 24 kDa (Adams *et al.*, 2009; ICTV, 2012).

Estos virus contienen al menos una proteína de movimiento (MP) "30K" como en los furovirus, tobamovirus y tobravirus; aunque algunos pueden codificar para tres proteínas de movimiento sistémico ubicadas en la región conocida como TGB (bloque triple de genes), como es el caso de hordeivirus, pecluvirus y pomovirus. Existen diferencias en el número de RNAs genómicos (1, 2 o 3 dependiendo del género) (Figura 3). Los hordeivirus y pomovirus poseen tres RNA genómicos. El primer grupo tiene su motivo de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) en un RNA diferente al de los motivos Helicasa y Metil-transferasa, los cuales están juntos en los demás géneros de la familia. *Tobamovirus* es el único género cuyos

integrantes poseen un solo RNA como genoma y no es transmitido por patógenos de suelo; el resto de miembros de la familia poseen dos RNA genómicos (Adams *et al.*, 2009)

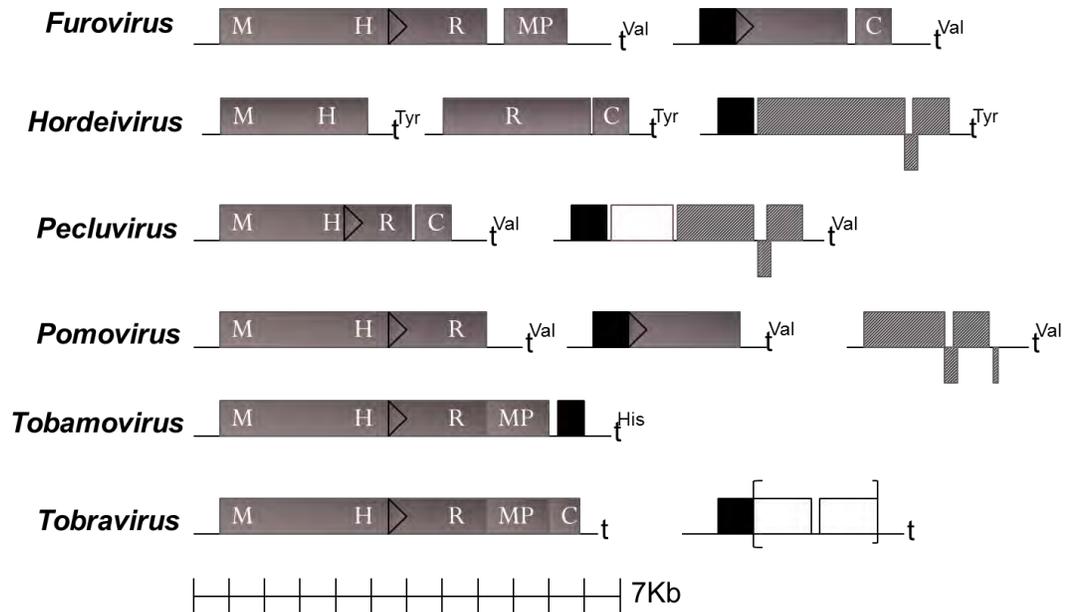


Figura 3. Organización del genoma de los seis géneros incluidos en la familia *Virgaviridae*. . (M) Motivo Metil-transferasa, (H) Motivo Helicasa, (R) Motivo RdRp, el Bloque triple de genes (TGB) está representado por los cuadros en tramas, (MP) Proteínas de movimiento de la superfamilia "30K", (C) Proteína rica en cisteína o "CRP". Los triángulos representan sitios de supresión del codón de finalización. (t) representa motivos de RNA de transferencia con los aminoácidos que acepta. Los corchetes representan ORF que no están presentes en algunas razas. Tomado de Adams *et al.*, (2009). Modificado en este estudio.

#### 4.4 Generalidades del género *Pomovirus*

El género *Pomovirus* se caracteriza por presentar virus con genomas de RNA de cadena sencilla y multipartita, con un dominio RT expresado como fusión con la proteína de cápside y transmisión por vectores plasmodiofóridos del suelo (Campbell, 1996; Torrance *et al.*, 1997). Adicionalmente, los virus de este género poseen viriones con simetría helicoidal cuyas longitudes varían de 60 a 310 nm, dependiendo del virus (Büchen-Osmond, 2010).

Los pomovirus se transmiten a partir de suelo infestado con plasmodiofóridos, los cuales necesitan células hospederas vivas que poseen un citoplasma funcional; aunque también pueden ser transmitidos de forma mecánica (Koenig *et al.*, 2005).

Dos tipos diferentes de relación entre virus y vectores han sido descritos en este grupo, que se distinguen por las diferentes vías de adquisición del vector y por la ubicación del virus dentro de la espora en latencia. En el caso de pomovirus y sus vectores, la relación es de tipo persistente debido a que el virus puede sobrevivir muchos años dentro de las esporas de resistencia del vector, porque la espora no adquiere el virus en ensayos *in vitro* y porque la transmisibilidad del virus por zoosporas no se reduce ni se elimina por secado al aire de las esporas de resistencia (Adams, 1991; Campbell, 1996).

Los mecanismos involucrados en la adquisición y transmisión del virus *in vivo* aún no son plenamente entendidos (Adams, 1991; Campbell, 1996). Se conoce que la adquisición ocurre a medida que el protozoo se desarrolla dentro de la célula del hospedero infectado por el virus, aún dentro de la primera generación vegetativa

del vector (Campbell, 1996; Savenkov *et al.*, 1999). Los talos entonces producen zoosporas virulíferas, las cuales requieren humedad (períodos sostenidos de lluvia, irrigación del cultivo) para su liberación y movimiento (Brunt *et al.*, 1989). Igualmente, el estudio del genoma del virus y del vector indica que la relación entre ambos es altamente específica y no una adquisición pasiva de nucleoproteínas desde la célula del hospedero (Adams, 1991; Campbell, 1996). Esta especificidad no es exclusivamente dependiente de la proteína de cápside del virus, ya que se cree que una o más proteínas como la CP-RT, pueden estar involucradas (Adams, 1991, Cowan *et al.*, 1997).

Las secuencias de los virus de este género comparten menos del 80% de identidad cuando se comparan sus genomas completos y menos del 90% cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de la proteína de la cápside. También difieren en su rango de hospederos, especies de vectores, morfología de los cuerpos de inclusión en tejidos, relaciones serológicas y componentes del genoma, particularmente presencia o ausencia del gen CP-RT (Büchen-Osmond, 2010).

#### 4.5 *Potato mop-top virus* (PMTV)

El PMTV infecta a los cultivos de papa en muchos países, causando arcos marrones en el interior de los tubérculos (síntoma conocido como “*spraing*”), retraso esporádico en el crecimiento de brotes y manchas de color amarillo de las hojas, dependiendo de la variedad de papa.

El virus fue identificado por primera vez por Calvert y Harrison (1966) y hasta el momento ha sido detectado en las regiones productoras de papa del norte y centro Europa, la región andina de América del Sur y en América del Norte, China y Japón (Harrison *et al.*, 1970; Jones, 1988; Takato *et al.*, 2010). El virus es transmitido por el protozoo Sss, el cual a diferencia de otros vectores, es un importante patógeno, ya que causa la sarna polvosa de la papa, pudiendo persistir por muchos años en los quistosoros presentes en el suelo (Deacon, 2010). Estudios realizados en plantas indicadoras sugieren que este virus se mueve de célula a célula por medio de plasmodesmos y a largas distancias a través del xilema (Verchot-Lubiez, 2003).

PMTV es transmitido de forma persistente y muy específica por Sss, el cual puede sobrevivir en las esporas de su vector por varios años. La fase replicativa del virus es citoplasmática; una vez que el virus penetra en el interior de la célula huésped, libera su genoma de RNA en el interior del citoplasma, donde es traducido para producir dos proteínas necesarias para la síntesis de RNA tanto para la replicación como para la transcripción. Una hebra complementaria de sentido negativo de RNA es sintetizada utilizando el RNA genómico como molde. El genoma anti-sentido es utilizado nuevamente como molde para la síntesis de RNA genómico y los RNAs subgenómicos. Cada segmento es encapsidado y los nuevos viriones son liberados de la célula huésped (Hull, 2009).

El PMTV se caracteriza por tener un genoma tripartita de RNA de cadena sencilla positiva, con cada uno de sus componentes encapsidados separadamente (Figura 4) (Savenkov *et al.*, 1999). Los tres segmentos son: el RNA1 con un tamaño 6043 nt, el RNA2 con 3134 nt y el RNA3 con 2964 nt (Savenkov *et al.*, 1999; Sandgren *et al.*, 2001; Savenkov, 2003). En el extremo 3'-terminal posee una estructura similar a un RNAt, idéntica en los tres segmentos genómicos del virus (Savenkov *et al.*, 1999).

El RNA1, posee dos ORFs; el ORF 1 de 3909 nt, inicia en el primer codón AUG en la posición 115 y termina con un codón de finalización UGA en la posición 4024. El polipéptido codificado por este ORF contiene 1303 residuos de aminoácidos (masa molecular calculada en 148 KDa) (Savenkov *et al.*, 1999). El ORF 2 se extiende inmediatamente después del codón de terminación del ORF 1. El ORF 2 finaliza en un UGA en la posición 5551 y codifica para un polipéptido de 509 aminoácidos (masa molecular de 58 KDa), produciendo una proteína *readthrough* (RT) del ORF 1 y el ORF 2 con una masa molecular de 206 KDa. Esta proteína se asemeja mucho a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) de otros virus transmitidos por hongos y protozoos del suelo (Sandgren *et al.*, 2001). Dentro del genoma del RNA1 se pueden observar dominios de metil-transferasa, helicasa y polimerasa (Savenkov *et al.*, 1999). El RNA1 es presumiblemente el responsable de la replicación del virus (Germundsson *et al.*, 2002).

Los ORF 1 y ORF 2 representan el 89,9 % de la secuencia de RNA1. Se estima que este segmento constituye aproximadamente la mitad del genoma de PMTV (Savenkov *et al.*, 1999; Sandgren *et al.*, 2001).

El RNA2 tiene un solo ORF que codifica para la proteína de cápside (CP) de 20 kDa, formada por 528 nt (176 aminoácidos), comenzando en la posición 314 (Sandgren *et al.*, 2001). La CP es seguida por una región RT adicional (comúnmente presente en los virus transmitidos por hongos y protozoos del suelo), comenzando en posición 843 hasta posición 2788-2790, generando una proteína CP-RT de 67-91 kDa, dependiendo del aislamiento viral (Sandgren *et al.*, 2001). Este dominio RT es entonces expresado como una fusión con la proteína de cápside, y la proteína CP-RT resultante se localiza cerca del extremo N-terminal de las partículas de PMTV (Torrance *et al.*, 1999; Sandgren *et al.*, 2001). La CP contiene siete epítopes, siendo la región N-terminal inmunodominante (Pereira *et al.*, 1994).

De acuerdo con Torrance *et al.* (1999); el RNA que codifica para CP-RT se ha clasificado como el más pequeño, es decir como el RNA3. Sin embargo, otros investigadores han comprobado que el aislamiento utilizado por Torrance (aislamiento T) ha perdido secuencias en el dominio RT, al ser transmitido mecánicamente por largos periodos. Por tanto en este aislamiento, el RNA que codifica CP-RT, sí es el más pequeño (2315 nt), pero no en otros aislamientos. Las pérdidas de la secuencia de RT del aislamiento T sugieren que este dominio es determinante en la adquisición y transmisión de PMTV por su vector (Germundsson *et al.*, 2002), lo cual se ha comprobado por ensayos de inmunomicroscopía electrónica (Cowan *et al.*, 1997). Adicionalmente, se ha encontrado que CP-RT también participa en el proceso de ensamblaje del virión (Kashiwazaki *et al.*, 1995; Lukhovitskaya *et al.*, 2005).

El RNA3 codifica para cuatro ORFs. Las primeras tres proteínas (51, 13 y 21 kDa) forman el bloque triple de genes (TGB), presumiblemente involucrado en el movimiento del virus en los hospedantes y encontrado en varios géneros de virus de plantas (Savenkov *et al.*, 1999; Haupt *et al.*, 2005). La proteína 51K (TGBp1) es codificada por el ORF 1 extendiéndose desde 369-1760 nt; la proteína 13K (TGBp2) es codificada por el ORF 2 desde 1747-2016 nt y 21K (TGBp3) por el ORF 3, extendiéndose desde 1961 a 2533 nt (Pereira *et al.*, 1994). La cuarta proteína de RNA3 (8K), codificada por ORF 4 se extiende desde 2461 a 2667 nt y contiene una proporción inusual de residuos de cisteína (CRP); La cuarta proteína (8 kDa) es rica en cisteína (CRP) y aparentemente esta involucrada en el movimiento sistémico del PMTV en las plantas y en la expresión de síntomas necróticos en hospedantes experimentales. Interesantemente, otros pomovirus no codifican para una proteína 8 kDa como la presente en PMTV y sus niveles de identidad con CRPs presentes en otros géneros como Hordeivirus, Tobravirus y Furovirus son muy bajos (Lukhovitskaya *et al.* 2005).



Teniendo en cuenta lo anterior, la detección de PMTV debe basarse en el uso de métodos específicos, reproducibles y sensibles. *Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (DAS-ELISA), *immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction* (IC-RT-PCR) usando la proteína de la cápside (CP) con anticuerpos policlonales o monoclonales y cebadores específicos (Latvala-Kilby *et al.*, 2009), RT-PCR o real time RT-PCR usando cebadores y sondas específicas; *qualitative amplification-based specific hybridisation* (FLASH-PCR) (Ryazantsev y Zavriev, 2009) y *RT-PCR-microplate hybridization* (Nakayama *et al.*, 2010) han sido aplicados para la detección de PMTV. A continuación se describen brevemente los principales métodos empleados para el diagnóstico de virus en plantas.

#### 4.6.1 Técnicas basadas en características biológicas de los patógenos virales.

Detección mediante sintomatología. La sintomatología es la fuente primaria en la descripción de las enfermedades virales. El nombre de la especie de virus es principalmente tomado sobre la base del síntoma que causa en la planta en la cual fue identificado por primera vez (Astier *et al.*, 2007). Sin embargo, la sintomatología se constituye en el método más insensible de diagnóstico, por cuanto solo la experiencia puede indicar cuándo es conveniente usarla (Salazar, 1995).

Cuando los virus infectan las plantas, pueden o no inducir síntomas. Si los síntomas son producidos en las plantas, éstos pueden tener un valor en el diagnóstico (Salazar, 1995). Los síntomas principales asociados a enfermedades virales incluyen cambios en la pigmentación normal de las plantas (mosaicos, amarillamientos, grabados), cambios en el crecimiento (enanismos), necrosis de tejidos (para algunos virus muy agresivos), deformaciones y reducción en el rendimiento. Las observaciones de la planta en su conjunto y el contexto en que ocurren dicho cambios y su análisis, constituyen los primeros pasos para el diagnóstico de virus (Astier *et al.*, 2007).

PMTV se mueve sistémicamente en la planta desde las raíces y estolones infectados hasta las hojas, causando síntomas foliares en los cultivos. Los síntomas característicos en la parte aérea de las plantas de papa son las manchas cloróticas o con un patrón en forma de V en las hojas y enanismo de la planta ('mop top') (Tenorio *et al.*, 2006); sin embargo, los síntomas foliares se observan rara vez en variedades de papa cultivadas en los Andes y según lo reportado en Colombia por Gil (2010), al realizar evaluaciones visuales de los síntomas presentes en los cultivos de papa de Colombia para determinar la presencia o no de afecciones virales, se evidenció que no siempre se presentan síntomas individuales, sino que éstos generalmente corresponden a síndromes complejos causados por la interacción de diferentes virus. Además, algunos de los síntomas fácilmente se pueden confundir con desórdenes fisiológicos ocasionados por exceso en las aplicaciones de biocidas (fitotoxicidad), cambios drásticos en las

condiciones ambientales y de nutrición de los cultivos, así como corresponder a quimeras genéticas.

El síntoma más comúnmente asociado con la afección por PMTV es el denominado “*Spraing*”, que presenta un gran impacto económico en el cultivo de papa en la región templada (Europa y Norte América), pero rara vez se ha detectado en Suramérica. Esta sintomatología puede ser también causada por el *Tobacco rattle virus* (TRV; género *Tobravirus*), lo que dificulta su asociación directa con un agente causal en particular. El *Spraing* es principalmente expresado en los tubérculos, donde aparecen arcos necróticos cafés en el interior, líneas o estrías. Los síntomas también se pueden expresar externamente, resultando en anillos sobre la superficie del tubérculo. Como resultado de estos síntomas, la calidad de los tubérculos afectados se reduce. Además, se ha demostrado que un alto porcentaje de los tubérculos infectados por PMTV es asintomático o depende de la variedad cultivada y que en ocasiones varios trastornos fisiológicos pueden causar necrosis interna en los tubérculos (Latvala-Kilby *et al.*, 2009., Santala, *et al.*, 2010).

PMTV puede ser detectado en suelo utilizando plantas trampa. Merz (1995) sugiere que PMTV se encuentra en el interior de las zoosporas de Sss y no en la superficie, como en el caso de *Melon necrotic spot virus* (MNSV) vs. *Ospidium borno-vanus* (Mochizuki *et al.*, 2008). Las zoosporas de Sss tienen una triple

capa que las cubre en su totalidad y en estado de latencia se encuentran en una estructura esponjosa llamada quistosoro (Falloon *et al.*, 2005). Estas estructuras pueden permanecer latentes por más de diez años en el suelo, e incluso pueden sobrevivir a un tratamiento térmico de 90°C por 15 minutos (Nielsen y Molgaard, 1997) y al paso por el tubo digestivo de cerdos (Nakayama, *et al.*, 2010). Las características de PMTV y las de su vector hacen que la detección directa del virus en suelo sea difícil por métodos tales como ELISA y PCR, además, debido a que el vector es un patógeno de plantas obligado, debe ser atrapado usando una especie de planta huésped denominada señuelo o planta trampa, la que a su vez sirve de reservorio para detectar al PMTV (Kurppa, 1989).

Arif *et al.*, (1994) demostraron que al utilizar plantas trampa para detectar PMTV en las raíces, luego de tres semanas es posible detectar el virus por RT-PCR, en contraste con las cinco semanas requeridas para su detección mediante ELISA. Los resultados obtenidos por Nakayama *et al.* (2010) en los ensayos con plantas trampa de tomate mediante RT-PCR-MSP para detectar el virus en las raíces, sugieren además que la multiplicación de PMTV en la raíz de estas mismas conduce a una detección exitosa del virus. Además, *Nicotiana benthamiana* Domin, *Nicotiana clevelandii* A. Gray, *Nicotiana debneyi* Domin o *Nicotiana rustica* L. pueden ser infectadas por PMTV por vía sistémica (Harrison y Reavy, 2002).

## 4.6.2. Técnicas basadas en características intrínsecas de los patógenos virales

### 4.6.2.1. Métodos serológicos

Todos los métodos de inmunodiagnosic se basan en la capacidad de los anticuerpos para unirse a antígenos. El objetivo de los ensayos es detectar o cuantificar la unión de las proteínas tanto del patógeno (antígeno) como de los anticuerpos (proteínas del tipo inmunoglobulinas que reconocen dichos antígenos y se producen a partir del sistema inmune de los animales de sangre caliente). Tal unión se puede evaluar con una serie de técnicas. El complejo anticuerpo-antígeno puede visualizarse debido a su capacidad de formación de macro o microprecipitados visibles en un medio líquido (test de aglutinación y de inmunoprecipitación) o en gel (inmunodifusión simple, radial o doble). Los anticuerpos pueden ser marcados con tintes fluorescentes y la unión puede ser detectada en un microscopio fluorescente (Test de inmunofluorescencia directo o indirecto). Es posible radiomarcarse anticuerpos y cuantificar los complejos con antígenos (radioinmunoensayo). El oro coloidal es usado con anticuerpos marcados en análisis de inmunohistoquímica usando un microscopio electrónico o inmunoblotting. Sin embargo, más a menudo se acoplan anticuerpos a una enzima, donde se genera un cambio de coloración producto de la adición de un sustrato (Shcherbakova, 2007). A continuación se describen las principales técnicas inmunológicas utilizadas para la detección de PMTV:

## ELISA (Enzyme-linked immuno-sorbent assay)

Para detectar a un patógeno vegetal, el antisuero (suero inmune) que contiene anticuerpos contra los antígenos puede utilizarse directamente en pruebas de ELISA. Sin embargo, una práctica común para este ensayo es el uso de anticuerpos previamente aislados del suero inmune. Para preparar conjugados con enzimas, los anticuerpos deben ser purificados de los antisueros. Independientemente de que formato de ELISA se utiliza para el diagnóstico cualitativo o cuantitativo, se requieren de anticuerpos altamente específicos y sensibles, siendo estas las propiedades que determinan en gran medida el éxito de la prueba.

La prueba de ELISA se realiza a menudo mediante el uso de placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno. El poliestireno puede adsorber anticuerpos y antígenos diferentes, pero además hay un gran número de métodos químicos de tratamiento de la superficie de la placa que proporcionan grupos funcionales para la unión covalente entre anticuerpo-antígeno.

La prueba de ELISA puede ser referenciada como función directa o indirecta, dependiendo de qué tipo de anticuerpo esté asociado a la enzima. En el directo, el antígeno objetivo es detectado por una enzima conjugada de anticuerpos homólogos (antígeno específica). En la prueba indirecta, un anticuerpo homólogo al antígeno, pero sin marcar (ABs1), es el que captura el antígeno objetivo y luego

un conjugado de enzima es el que detecta el complejo antígeno-anticuerpo, a partir de un segundo anticuerpo contra ABs1 (Shcherbakova, 2007).

Hay diversidad de protocolos en los que se usan platos de poliestireno como soporte para la aplicación de las pruebas de ELISA, pero el más común es el formato DAS (*double antibody sandwich*), que se basa en la ubicación del antígeno en medio de dos anticuerpos específicos. La IgG se une fuertemente al poliestireno e interactúa con el antígeno. Para revelar la reacción se hace uso de la misma IgG pero marcada con la enzima (conjugado), la cual se fija al antígeno y posteriormente se adiciona el sustrato para que ocurra la reacción de color. La intensidad del color es medida a una longitud de onda de 405 nm (para fosfatasa alcalina). La absorbancia puede en ciertos rangos de concentración, ser proporcional al logaritmo de la concentración, pudiéndose utilizar con fines de cuantificación. Esta técnica es una de las más empleadas en los sistemas de diagnóstico de la virología vegetal (Salazar, 1995; Astier *et al.*, 2007; Shcherbakova, 2007). Para PMTV Latvala-Kilby *et al.*, (2009) utilizaron esta metodología para la detección de PMTV en tubérculos y brotes de papa resultando ser altamente exitosa en la detección del virus.

Otras variantes de ELISA corresponden al sándwich de ELISA indirecto o TAS-ELISA (*Triple antibody sandwich*), que involucra anticuerpos provenientes de dos especies animales, siendo los anticuerpos que detectan el antígeno objetivo, producidos en una de estas especies y el anticuerpo del conjugado, producido en

la otra especie animal. Una ventaja de este método es la universalidad del conjugado, ya que puede ser empleado para el análisis de varios antígenos. Otro formato de ELISA es DAC (recubrimiento directo de antígenos) ó PTA (antígenos atrapados en placa). En este procedimiento, los antígenos son inmovilizados en una placa, contrario a lo que pasa en el DAS-ELISA. Se usa preferiblemente para evaluar la respuesta inmune a un antígeno y no tanto para realizar diagnóstico (Shcherbakova, 2007).

#### Inmuno-fluorescencia (IFA)

Actualmente se usan para la prueba anticuerpos monoclonales, los cuales son marcados con colorantes fluorescentes para producir los conjugados con moléculas como fluorosceína isotiocianato o rodamina isotiocianato. En el ensayo directo, se emplean conjugados con anticuerpos específicos para el antígeno objetivo; en el caso del ensayo indirecto, como en el TAS-ELISA, el segundo anticuerpo es el que se encuentra marcado con el colorante fluorescente. El resultado se observa en un microscopio de fluorescencia, lo que se puede potenciar si se utiliza un software apropiado que cuantifique las unidades fluorescentes presentes en la placa; dicho procedimiento es muy laborioso y por tanto el número de muestras analizadas es limitado (Shcherbakova, 2007).

#### *Immunoblotting*

Es denominado también *Western blotting*. Es un método muy sensible para la identificación de proteínas y se basa en la combinación de geles de electroforesis

y la interacción antígeno-anticuerpo. El método consta de tres etapas: separación de las proteínas a analizar en un gel de poliacrilamida desnaturizante con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), donde pueden ser visualizadas luego de una tinción y comparadas con las muestras de referencia. La segunda etapa se basa en la transferencia y fijación de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis (*blotted*). Por último, los anticuerpos policlonales o monoclonales son aplicados a la membrana para realizar la detección mediante reacción enzimática similar a la descrita en las pruebas de ELISA (Shcherbakova, 2007).

#### Microscopía electrónica

La microscopía electrónica permite obtener resultados de diagnóstico a partir de una evidencia visual mediante la tinción negativa con metales pesados de los tejidos/savia vegetales (Salazar, 1995). Es frecuente su combinación con métodos inmunológicos (inmuno-electromicroscopía-IEM) que se constituye en uno de los medios directos más precisos de identificación de virus. La técnica es simple y rápida dependiendo del título viral, consiste en examinar un extracto crudo de planta, de manera que los anticuerpos se fijan a los motivos antigénicos de la cápside viral, formando un tipo recubrimiento alrededor de la partícula, que es fácilmente observable al microscopio electrónico (Salazar, 1995; Astier *et al.*, 2007).

#### 4.6.2.2 Métodos moleculares

En la actualidad se dispone de gran variedad de métodos de diagnóstico inmunoquímico que proporcionan una buena detección e identificación de los agentes causales de enfermedades. Sin embargo, éstas presentan limitaciones de sensibilidad y resolución para diferenciar entre razas o especies relacionadas de virus.

Las técnicas basadas en el uso de ácidos nucleicos han permitido a los investigadores superar las desventajas que presentan las pruebas dependientes de la interacción antígeno-anticuerpo. Una ventaja de los métodos basados en el uso de ácidos nucleicos es por tanto, la alta precisión que ofrecen para la detección viral así como su uso simultáneo y rápido para la caracterización genética de los virus bajo estudio; e incluso de su interacción con el hospedero. Estos métodos se dividen básicamente en dos grupos: hibridización con secuencias de DNA/ RNA y aquellos que emplean la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Shcherbakova, 2007).

Técnicas basadas en hibridización de ácidos nucleicos.

El proceso requiere de un DNA de referencia específico para el patógeno fijado al soporte, el DNA total aislado de una muestra, por lo general previamente amplificado por PCR, se marca y se utiliza como sonda. La hibridización con DNA de referencia da lugar a un patrón de señales positivas que indican que el

organismo objetivo se encuentra en la muestra; por lo tanto, algunos patógenos del mismo grupo pueden ser detectados e identificados en un solo experimento.

El principio de estas técnicas se basa en la fijación de pequeñas cantidades de extractos de plantas (*Tissue-Printing*) ó de ácidos nucleicos totales (*Dot-Blot*) a membranas de nylon o nitrocelulosa, que son reconocidos por sondas marcadas ó no radioactivamente (sondas no isotópicas). El resultado se monitorea por el cambio de coloración que se observa en la membrana (detección colorimétrica) ó sobre una película de detección (métodos radioactivos ó quimioluminiscentes) (Astier *et al.*, 2007).

### Microarreglos

La técnica conocida como microarreglos o Chip de ácidos nucleicos, tiene un alto potencial para convertirse en un método fiable para la detección paralela de muchos agentes patógenos virales en un futuro cercano. Inicialmente fueron diseñados para el estudio de la expresión de genes o de perfiles de SNP (*single-nucleotide polymorphism*). Actualmente, se han convertido en una herramienta estándar para la investigación en biología molecular y diagnóstico microbiológico (Park *et al.*, 2001). El principio de los microarreglos es la hibridización de las secuencias marcadas con fluorescencia a sus secuencias complementarias fijadas en una superficie sólida, que actúan como sondas, por tanto el conocimiento previo de las secuencias de los virus es un requisito para el diseño de las sondas. Dependiendo de los factores como la  $T_m$  y la longitud de los cebadores, los

microarreglos pueden ser altamente específicos y en algunos casos incluso discriminar genotipos dentro de las especies. La principal ventaja de este método es la posibilidad de detectar patógenos de manera simultánea, pues hasta 30.000 sondas pueden colocarse en un portaobjetos que formarían el microchip. Sin embargo, sólo unos pocos estudios utilizando microarreglos para la detección de virus en plantas han sido publicados y sólo han incluido algunos virus en “prueba de concepto” o para la genotipificación de los virus estrechamente relacionados (Nicolaisen, 2011).

Boonham *et al.* (2003), realizaron estudios basados en microarreglos para la detección de virus en plantas, reportando entonces una infección mixta en papa de los virus PVY, PVA, PVX y PVS. Mientras que Bystricka *et al.* (2005) detectó dos virus simultáneamente en papa (PVAS y PLRV). El estudio de Nicolaisen (2011) es hasta el momento el único donde se evalúa la técnica de microarreglos para detección de PMTV, encontrando señal positiva para la detección de PMTV en las pruebas realizadas.

### Macroarreglos

La detección de patógenos mediante macroarreglos ha sido utilizada muy poco y no se ha aprovechado al máximo el potencial de esta tecnología, principalmente por los altos costos asociados a su uso. Una alternativa atractiva en los últimos años se ha basado en el uso de macroarreglos en membranas, cuyo uso no involucra equipos especializados o de reactivos y materiales de alto costo. La

reutilización de membranas ofrece una gran reducción de costos con relación a los microarreglos (Agindotan y Perry, 2007).

Agindotan y Perry (2007) desarrollaron un sistema de macroarreglos para la detección de 11 virus de papa y del viroide *Potato spindle tuber*. Entre los 11 virus detectados se incluyen los comúnmente encontrados y probados en Norteamérica en programas de certificación de semilla: *Alfalfa mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Potato mop top virus*, *Potato leafroll virus*, *Potato latent virus*, *Potato virus A*, *Potato virus M*, *Potato virus S*, *Potato virus X*, *Potato virus Y*, y *Tobacco rattle virus*. Estos virus fueron detectados usando oligonucleótidos y sondas marcadas. Entre las plantas de papa analizadas incluyeron las plantas infectadas con 12 virus de referencia y 36 aislamientos de campo. Los resultados del macroarreglo fueron consistentes con los resultados obtenidos utilizando ELISA. Cuatro aislamientos de *Potato spindle tuber viroid*, en infecciones mixtas con más de un virus fueron detectados en el arreglo.

#### Hibridización *Dot-Blot*

En esta metodología, se parte de una pequeña cantidad de savia de la muestra a evaluar, a la cual se realiza extracción de ácidos nucleicos. Luego se procede a su desnaturalización a altas temperaturas o por tratamiento con álcali y se fija a la membrana con la ayuda de UV. Los sitios no específicos de reconocimiento en la membrana son bloqueados por incubación en la etapa de prehibridización,

utilizando una solución que contiene una proteína (generalmente albúmina de suero bovino). Posteriormente se realiza el proceso de hibridación en la membrana con una sonda marcada, para luego proceder a lavar y realizar el revelado que depende del tipo de sonda utilizada (Hull, 2009). Se ha reportado que la técnica puede detectar hasta 0,5 pg de título viral (Khan y Dijkstra, 2006). Considerando que la prueba es fiable, rápida y fácil de desarrollar, se presenta como una alternativa al uso de la técnica de ELISA convencional, cuando no se cuentan con anticuerpos específicos para un virus de interés o cuando los costos de éstos son muy altos (Astier *et al.*, 2007).

### *Tissue-Printing*

En este caso, se utiliza una aplicación directa de secciones frescas de tejido infectado (tallo, hojas o bulbos) en una membrana para visualizar *in situ*, la distribución en los tejidos de los virus (Makkouk *et al.*, 1993). El procedimiento es rápido, sensible y simple (no utiliza extracción de virus), es económico por qué no requiere de equipo especializado, además es apropiado para evaluar un alto número de muestras por día (Webster *et al.*, 2004). Esta técnica permite estudiar aspectos relacionados con la localización de las partículas virales en los tejidos de las plantas y evaluar su movimiento entre células y a través de los haces vasculares (Mas y Pallas, 1995).

Las hibridaciones son reveladas mediante el marcaje de la prueba con un isótopo radioactivo (fósforo 32) o un reportero no radioactivo como biotina, acetilaminofluoreno (AAF), fluorovitosina o digoxigenina (Astier *et al.*, 2007).

### Técnicas basadas en PCR

Los métodos moleculares, en particular los métodos basados en PCR, a menudo se desarrollan y se adaptan bien a la detección de virus en plantas. Sin embargo, la adopción de PCR para la detección rutinaria ha sido lenta; debido entre otras razones al problema de funcionamiento de geles y su interpretación (en particular en muestras de gran tamaño), a los altos riesgos de contaminación y por ende de generar falsos positivos y la inhibición de la reacción por diferentes componentes de los tejidos o sustratos a evaluar.

La técnica de PCR se fundamenta en la amplificación exponencial de una secuencia de ácidos nucleicos que es flanqueada por un par de cebadores, los cuales son usados por una polimerasa termo estable de DNA para la formación de las nuevas cadenas. La técnica consta de múltiples ciclos (usualmente 35 a 40) en los cuales hay desnaturalización de DNA de doble cadena, anillamiento de los cebadores (oligonucleótidos de 16 a 35 bases), extensión (polimerización) y nuevamente desnaturalización. Esto permite la detección precisa de una secuencia viral y posterior secuenciación para caracterizarla con exactitud (Astier *et al.*, 2007; Shcherbakova, 2007).

La PCR convencional no es adecuada para identificación de virus de RNA, por lo tanto, se requiere de la acción de una enzima adicional, la RNA polimerasa dependiente de DNA (transcriptasa reversa). La reacción catalizada por la enzima conduce a la formación de una sola cadena de cDNA que luego se amplifica con la Taq polimerasa; esta técnica se denomina RT-PCR (Shcherbakova, 2007, Capote, *et al.*, 2009). Los métodos basados en PCR permiten una mayor sensibilidad que las pruebas mencionadas anteriormente, debido a que una pequeña secuencia es amplificada millones de veces, posibilitándose su visualización como bandas a través de electroforesis en geles (Shcherbakova, 2007). Entre las diferentes variaciones que tiene esta técnica se incluyen:

#### PCR anidada

Se fundamenta en el empleo de dos pares de cebadores, los externos que dan origen a un fragmento que sirve de molde para el segundo par (internos), generando amplicones altamente específicos. Un ejemplo del uso exitoso de esta técnica en virología, corresponde a la detección de especies de virus de los géneros *Vitivirus* y *Foveavirus* en plantas de vid (Webster *et al.*, 2004; Shcherbakova, 2007).

#### PCR-RFLP

En esta técnica se hace uso en conjunto de la metodología RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) y PCR, para estudiar las diferencias entre los virus con base en la ausencia/presencia de sitios de restricción en la secuencia de sus genomas. Luego de la amplificación por PCR, los fragmentos obtenidos son digeridos con una enzima de restricción y se analiza el patrón de bandas mediante electroforesis. Es un método que permite diferenciar aislamientos sin los costos que consumen la clonación y la secuenciación (Webster *et al.*, 2004).

RT-PCR múltiple.

Múltiples especies o razas pueden ser detectadas en una sola reacción de PCR, que combina cebadores específicos para los diferentes virus. La técnica requiere que los productos de la amplificación posean tamaños diferentes para cada virus y que entre los cebadores no haya reacciones cruzadas (Webster *et al.*, 2004). Sin embargo, la capacidad de detección es todavía restringida a unos pocos objetivos por ensayo debido a la baja resolución de geles de agarosa en PCR tradicional o a la limitada capacidad de multiplexación y el alto costo de marcadores de PCR en tiempo real.

PCR-Inmunocaptura (IC-PCR)

Esta metodología combina el reconocimiento del virus con el uso de anticuerpos específicos y la amplificación por PCR. La reacción antígeno-anticuerpo,

constituye la primera fase, en la cual se reducen el riesgo de contaminación con inhibidores presentes en el tejido de la planta, al obtenerse el virus fijado a las placas de poliestireno. Luego, en condiciones alcalinas y en presencia de un detergente se libera el RNA ó DNA viral para ser amplificado posteriormente mediante RT-PCR o PCR convencional (Webseter *et al.*, 2004; Capote *et al.*, 2009).

En la actualidad los investigadores han utilizado una serie de métodos para obviar la necesidad de correr geles, usando la detección colorimétrica de los productos de PCR en placas o ensayos con fluorógenos y lecturas en placas fluorescentes de post-PCR; ambos métodos, aunque permiten un mayor rendimiento mediante el uso de microplacas, siguen siendo propensas a problemas de contaminación. Sin embargo utilizando la detección en tiempo real (es decir, la detección de productos de PCR durante la amplificación) estos problemas pueden ser aliviados.

#### PCR en tiempo real

El seguimiento de la acumulación de la amplificación en tiempo real ha sido posible gracias al marcaje tanto de los cebadores como de las sondas o a la amplificación en presencia de moléculas fluorogénicas, que presentan como ventajas sobre oligosondas radiogénicas la ausencia de emisiones radiactivas, la facilidad de eliminación y una vida útil más larga.

Los métodos de PCR convencional han revolucionado la detección de patógenos en plantas, pero las relaciones cuantitativas entre la cantidad de DNA / RNA inicial y la cantidad de producto de PCR/RT-PCR en cualquier ciclo es difícil de determinar. El desarrollo de PCR en tiempo real ó cuantitativa (PCRq) ha eliminado este limitante, permitiendo resultados confiables y precisos de la cantidad inicial de DNA/ RNA molde. A diferencia de la PCR cuantitativa convencional de punto final, la PCR en tiempo real monitorea los productos de PCR mientras se acumulan en la fase exponencial, antes de que los sustratos de la reacción se conviertan en los limitantes. La medida de la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la reacción mediante un fluorómetro elimina la necesidad de pasos post-PCR, por lo que un diagnóstico preciso se puede realizar en alrededor de 2 a 5 horas (Zhonghua, 2007).

Una mejora significativa introducida por la PCR en tiempo real es el aumento de la velocidad para la detección de patógenos. Esto se debe principalmente a la reducción de tiempos de ciclo, la separación o eliminación de los procedimientos de detección post-PCR y el uso de equipos sensibles a la detección de fluorescencia que permite la cuantificación. La cuantificación mediante esta técnica es generada mediante la comparación con una curva de calibración previamente establecida en cada ensayo (Shcherbakova, 2007). Sin embargo, un inconveniente de la PCR en tiempo real es el costo relativamente alto del equipo. Actualmente existen varios formatos de químicos fluorescentes, SYBR<sup>TM</sup> Green, TaqMan<sup>TM</sup>, molecular *beacons* y *Scorpion<sup>TM</sup>*. Estos han sido desarrollados para

monitorear los productos de la amplificación durante la reacción, cada uno con sus ventajas y desventajas (Shcherbakova, 2007).

Es necesario mencionar que aunque la mayoría de los ensayos de PCR en tiempo real se caracterizan por la alta precisión y reproducibilidad, la exactitud de los datos obtenidos son en gran medida dependientes de otros factores tales como la preparación de muestras y la calidad y estabilidad de la curva estándar. Por lo tanto, la exactitud de los datos obtenidos necesita ser comprobada durante el desarrollo del ensayo en comparación con otros ensayos establecidos. Esta es la principal tarea de diagnóstico molecular para garantizar datos fiables (Klein, 2002).

La cuantificación mediante PCR en tiempo real se puede realizar de dos maneras: cuantificación relativa y absoluta (Freeman, 1999). La cuantificación relativa describe los cambios en la cantidad de una secuencia diana en comparación con una matriz de comparación, mientras que la cuantificación absoluta indica el número exacto de los ácidos nucleicos objetivos presentes en una muestra en relación con una unidad específica. En general, la cuantificación relativa ofrece información suficiente y es más fácil de desarrollar. Sin embargo, al supervisar el avance de una infección, la cuantificación absoluta es útil para expresar los resultados en unidades que son comunes a los investigadores.

Aunque una comparación de las curvas de calibración absoluta, relativa, curvas estándar y los valores Ct produce valores finales similares, es necesario utilizar un control interno en combinación con réplicas de cada muestra.

En la actualidad esta técnica está siendo ampliamente utilizada debido al aumento en los niveles de sensibilidad para la detección de virus fitopatógenos (Mumford *et al.*, 2000; Olmos *et al.*, 2005; Kogovsek *et al.*, 2008; Davey, 2009). Así por ejemplo, Olmos *et al.*, (2005), al evaluar la presencia de PPV directamente en áfidos, encontraron que la RT-PCRq podría detectar niveles tan bajos como 4 copias del genoma viral y a partir de este límite inferior su rango de acción alcanzó  $4 \times 10^8$  copias. Los autores, al comparar la sensibilidad de esta técnica con respecto a RT-PCR convencional, anidado y ELISA, encontraron que RT-PCRq podría aún generar curvas de amplificación en diluciones de transcritos del genoma viral tan bajas como 1:65,536,000; mientras que RT-PCR anidado y RT-PCR convencional/ELISA lo hacían en niveles de 1:32,768,000 y 1:256,000, respectivamente. Esta situación corresponde en términos prácticos a aumentos de sensibilidad de 100 y 1000 veces, un valor similar al encontrado por Fabre *et al.* (2003), evaluando la detección de *Barley yellow dwarf virus* (BYDV). En forma similar, diversos trabajos se han realizado con el fin de evaluar el potencial de RT-PCRq para su uso en programas de certificación de tubérculo semilla de papa y la detección de PMTV y de su vector Sss en lotes de cultivo (Mumford *et al.*, 2000; van de Graaf *et al.*, 2003). Davey (2009) indica que mediante RT-PCRq es posible la detección del PMTV en bioensayos basados en tomate luego de un periodo tan corto como dos semanas, lo cual al compararse con la metodología convencional, representa un ahorro de tiempo cercano a dos meses. Por otra parte, Mumford *et al.* (2000), diseñaron cebadores y una sonda bajo el sistema de RT-PCRq Taqman para la detección de PMTV en tejido foliar y tubérculos de papa, encontrando que

esta metodología aumenta el nivel de sensibilidad del diagnóstico de dicho virus en 10000 veces con respecto al procedimiento de ELISA comúnmente utilizado. En Colombia, (Gil 2010) evaluó la posibilidad de incorporar la metodología de RT-PCRq como una herramienta adicional para la detección de los virus que afectan este cultivo en el país, encontrando que el 100% de las muestras analizadas para PVY y el 45% para PMTV, resultaron positivas para dichos virus. Estas proporciones de detección fueron superiores en ambos casos con respecto a las técnicas de ELISA y RT-PCR convencional, siendo diagnosticado el virus PVY en un 34% más de las muestras, que lo encontrado mediante ELISA y en un 9% más con respecto a RT-PCR convencional. Similarmente, el virus PMTV fue detectado por el RT-PCRq en una proporción superior en 20 y 17% con respecto a ELISA y RT-PCR convencional, respectivamente.

#### 4.7. Control del PMTV

La lucha contra las virosis depende de nuestro conocimiento de la biología del virus y de su epidemiología, especialmente de su forma de transmisión. Además, a diferencia de las enfermedades producidas por hongos y bacterias no existen "viricidas" para el control de estas enfermedades. Existen alternativas para el manejo de estas enfermedades en plantas, que son fundamentalmente preventivas. Por un lado, es posible determinar una infección prematura viral en un cultivo y proceder a la eliminación selectiva de las plantas infectadas (manejo de focos) y también es posible certificar la sanidad de las semillas y/o plántulas que

se utilizan en las siembras. Adicionalmente, las prácticas de control de vectores y demás prácticas culturales que reduzcan la tasa de diseminación de los virus resultan fundamentales para el manejo de dichos problemas. Finalmente, el uso de variedades resistentes y tolerantes es un ideal recomendado, pero difícil de lograr en la gran mayoría de cultivos, por la ausencia de programas de mejoramiento genético de largo plazo (Santala, *et al.*, 2010).

Selección de tubérculo semilla y eliminación de plantas infectadas. El manejo de PMTV puede mejorarse mediante el descarte de plantas con síntomas en el follaje; Calvert (1966) demostró que la incidencia de los síntomas foliares fue menor en las plantas procedentes de tubérculos semilla sin anillos que las procedentes de tubérculos semilla con estos síntomas. Los estudios han demostrado que el descarte de las plantas sintomáticas de cvs piloto Arran y Red Craigs Real puede reducir la incidencia de PMTV en un cultivo (Cooper *et al.*, 1976). Sin embargo, el descarte no es una medida de control completamente confiable, debido a que pueden quedar en campo plantas asintomáticas aparentemente libres de PMTV. Harrison y Jones (1971) recomiendan además el almacenamiento de los tubérculos de semilla bajo condiciones óptimas para el desarrollo de anillos (*spraing*), permitiendo descartar de una manera más simple los tubérculos afectados.

Selección de cultivares. La selección de cultivares también puede ayudar a minimizar la infección PMTV. Los cultivares poseen diferente grado de sensibilidad

a la infección por PMTV, por ejemplo, cv. Saturna, ampliamente utilizado en la industria escandinava del procesamiento de papa, es muy sensible a este virus (Sandgren, 1995; Nielsen y Molgaard, 1997), mientras que las cvs Bintje, Pito, Hertha y Record son tolerantes; es decir, los tubérculos infectados son asintomáticos y los cvs Appell y Desirée son más resistentes a la infección por PMTV (Kurppa, 1989; Germundsson *et al.*, 2002).

Control del vector. Las medidas de control para PMTV generalmente están dirigidas a su vector Sss (mencionado previamente sección 5.1.4). La siembra de tubérculo semilla libre de sarna polvosa y el evitar el cultivo de papa en suelos infestados con Sss, reducirá el riesgo de infección. Por esto es fundamental asegurarse de que los tubérculos semilla no están contaminados con quistosoros y evitar la distribución del patógeno a los sitios nuevos. Sin embargo, los quistosoros en los tubérculos pueden no ser visibles a simple vista o confundirse con los síntomas inducidos por *Streptomyces scabies*, por lo que siempre existe la posibilidad de seleccionar los tubérculos contaminados.

## 5. METODOLOGÍA

### Localización.

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biología Celular y Molecular y de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Las plantas señuelo de *N. benthamiana* inoculadas con quistosoros de Sss (Gil, 2010; Osorio, 2012), se realizó bajo condiciones de casa-malla en el centro experimental Paysandú , ubicado en el corregimiento Santa Elena, municipio de Medellín (6° 12' 37'' Latitud N y 75° 30' 11'' Longitud O). Adicionalmente, se obtuvieron muestras de raíces y tejido foliar de plantas de papa de cultivos del municipio de La Unión (Antioquia) (5° 58' 38'' Latitud N y 75° 24' 54'' Longitud O).

### 5.1 Secuenciación parcial del RNA2 de PMTV

Con el fin de obtener la secuencia completa de la región RT del RNA2 de PMTV, se seleccionó el aislamiento R25 del municipio de La Unión (Antioquia). Dicho aislamiento fue mantenido sobre plantas de *N. benthamiana*, previamente inoculadas con una suspensión de  $1 \times 10^6$  quistosoros de Sss, siguiendo el protocolo de Gil et al. (2011).

Trascurridos tres meses después de la inoculación, se colectaron raíces y hojas de las plantas inoculadas, para proceder a la extracción de su RNA total mediante

el kit *RNeasy plant mini kit* (Qiagen, California, USA). Para realizar este procedimiento se maceraron 100 mg de tejido, utilizando 450  $\mu$ l de buffer RLT para tejido foliar o de buffer RLC para raíces y 4,5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, y se siguieron las instrucciones del fabricante (Anexo 1). Al finalizar el procedimiento el RNA obtenido se resuspendió en 40  $\mu$ l de H<sub>2</sub>Odd tratada con DEPC.

El DNAc se obtuvo a partir de reacciones de RT-PCR en dos pasos (*Two-Step RT-PCR*). En el proceso de retro-transcripción se utilizó el cebador 123-end (5' GTG AAC CAC GGT TTA RCC CTG KAA GC 3'), dado su carácter conservado y su ubicación en el extremo 3' de los tres segmentos de RNA del PMTV (Savenkov *et al.*, 1999). El volumen final de la reacción fue de 15  $\mu$ l e incluyó 1,5  $\mu$ l de agua, 4  $\mu$ l de Buffer RT (5X); 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 2  $\mu$ l de dNTP's (10 mM), 1  $\mu$ l de cebador (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l de inhibidor de RNAasa (40U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l de enzima M-MuLV Transcriptasa reversa (20 U/ $\mu$ l) (Fermentas, Lituania) y 5  $\mu$ l del RNA molde. El programa de extensión consistió en 37°C por 60 min, seguido de 75°C por 15 min, con el fin de desactivar la enzima. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su uso posterior.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25  $\mu$ l que incluía 17,8  $\mu$ l de agua, 2,5 de buffer de enzima (10X), 1,8  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5  $\mu$ l de dNTPs (10 mM), 0,5  $\mu$ l de cada cebador (10  $\mu$ M) (Tabla 1; Figura 5), 0,4  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (Fermentas) y 1  $\mu$ l de DNAc. El programa de PCR consistió en 95°C por 30 s, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30s, 52-60°C por 45 s, 72°C por 1

min (1 min por cada 1000 pb esperados) y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones obtenidos fueron purificados mediante los kits *QIAquick Gel Extraction* y *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, Alemania), según su especificidad y se procedió a su secuenciación en ambos sentidos, usando los mismos cebadores del RT PCR, en un secuenciador ABI Prism 3730xl (PE Biosystems) de la compañía Macrogen (Corea del Sur) y previo conocimiento de la concentración del DNA obtenido en cada reacción utilizando la lectura de absorbancia en las longitudes de onda de 260 y 280 nm mediante un Nanodrop 2000C (Thermo, EEUU), obteniéndose un rango entre 10 y 112 ng de ADN/μL con una relación 260:280 de 1,5 a 1,9.

Las secuencias obtenidas con cada cebador se editaron mediante el software BioEdit 6.0.6 (Hall 1999), construyéndose secuencias consenso y confirmándose su identidad con el genoma de PMTV, por comparación con las bases de datos moleculares, mediante el programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Posteriormente, se procedió al ensamblaje del *contig* representando la secuencia parcial del RNA2 de la cepa R25 y conteniendo el dominio RT de CP-RT de PMTV, mediante el programa CAP3 (Huang y Madan, 1999). Se verificó el marco de lectura correcto utilizando el servidor de Expasy (Expasy Proteomic Server, <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) y se procedió a realizar comparaciones de porcentajes de identidad de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa), así como a determinar el número de posiciones variables a lo largo de la región bajo estudio,

con respecto a cepas de PMTV de referencia mundial, utilizando el programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Finalmente, se realizó un análisis filogenético basado en una matriz de alineación obtenida a partir de secuencias de referencia mundial de PMTV y el *contig* obtenido en este estudio. El alineamiento fue utilizado para generar una matriz de distancia genética usando el método de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980) y el árbol filogenético fue construido mediante el algoritmo de *Neighbor-Joining*, (Saitou y Nei, 1987) con 10000 iteraciones para evaluar el soporte *bootstrap* de las ramas (Felsenstein, 1985), utilizando el software MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación por RT-PCR de diferentes regiones del RNA2 de PMTV.

Cebadores	Secuencia	Tamaño amplicón	T° annealing	Referencia
H360	5'-CAT GAA GGC TGC CGT GAG GAA GT 3'	2578 pb	58°C	MacKenzie (1996)
123 end	5'-GTG AAC CAC GGT TTA RCC CTG KAA GC 3'			Savenkov <i>et al.</i> (1999)
H360	5'-CAT GAA GGC TGC CGT GAG GAA GT-3'	460pb	53°C	MacKenzie (1996)
C819	5'-CTA TGC ACC AGC CCA GCG TAA CC-3'			
PMTV71F	5' AGT AAT ACG ACC AGG TGT TGG TTG CT 3'	773 pb	56°C	Gil <i>et al.</i> (2011)
C819	5'-CTA TGC ACC AGC CCA GCG TAA CC-3'			MacKenzie (1996)
PMTV759F	5' ACC TGA GGT CAG AGT TAT CGA CG 3'	945 pb	54°C	Gil <i>et al.</i> (2011)
2017R	5' CCA CTG CAA AAG AAC CGA TTT C 3'			Mumford <i>et al.</i>

				(2000)
PMTV759F	5' ACC TGA GGT CAG AGT TAT CGA CG 3'	816 pb	54°C	Gil <i>et al.</i> (2011)
PMTV1552R	5' GCC AAT TGT CTC AAT CAT ACA CTG 3'			
CPRTFSacI	5'CGA GCT CCA ATT AAC CGC TCA GGC TTT TTG G 3'	1944 pb	62°C	Este estudio
CPRTRPstI	5'AAC TGC AGT CAA ACA GCC ATC TTA CCT GAC ATC 3'			

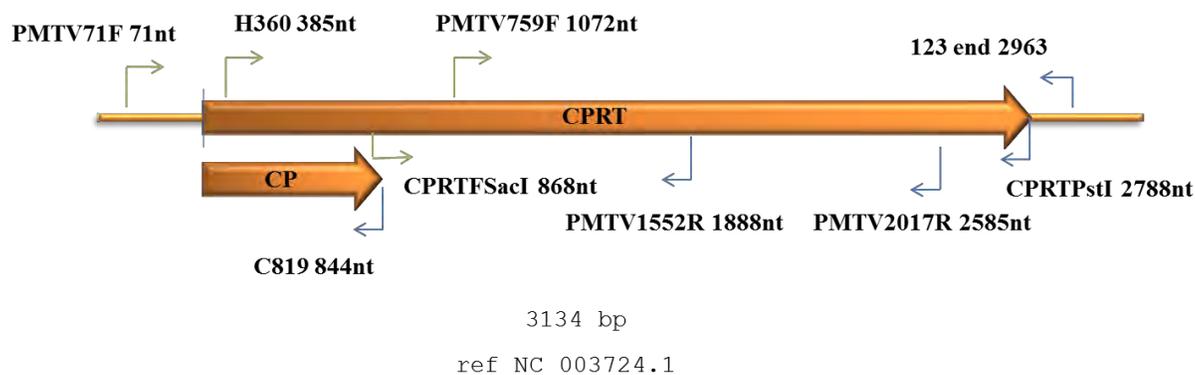


Figura 5. Contextualización de cebadores utilizados para la secuenciación parcial del RNA2 de PMTV mediante RT-PCR traslapado.

## 5.2 Clonación del dominio RT del RNA2 de PMTV.

A partir de las secuencias obtenidas para el RNA2 de la cepa R25 de PMTV, se diseñaron los cebadores CPRTFSacI (5' cgagctcCAATTAACCGCTCAGGCTTTTTGG-3') y CPRTRPstI (5'aactgcagtcaAACAGCCATCTTACCTGACATC3'), con el fin de clonar en el plásmido pQE80L (Qiagen) el dominio RT del segmento genómico RNA2 y de esta forma confirmar la secuencia base para el análisis de péptidos sintéticos

específicos para la detección de PMTV (Anexo 2). Estos oligonucleótidos contienen secuencias blanco para las enzimas de restricción *SacI* y *PstI*, respectivamente, con el fin de facilitar el proceso de clonación.

Las reacciones de RT-PCR se realizaron como se describió anteriormente, pero en este caso utilizando los cebadores CPRT\_*SacI* y CPRT\_*PstI* en la reacción de PCR y un programa de 35 ciclos de amplificación que consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por 1 min, desnaturalización de cada ciclo a 94°C por 30 s, temperatura de alineamiento a 62°C por 40 s, seguido de una extensión a 72°C durante 1,5 min y una extensión final a 72°C por 2 min.

Posteriormente, los amplicones obtenidos y el plásmido circularizado pQE80L (Qiagen) fueron digeridos con las enzimas *SacI* o *PstI* (Fermentas, Lituania), en formato individual y en un volumen final de 20 µl, conteniendo 1 µl enzima (10U/µl), 2 µl de buffer específico y 17µl de DNA del inserto o del plásmido, según el caso. La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y fue inactivada a 65°C por 20 min para *SacI* o a 80°C por 20 min para *PstI*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos digeridos fueron purificados utilizando el kit *Qiaquick PCR Purification* (Qiagen) y cuantificados mediante espectrofotometría a 260 nm, utilizando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Para la reacción de ligación se emplearon 100 ng del vector PQE80L, 400 ng del producto de PCR, 2µl de buffer de enzima y 1 µl de T4 DNA ligasa. Adicionalmente, para monitorear la eficiencia de la reacción, se realizó un control

de religación con 100 ng del vector PQE80L; 2µl de buffer T4 ligasa y 1 µl de T4 DNA ligasa (Fermentas). Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 4°C y la enzima se inactivó a 65°C por 10 min. La transformación se realizó mediante choque térmico (Anexo 3) en la cepa DH5α [fhuA2 Δ (argF-lacZ) U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ) M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17], que previamente fue tratada para su competencia mediante el método del Cloruro de Calcio (Anexo 4). Para evaluar el proceso de transformación, las bacterias tratadas se cultivaron en agar LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Después de verificar la eficiencia del proceso de clonación y comprobar la ausencia de colonias en el producto de re-ligación, las colonias que crecieron en el medio selectivo fueron evaluadas mediante PCR de colonias, con un volumen de reacción final de 20 µl, conteniendo 12,3µl de agua, 2 µl de Buffer de enzima (10X), 1,9 µl de MgCl<sub>2</sub> (10mM), 1,6 µl de dNTPs (10mM), 0,2 µl de *Taq* DNA polimerasa (5 U/µl) (Fermentas) y 1 µl de los cebadores del vector (PQEF: 5' CCC GAA AAG TGC CAC CTG 3' y PQER: 5' GTT CTG AGG TCA TTA CTG G 3') y del inserto (CPRT\_SacI y CPRT\_PstI ), así como de combinaciones de ambos (CPRT\_SacI/PQER y PQEF/CPRT\_PstI). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio (10 mg/ml) y fueron visualizados utilizando un fotodocumentador de UV (Biometra, Alemania).

Las colonias que resultaron positivas para el inserto, se cultivaron en 5 ml de medio LB por 16 h a 250 rpm. Se procedió a extraer los plásmidos de las células bacterianas utilizando el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 5). Finalmente, los plásmidos recombinantes fueron secuenciados utilizando los cebadores específicos del vector PQE80L y del inserto, en la compañía Macrogen (Corea del Sur).

### 5.3 Expresión y purificación de proteína recombinante.

La transformación y expresión del dominio RT se realizó en la cepa M15 [pREP4] ( $\text{NaI}^{\text{S}}$ ,  $\text{Str}^{\text{S}}$ ,  $\text{Rif}^{\text{S}}$ ,  $\text{Thi}^{-}$ ,  $\text{Lac}^{-}$ ,  $\text{Ara}^{+}$ ,  $\text{Gal}^{+}$   $\text{Mtl}^{-}$ ,  $\text{F}^{-}$ ,  $\text{RecA}^{+}$ ,  $\text{Uvr}^{+}$ ,  $\text{Lon}^{+}$ ). Para esto, las bacterias se cultivaron en 200 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$ ) y kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$ ) a 38°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6 - 0,8. La expresión de RT fue inducida con isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida (IPTG) (Promega, USA) a una concentración final de 1 mM y luego de 5 h de incubación a 28°C en agitación. Las bacterias se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min y el pellet obtenido fue tratado bajo condiciones desnaturalizantes, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la purificación de la proteína recombinante se empleó la resina Profinity TM IMAC Unchargd Resin (Bio-Rad, USA) con una capacidad de unión de 15 mg/ml de resina. De acuerdo a la concentración aproximada de la expresión de la proteína de interés, se calculó la cantidad de resina necesaria en la columna, para equilibrarla con 5 vol. de columna de 50 mM de acetato de sodio, 0.3 M NaCl, pH

4.0 y aplicar a la columna la solución con metal de Níquel ( $\text{NiSO}_4$  a 200mM). Luego se lavó la columna con 5 vol. de columna con acetato de sodio (50mM, 0,3M NaCl, pH 4.0),  $\text{H}_2\text{O}$  y nuevamente fue equilibrada con 5 vol. del buffer de lisis y 5 vol. de columna de  $\text{H}_2\text{O}$ . Finalmente, la columna fue equilibrada con 5 vol. del buffer de lisis.

Al tener la columna equilibrada, se adicionó el lisado filtrado permitiendo que fluyera por gravedad; después de tener retenida la proteína, se lavó con 5 vol de buffer de lavado de columna (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 8M Urea, pH 8.0) y se procedió a la elución con el buffer: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 8 M Urea, pH 8.0.

La cantidad de proteína purificada se determinó usando espectrofotometría (280 nm) (espectrofotómetro Genesys 6 (Thermo Scientific) y mediante análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) utilizando el coeficiente de extinción teórico (Edelhoch, 1967).

#### 5.4 Producción de péptidos y anticuerpos específicos para el dominio RT del RNA2 del PMTV.

A partir de las secuencias obtenidas para el dominio RT del RNA2 de PMTV, se realizó un análisis bioinformático basado en el alineamiento de esta región para la cepa R25 con respecto a otros aislamientos de PMTV de referencia internacional, cuyas secuencias están depositadas en el GenBank. Para esto se utilizó la metodología de Hopp y Woods (1981) con el fin de ubicar péptidos putativamente

inmunogénicos a partir de perfiles de hidrofiliidad. Estos análisis se realizaron utilizando los programas BioEdit 6.0.6 (Hall, 1999), y ProtScale (<http://expasy.org/tools/protscale.html>). Finalmente, se seleccionó el péptido Pep\_CP\_RT, que presentaba una secuencia conservada entre diferentes cepas de PMTV y una alta proporción de aa hidrofílicos, siendo sintetizado por el método manual en fase sólida en resina de 2-Cl-Trityl, en la compañía GenScript (USA). (Anexo 6).

A partir de 0.5 mg del péptido purificado mediante HPLC y conjugado con la proteína KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), se realizó una inoculación inicial en dos conejos raza New Zealand y tres refuerzos posteriores con igual cantidad de antígeno en los días 14, 35 y 56 después de la inoculación. Los anticuerpos policlonales obtenidos, denominados Anti\_CP\_RT, fueron purificados por afinidad, resuspendidos en PBS pH 7.4 (4g NaCl, 0,1g KCl, 0,288g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,048g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> por litro) y liofilizados hasta su utilización en las pruebas serológicas posteriores (Anexo 6).

La especificidad de los Anti\_CP\_RT con respecto al péptido sintetizado, fue inicialmente evaluada a partir de la técnica de *dot-blot*. El Pep\_CP\_RT fue fijado a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche descremada en polvo al 5% en buffer PBS (pH 7,4) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Para el revelado, se incubó la membrana durante tres horas con una dilución 1:1000 del anticuerpo primario Anti\_CP\_RT diluido en PBS. Luego de realizar tres lavados con PBS, se llevó a cabo la incubación del segundo

anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad) durante 1 h, seguido por tres lavados con PBS y la detección se realizó utilizando el sistema de revelado de Bio-Rad con los sustratos BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitroblue Tetrazolium). Para determinar el límite de detección de los anticuerpos en la prueba de *dot-blot*, se determinó la concentración mínima de péptido detectable y además se realizó la prueba del mínimo de anticuerpos requerido para detectar una concentración conocida del péptido. Para la primera prueba se fijaron en la membrana de nitrocelulosa diluciones de péptido de 5µM a 600µM, mientras que para la segunda se evaluaron las diluciones de 1:1000 a 1:8500 de anticuerpos Anti CP\_RT sobre 0,1mM de Pep\_CP\_RT.

## 5.5 Métodos para la detección de PMTV

### 5.5.1 Detección de PMTV mediante ELISA indirecto

Una vez confirmada la utilidad de los anticuerpos y su límite de detección por *dot-blot*, se procedió a evaluar su efectividad en pruebas de ELISA indirecto a partir de 86 muestras vegetales, 44 de raíz y 42 de tejido foliar, de plantas señuelo de *N. benthamiana*, inoculadas por Gil (2010) y Osorio (2012) y siguiendo la metodología propuesta por Vélez (2007) con quistosoros de Sss obtenidos en cultivos de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño. Cada muestra fue dividida en fragmentos de diferentes partes, hasta obtener 100 mg y proceder a su maceración en buffer de extracción 1X de la

compañía Bioreba (Suiza) (suplementado con 10g de albumina de huevo en 1000 ml) para tejido de raíz o alternativamente en PBS (pH 7,4) para tejido foliar. Luego, 200 µl del homogenizado se adicionaron a cada pozo de poliestireno y el plato se incubó en cámara húmeda durante 1 h. Terminado el tiempo de incubación, se realizaron cuatro lavados con buffer PBS-T (PBS suplementado con 0.05% Tween 20), para luego adicionar 200 µl de Anti\_CP\_RT (1:1000) e incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron cuatro veces con PBS-T, se adicionaron 200 µl de anticuerpos anti-conejo conjugados a fosfatasa alcalina (1:1000) (Bio-Rad) y se incubaron por 1 h, para finalmente adicionar 200 µl de la solución de revelado 25X (Bio-Rad). El plato se incubó en oscuridad por 30 min y los resultados fueron evaluados en un equipo lector de placas de ELISA Multiscan a 405 nm (Thermo, Finlandia). Las lecturas de absorbancia a 405 nm que resultaron superiores a dos veces la lectura registrada en el control negativo, se consideraron positivas, siguiendo el criterio de Matthews (1993).

#### 5.5.2 Detección de PMTV mediante IC-PCR y RT-PCR

En 17 de las muestras vegetales que resultaron positivas en las pruebas de ELISA, se realizó una evaluación confirmatoria de detección de PMTV mediante RT-PCR y en un subgrupo de dichas muestras (9) se realizó adicionalmente un procedimiento de inmunocaptura-RT-PCR (IC-RT-PCR) siguiendo el procedimiento propuesto por Harju *et al.* (2005). Para esto, se lavaron los pozos con PBS (pH 7,4) 3 veces y se les adicionó 50 µl de buffer de liberación (0.01M de

Tris HCl, Triton x-100 al 10%), se incubaron a 70°C por 15 min y el homogeneizado se almacenó en tubos de microcentrífuga de 0,6 ml a -20°C.

Luego se realizaron las extracciones de RNA mediante el kit *RNeasy plant mini kit* (Qiagen) y el RT-PCR, tal como se mencionó anteriormente, pero en este caso utilizando para el PCR cebadores específicos dirigidos a los genes CP ( H360: 5' CAT GAA GGC TGC CGT GAG GAA GT 3'y C819: 5'CTA TGC ACC AGC CCA GCG TAA CC 3') y TGB2 (PMTVF4 5' CAG CAA CCA CAA ACA GAC AGG-3' y PMTVR4 5' AGC CAC TAA CAA AAC ATA CTG C-3'), ampliamente utilizados en estudios de diagnóstico de este virus (MacKenzie, 1996; Xu *et al.* 2004; Vélez, 2007; Gil *et al.*, 2011).

#### 5.6 Prueba piloto de detección de PMTV en campo

Con el fin de validar la utilidad práctica de los anticuerpos Anti\_CP\_RT, se realizó una prueba piloto para la detección de PMTV a partir de muestras obtenidas directamente de cultivos de papa del municipio de La Unión (Antioquia), utilizando la técnica de ELISA indirecto descrita anteriormente. Para este ensayo se muestrearon cuatro lotes de papa y de cada lote se obtuvieron 3 muestras de raíz y 2 muestras de tejido foliar. Los resultados se compararon con la utilización de una prueba comercial (Bioreba, Suiza) de DAS-ELISA con anticuerpos dirigidos al gen CP de PMTV, siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo 8).

Finalmente, las muestras de raíz fueron evaluadas mediante RT-PCR con los cebadores H360 y C819 dirigidos al gen CP del RNA2. Los procedimientos de

extracción de RNA, retro-transcripción y PCR fueron similares a los descritos anteriormente, siendo seleccionados dos amplicones al azar para confirmar su naturaleza viral mediante secuenciación con los mismos cebadores usados en el RT-PCR. Dichas secuencias se analizaron en una matriz de distancia genética con otras secuencias de referencia mundial de PMTV usando el método de Kimura 2-parametros (Kimura, 1980). El árbol filogenético se construyó empleando el algoritmo de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) con 10000 iteraciones para evaluar el soporte *bootstrap* de las ramas (Felsenstein, 1985), utilizando el software Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Secuenciación parcial del RNA2 de PMTV

Con excepción de la combinación de los cebadores PMTV71F-C819, los demás cebadores utilizados en las reacciones de RT-PCR (H360-C819, PMTV759-PMTV2017R, PMTV759-PMTV1552R y H360-123 end) permitieron obtener los amplicones del fragmento esperado (Figuras 6, 7, 8, 9 y 10). De esta forma fue posible obtener las secuencias traslapadas para ensamblar un *contig* de 2566 nt que se extiende entre la posición 398 y 2963 con respecto al genoma de la cepa PMTV-Sw de Suecia (Accesión AJ243719) (Sandgren *et al.*, 2001) comprendiendo una porción del gen CP y la totalidad del dominio RT, además de una región adicional del UTR 3' de este segmento viral. Lo anterior implica que en este estudio se logró un porcentaje de cobertura del 81.8% del segmento RNA2 del genoma del aislamiento Colombiano R25 de PMTV.

En términos de aa, el *contig* obtenido para el RNA2 incluyó 147 de los 176 aa de CP y los 649 aa del dominio RT. Cabe resaltar que la proteína CP-RT se traduce como una proteína continua de 825 pb en conjunto con el dominio CP.

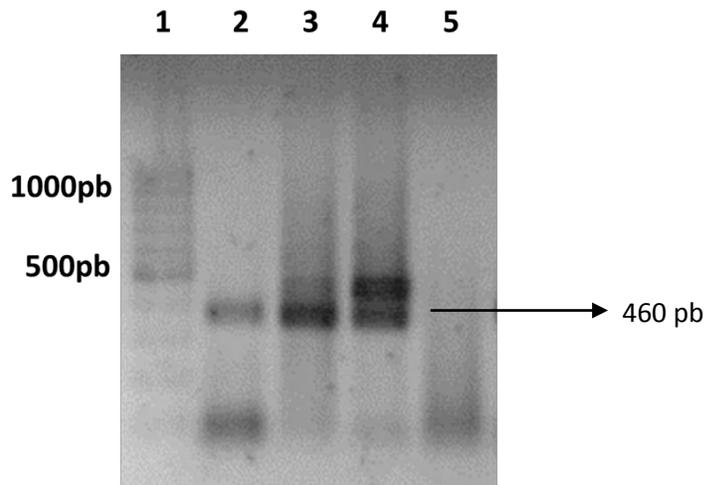


Figura 6. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460 pb) a partir de tejido de raíz de plantas de *N. benthamiana* cultivadas en suelos infestados con *S. subterranea* 1: Marcador 100pb plus, 2: R25, 3: Zip 6, 4: RValle, 5: Control negativo.

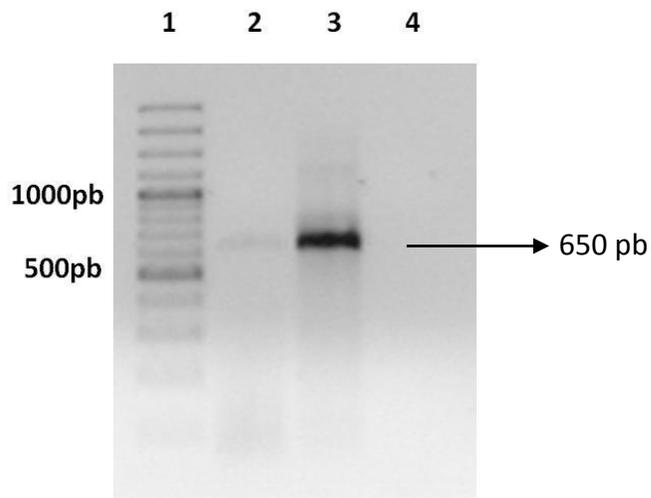


Figura 7. Amplicones obtenidos con los cebadores PMTV71F y C819 (~650 pb) a partir de tejido de raíz de plantas de *N. benthamiana* cultivadas en suelos infestados con *S. subterranea* 1: Marcador 100pb plus, 2: Mad, 3:R25, 4: Control negativo.

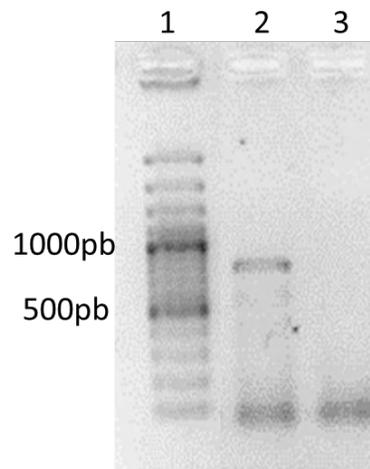


Figura 8. Amplicon obtenidos con los cebadores PMTV759-PMTV1552R (~816 pb) a partir de tejido de raíz de *N. benthamiana* cultivada en suelos infestados con *S. subterranea* 1: Marcador 100pb plus, 2: R25, 3: Control negativo.

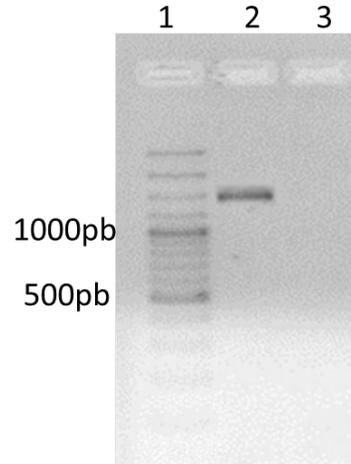


Figura 9. Amplicon obtenidos con los cebadores PMTV759-PMTV2017R (~1513 pb) a partir de tejido de raíz de *N. benthamiana* cultivada en suelos infestados con *S. subterranea* 1: Marcador 100pb plus, 2: R25, 3: Control negativo.

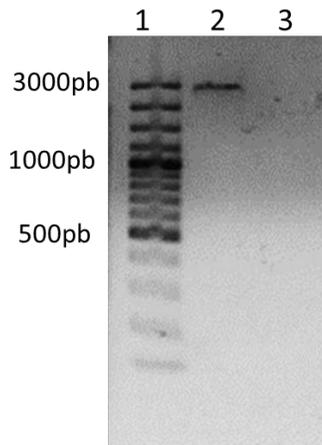


Figura 10. Amplicon obtenidos con los cebadores H360-123 end (~2978 pb) a partir de tejido de raíz de *N. benthamiana* cultivada en suelos infestados con *S. subterranea* 1: Marcador 100pb plus, 2: R25, 3: Control negativo.

El análisis filogenético de secuencias de PMTV del RNA2 se realizó con base en 2394 nt, extensión que resulta inferior al tamaño del *contig* obtenido, con el fin de incluir algunos aislamientos de PMTV que presentaban secuencias parciales depositadas en GenBank de las regiones codificantes de este segmento genómico. De esta forma se incluyeron en el análisis dos aislamientos de Letonia (64: AM503632 y 75: AM503633), un aislamiento de República Checa (Korneta-Nemilkov, DQ102381), un aislamiento de Finlandia (306: AM503624) y uno de Suecia (Sw: AJ243719). El dendrograma resultante generó un clado y dos ramas individuales. El clado estuvo soportado por un 100% de valor de *bootstrap* y comprendió todos los aislamientos europeos con excepción del aislamiento 75 de Letonia, que se ubicó en una rama individual. Similarmente, el aislamiento R25 de la Unión (Antioquia), secuenciado en este estudio se ubicó en posición basal del

dendrograma en una rama individual (Figura 11). Una topología similar fue obtenida cuando se realizó el análisis filogenético a partir de secuencias de aa, aunque el clado presentó un menor soporte de *bootstrap* (64%) (Figura 12). Al comparar los niveles de identidad de la región bajo análisis; se encontró que todos los aislamientos compartieron niveles superiores al 97% tanto para nt como para aa (tabla 2), siendo muy baja ( $d=0,0122$ , SD: 0,0014) la distancia genética calculada para toda la población.

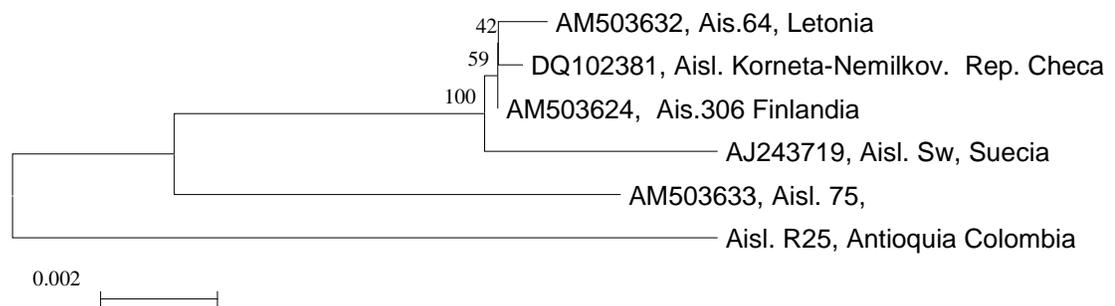


Figura 11. Árbol filogenético basado en una secuencia de 2394 nt del RNA2 de PMTV, del aislamiento R25 de Colombia y de otras cepas de diferentes países. Los valores de *Bootstrap* se indican sobre las ramas.

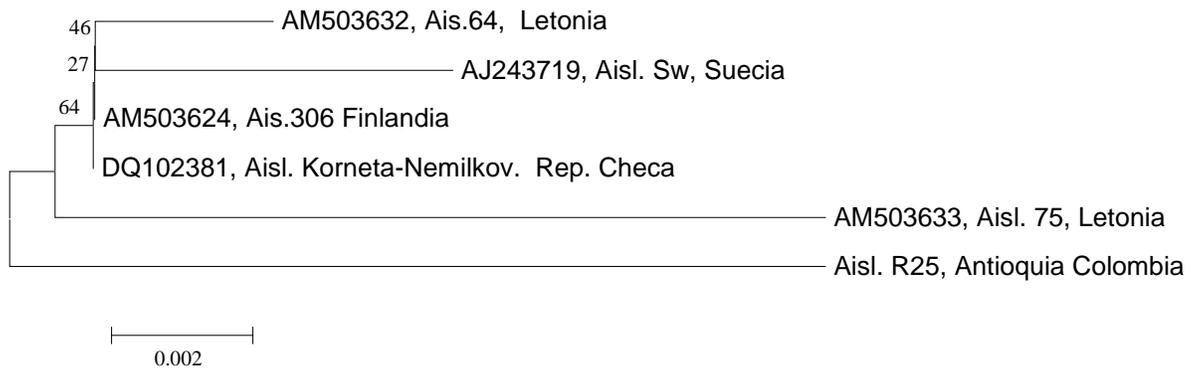


Figura 12. Árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos del RNA2 de PMTV, del aislamiento R25 de Colombia y de otras cepas de diferentes países. Los valores de *Bootstrap* se indican sobre las ramas.

Tabla 2. Matriz de identidad para nucleótidos (Arriba) y aminoácidos (Abajo) del RNA2 de PMTV secuenciado para la cepa R25 de Colombia y otras cepas de diferentes países.

Nucleótidos	Col	Letonia <sup>1</sup>	Finlandia	Letonia <sup>2</sup>	Rep. Cz	Suecia
Col	ID					
Letonia <sup>1</sup>	0,979	ID				
Finlandia	0,98	0,999	ID			
Letonia <sup>2</sup>	0,978	0,986	0,987	ID		
Rep. Cz	0,979	0,998	0,999	0,986	ID	
Suecia	0,976	0,994	0,995	0,983	0,995	ID
Aminoácidos	Col	Letonia <sup>1</sup>	Finlandia	Letonia <sup>2</sup>	Rep. Cz	Suecia
Col	ID					
Letonia <sup>1</sup>	0,984	ID				
Finlandia	0,987	0,997	ID			

Letonia <sup>2</sup>	0,977	0,986	0,988	ID		
Rep. Cz	0,987	0,997	1	0,988	ID	
Suecia	0,982	0,992	0,994	0,983	0,994	ID

---

Números de accession: Col: R25 Antioquia, Colombia; Letonia<sup>1</sup>: AM503632 Aisl. 64; Finlandia: AM503624 Aisl. 306; Letonia<sup>2</sup>: AM503633 Aisl. 75; Rep. Cz (República Checa): DQ102381 Aisl. Korneta-Nemilkov. Suecia: AJ243719 Aisl. Sw

A pesar de los altos niveles de identidad en la secuencia de aa de las regiones codificantes del RNA2, se encontró un total de 24 sitios variables e interesantemente sólo se presentaron en el dominio RT de la región secuenciada, pero no en la región CP. Nueve de estos sitios variables correspondieron a sustituciones de aa sólo presentes en la cepa R25 de la Unión (Antioquia) y se indican a continuación con respecto a las posiciones de la secuencia de referencia de la cepa PMTV-Sw (AJ243719, Sandgren et al., 2001): K194E, S276R, V330M, T484S, E509G, S708P, R747S, S790G y G792V (Figura 13).

```

Col      V R K F I S Y D Q F S A Q L R N W R E A R L N I I E H A T S V L S Q V S N L G R T H F Y S R T E R F G G S S L V G D K L Y V C L N E T R M K T A L N N I I V A L
Latvia1 . . . . .
Finlandia . . . . .
Latvia2 . . . . .
CzRep    . . . . .
Sw       . . . . .
Col      Q T V N G E G R A R R L G P R E A S A N T G G E D S A L N V A H Q L A E V D D L L T D E S F L R E A V F T Q D K Y E L V N G L R W A G A * Q L T A Q A F W F D V
Latvia1 . . . . .
Finlandia . . . . .
Latvia2 . . . . .
CzRep    . . . . .
Sw       . . . . .
Sw       . . . . .
Col      N A A I D K I D N R L L A A A A L R L L P G Q A N H V D G L V S I N Y A Q L D R A L S V V G G N I L P Q T L E I T R D E R K R Q L P E V R V I D G E R V T I R N
Latvia1 . . . . . E . . . . . V . . . . .
Finlandia . . . . . E . . . . .
Latvia2 . . . . . E . . . . . H . . . . .
CzRep    . . . . . E . . . . .
Sw       . . . . . E . . . . .
Col      K D E A T V I S N H G Q G L P W L A F L L L L S V V V V Y S T I Y L N D W L Y R L S V V R H G K P G G G A A R K L S G V S D W L C S R L R A R G A L N V N R
Latvia1 . . . . . R . . . . . M . . . . .
Finlandia . . . . . R . . . . . M . . . . .
Latvia2 . . . . . R . . . . . M . . . . . S . . . . .
CzRep    . . . . . R . . . . . M . . . . .
Sw       . . . . . R . . . . . M . . . . .
Col      M R K K Q A C D P S P T G L R K F L T C Y N F S Y E L W D P T G S Y D D A Q R R I I A E Q N S F V E A V R A I D E G D R E L A E A C L T N V R R I L R R H L N Y
Latvia1 . . . . .
Finlandia . . . . .
Latvia2 . . . . .
CzRep    . . . . .
Sw       . . . . .
Col      R P D Y F D I I E A K A V Y L V T V L T N A M S G P V V G V D D D E R R A V V A A F N P S D C G L P N L D S C T L D E I K N F D L S E V V I G E G T N V E Q A R
Latvia1 . . . . . S . . . . .
Finlandia . . . . . S . . . . .
Latvia2 . . . . . S . . . . . A . . . . .
CzRep    . . . . . S . . . . .
Sw       . . . . . S . . . . .
Col      E Y L N L C R N I Q C M I E T I G T V Q F L G V L S S Y T G P Q Y P C I S Q A F A E D K R I R K E R L K D K D N I T T A D I I A Y L V S G V M A A Y A L V A V S
Latvia1 . . . . . G . . . . . K . . . . .
Finlandia . . . . . G . . . . .
Latvia2 . . . . . G . . . . .
CzRep    . . . . . G . . . . .
Sw       . . . . . G . . . . . V . . . . .
Col      K G G I T L F K F M K N Y A G G G D G P G S S R R I R Q L E A A L P S L P Q P E E L T M M E R L R R L Q S S D N D L A L R R N P S D M L S Q V V R D V V A D V
Latvia1 . . . . .
Finlandia . . . . .
Latvia2 . . . . . H . . . . . V . . . . . V . . . . .
CzRep    . . . . .
Sw       . . . . . R . . . . . P . . . . .
Col      D S S D I A E F L N D P A R M T E A A L E N R L T R I M S A E G S P V D V I E S G G Q E L I S M Q V H G E S L T V I N A G T D S P T V I R S A S L S T R H R R S
Latvia1 . . . . . I . . . . . P . . . . . S . . . . .
Finlandia . . . . . I . . . . . P . . . . . S . . . . .
Latvia2 . . . . . L G A . . . . . P . . . . . S . . . . .
CzRep    . . . . . I . . . . . P . . . . . S . . . . .
Sw       . . . . . S . . . . . I . . . . . P . . . . . S . . . . .
Col      G I E I G S F A V D K V L P Y E V E G E N D D H G D A G K K P T V A Q A L M I G G S A G K G Q G N L G V T N G K E L L K V L G S S R S I G K M S G K M A V *
Latvia1 . . . . . G . V . . . . .
Finlandia . . . . . G . V . . . . .
Latvia2 . . . . . G . V . . . . .
CzRep    . . . . . G . V . . . . .
Sw       . . . . . G . V . . . . .

```

Figura 13. Sitios variables en las secuencias de aminoácidos del gen CP-RT del RNA2 de PMTV. Col: R25 Antioquia, Colombia; Letonia<sup>1</sup>: AM503632 Aisl. 64; Finlandia: AM503624 Aisl. 306; Letonia<sup>2</sup>: AM503633 Aisl. 75; Rep. Cz (República Checa): DQ102381 Aisl. Korneta-Nemilkov. Suecia: AJ243719 Aisl. Sw. Las flechas indican los sitios variables.

## 6.2 Clonación del dominio RT del RNA2 de PMTV

Con el fin de obtener clones conteniendo fragmentos del dominio RT del RNA2 de PMTV, se diseñaron un par de cebadores que flanqueaban este dominio. En la Figura 14 se presenta un esquema de las zonas que se utilizaron para el diseño de los cebadores así como de sus secuencias, que incluyeron regiones blanco para la restricción con las enzimas *SacI* para el cebador *Forward* y *PstI* para el *Reverse*.

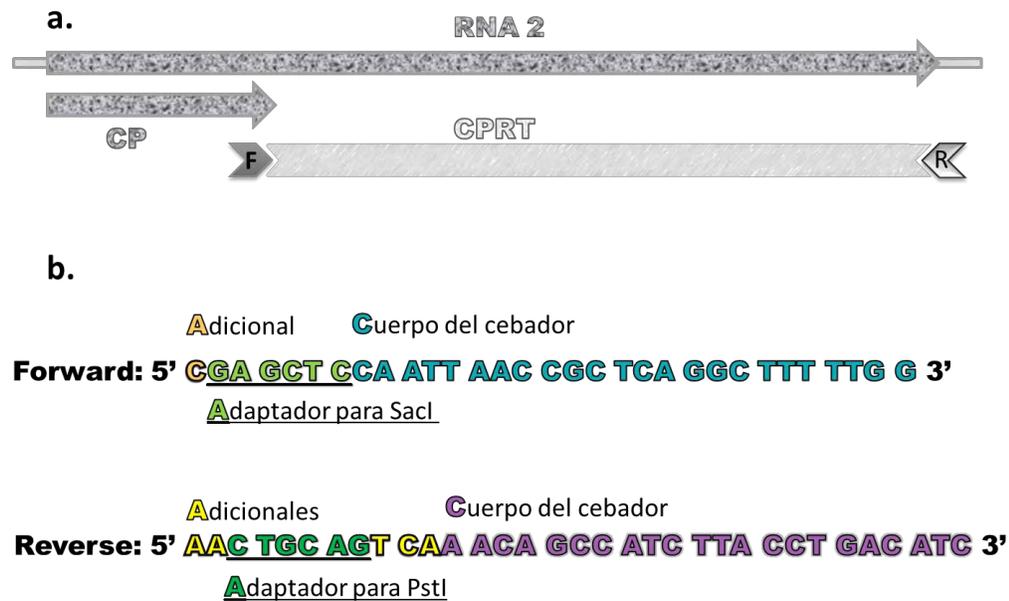


Figura 14. Esquema de los cebadores diseñados para el gen CP-RT de PMTV. a. contextualización de la organización del segmento de RNA2 de PMTV, los cheurones indican la posición de los cebadores diseñados. b. Esquema del diseño de los cebadores *Forward* y *Reverse* indicando los nucleótidos extras en el extremo 5' y adaptadores para las enzimas de restricción *SacI* y *PstI*.

La confirmación de la utilidad de los cebadores se realizó con las cepas de PMTV R25 utilizada para su diseño, además de la cepa Mad, obtenida en cultivos de papa de Madrid (Cundinamarca) por Gil *et al.* (2011). Luego de varios procesos de estandarización que incluyeron el ajuste de las condiciones de anillamiento y extensión de los cebadores (de 62°C por 40 seg y de 72°C por 1min y 30seg para anillamiento y extensión respectivamente) y de las concentraciones de DNA (diluciones 1:5), se logró obtener los fragmentos del tamaño esperado de 1944 pb, aunque con algunas inespecificidades asociadas (Figura 15). Por lo anterior, para la secuenciación confirmatoria de este dominio se recurrió a realizar purificaciones del fragmento directamente desde gel, lográndose obtener secuencias de un total de 928 pb de la región 5' de RT cuando se secuenció a partir de la extensión del cebador CPRTF\_SacI y 805 pb del extremo 3' de este dominio con el cebador CPRTR\_PstI. El análisis de identidad de ambas secuencias, indicó valores superiores al 95% con respecto a un amplio número de cepas de PMTV de referencia internacional. El nivel de identidad de la secuencia utilizada como grupo externo de análisis (*Beet soil-borne virus* - BSBV) con relación a las demás cepas fue inferior al 55% (Tabla 3 y 4).

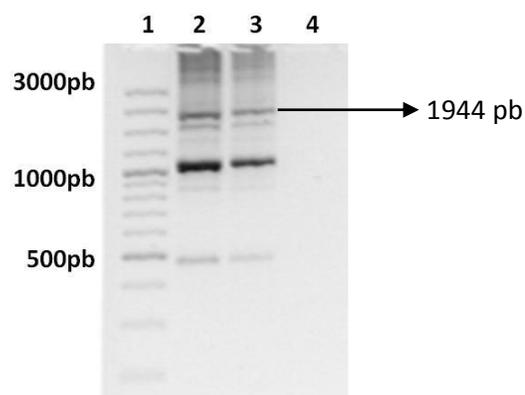


Figura 15. Amplicones obtenidos con los cebadores CPRTF\_SacI y CPRTR\_PstI (1944 pb) a partir de tejido de raíz de plantas de *N. benthamiana* cultivadas en suelos infestados con *S. subterranea* 1: Marcador 100pb plus, 2: Mad, 3: R25, 4: Control negativo.

Tabla 3. Matriz de identidad de un fragmento de la región 5' de CP-RT a partir de secuencias obtenidas con el cebador CPRT\_SacI relacionados con aislamientos de diferentes orígenes geográficos.

Nucleótidos	Jap	Finl 1	Finl 2	Finl 3	Finl 4	Denk	Sw 1	Sw 2	CzRep	MA119 5'	MA120	BSBV
Jap*	ID	0,968	0,976	0,966	0,968	0,968	0,967	0,967	0,966	0,952	0,964	0,511
Finl 1	0,968	ID	0,988	0,997	1	0,997	0,996	0,996	0,997	0,972	0,984	0,517
Finl 2	0,976	0,988	ID	0,985	0,988	0,985	0,986	0,986	0,985	0,968	0,98	0,514
Finl 3	0,966	0,997	0,985	ID	0,997	0,997	0,996	0,996	0,997	0,97	0,982	0,516
Finl 4	0,968	1	0,988	0,997	ID	0,997	0,996	0,996	0,997	0,972	0,984	0,517
Denk	0,968	0,997	0,985	0,997	0,997	ID	0,996	0,996	0,997	0,97	0,982	0,516
Sw 1	0,967	0,996	0,986	0,996	0,996	0,996	ID	1	0,996	0,97	0,982	0,513
Sw 2	0,967	0,996	0,986	0,996	0,996	0,996	1	ID	0,996	0,97	0,982	0,513
CzRep	0,966	0,997	0,985	0,997	0,997	0,997	0,996	0,996	ID	0,97	0,982	0,514
MA119 5' **	0,952	0,972	0,968	0,97	0,972	0,97	0,97	0,97	0,97	ID	0,988	0,504
MA120	0,964	0,984	0,98	0,982	0,984	0,982	0,982	0,982	0,982	0,988	ID	0,511
BSBV	0,511	0,517	0,514	0,516	0,517	0,516	0,513	0,513	0,514	0,504	0,511	ID

\* Números de accesoión: Jap: D16193; Finl 1: AM503626; Finl2:AM503631; Finl3: AM503632; Finl4: AM503611; Denk:AY196094; Sw1: NC\_003724; Sw2:AJ243719; CzRep1:DQ102381; BSBV-Ch: EU785967. \*\*MA119: secuencia obtenida en el estudio.

Tabla 4. Matriz de identidad de un fragmento de la región 5' de CPRT a partir de una secuencia obtenida con el cebador CPRT\_PstI relacionada con aislamientos de diferentes orígenes geográficos.

Nucleótidos	Col	Finl 5	Finl 1	Finl 2	Finl 3	Finl 4	Denk	Sw1	Sw2	CzRep	MA119 3'	BSBV
Col*	ID	0,972	0,966	0,961	0,965	0,966	0,966	0,969	0,969	0,966	0,954	0,451
Finl 5	0,972	ID	0,985	0,971	0,985	0,986	0,983	0,978	0,978	0,986	0,946	0,447
Finl 1	0,966	0,985	ID	0,983	0,997	0,998	0,996	0,991	0,991	0,998	0,96	0,451
Finl 2	0,961	0,971	0,983	ID	0,983	0,985	0,982	0,977	0,977	0,985	0,96	0,454
Finl 3	0,965	0,985	0,997	0,983	ID	0,998	0,996	0,991	0,991	0,998	0,959	0,451
Finl 4	0,966	0,986	0,998	0,985	0,998	ID	0,997	0,992	0,992	1	0,96	0,451
Denk	0,966	0,983	0,996	0,982	0,996	0,997	ID	0,992	0,992	0,997	0,957	0,451
Sw1	0,969	0,978	0,991	0,977	0,991	0,992	0,992	ID	1	0,992	0,952	0,453
Sw2	0,969	0,978	0,991	0,977	0,991	0,992	0,992	1	ID	0,992	0,952	0,453
CzRep	0,966	0,986	0,998	0,985	0,998	1	0,997	0,992	0,992	ID	0,96	0,451
MA119 3'***	0,954	0,946	0,96	0,96	0,959	0,96	0,957	0,952	0,952	0,96	ID	0,445
BSBV	0,451	0,447	0,451	0,454	0,451	0,451	0,451	0,453	0,453	0,451	0,445	ID

\*Números de accesoión: Col: HQ285252; Finl 5: FM205706; Finl 1: AM503626; Finl2:AM503631; Finl3: AM503632; Finl4: AM503611; Denk: AY196094; Sw1: NC\_003724; Sw2:AJ243719 Can: AY327117; CzRep1: DQ102381; BSBV-Ch: EU785967. \*\*MA119: secuencia obtenida en el estudio.

Una vez verificada la identidad viral del amplicon obtenido, se procedió a su clonación en en el vector pQE80L, usando los sitios de restricción de *SacI* y *PstI*, obteniéndose dos colonias recombinantes después de realizar varios intentos de clonación. Las colonias se denominaron CPRTpQE80L1 y CPRTpQE80L2 y se confirmó la naturaleza del inserto mediante PCR de colonias y posterior secuenciación (Figura 30).

Una vez secuenciados dichos clones, nuevamente se confirmó que el inserto correspondió a un segmento del dominio RT de CP-RT de PMTV (Tabla 5) y que la secuencia de la cepa colombiana R25 compartía muy altos niveles de identidad

(>98%) con respecto a aislamientos de diferentes orígenes geográficos. El nivel de identidad de la secuencia utilizada como grupo externo de análisis (BSBV) con relación a las demás cepas fue inferior al 55% (Tabla 6).

Tabla 5. Resultados del análisis BLAST para el segmento de CP-RT de PMTV clonado en pQE80L.

Aislamiento	Primer resultado (Hit) en BLASTn	Número accesión	Tamaño del fragmento (pb)	%Identidad	Valor e	Cobertura
Nov193	Potato mop-top virus	<a href="#">HQ285251.1</a>	459	97%	0,000	99%
Nov194	Potato mop-top virus	<a href="#">HQ285251.1</a>	464	96%	0,000	100%
Nov195	Potato mop-top virus	<a href="#">HQ285251.1</a>	470	96%	0,000	100%
Nov197	Potato mop-top virus	<a href="#">HQ285251.1</a>	470	96%	0,000	100%
Nov198	Potato mop-top virus	<a href="#">HQ285251.1</a>	470	96%	0,000	100%
Nov199	Potato mop-top virus	<a href="#">HQ285251.1</a>	489	96%	0,000	95%

Tabla 6. Matriz de identidad de un fragmento de la región CP-RT clonado en el vector pQE80L relacionados con aislamientos de diferentes orígenes geográficos

Seq	Sw1	Finl1	Finl2	Finl3	Finl4	Finl5	CzRep	Sw2	Denk1	Denk2	Finl6	Col	Finl7	Finl8	Jap	NOV193	NOV195	NOV194	NOV197	NOV198	NOV199	BSBV
Sw1	ID	0,964	0,982	0,993	0,995	0,993	0,995	1	0,993	0,995	0,995	0,993	0,995	0,995	0,971	0,962	0,96	0,962	0,962	0,962	0,962	0,548
Finl1	0,964	ID	0,977	0,962	0,964	0,962	0,964	0,964	0,962	0,964	0,957	0,964	0,964	0,971	0,94	0,937	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,54
Finl2	0,982	0,977	ID	0,98	0,982	0,98	0,982	0,982	0,98	0,982	0,982	0,975	0,982	0,984	0,957	0,955	0,957	0,957	0,957	0,957	0,957	0,546
Finl3	0,993	0,962	0,98	ID	0,997	0,995	0,997	0,993	0,995	0,997	0,997	0,988	0,997	0,968	0,962	0,96	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,548
Finl4	0,995	0,964	0,982	0,997	ID	0,997	1	0,995	0,997	1	0,991	1	1	0,971	0,964	0,962	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,548
Finl5	0,993	0,962	0,98	0,995	0,997	ID	0,997	0,993	0,995	0,997	0,997	0,988	0,997	0,968	0,962	0,96	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,548
CzRep	0,995	0,964	0,982	0,997	1	0,997	ID	0,995	0,997	1	0,991	1	1	0,971	0,964	0,962	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,548
Sw2	1	0,964	0,982	0,993	0,995	0,993	0,995	ID	0,993	0,995	0,995	0,993	0,995	0,995	0,971	0,962	0,96	0,962	0,962	0,962	0,962	0,548
Denk1	0,993	0,962	0,98	0,995	0,997	0,995	0,997	0,993	ID	0,997	0,997	0,988	0,997	0,968	0,962	0,96	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,548
Denk2	0,995	0,964	0,982	0,997	1	0,997	1	0,995	0,997	ID	1	0,991	1	0,971	0,964	0,962	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,548
Finl6	0,995	0,964	0,982	0,997	1	0,997	1	0,995	0,997	1	ID	0,991	1	0,971	0,964	0,962	0,964	0,964	0,964	0,964	0,964	0,548
Col	0,993	0,957	0,975	0,988	0,991	0,988	0,991	0,993	0,988	0,991	0,991	ID	0,991	0,991	0,964	0,968	0,966	0,968	0,968	0,968	0,968	0,544
Finl7	0,995	0,964	0,982	0,997	1	0,997	1	0,995	0,997	1	1	0,991	ID	1	0,971	0,964	0,962	0,964	0,964	0,964	0,964	0,544
Finl8	0,995	0,964	0,982	0,997	1	0,997	1	0,995	0,997	1	1	0,991	1	ID	0,971	0,964	0,962	0,964	0,964	0,964	0,964	0,544
Jap	0,971	0,971	0,984	0,968	0,971	0,968	0,971	0,971	0,968	0,971	0,971	0,964	0,964	0,971	ID	0,946	0,944	0,946	0,946	0,946	0,946	0,535
NOV193	0,962	0,94	0,957	0,962	0,964	0,962	0,964	0,962	0,962	0,964	0,964	0,968	0,964	0,964	0,946	ID	0,997	1	1	1	1	0,535
NOV195	0,96	0,937	0,955	0,96	0,962	0,96	0,962	0,96	0,962	0,962	0,962	0,966	0,962	0,944	0,997	ID	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,533
NOV194	0,962	0,94	0,957	0,962	0,964	0,962	0,964	0,962	0,962	0,964	0,964	0,968	0,964	0,946	1	0,997	ID	1	1	1	1	0,535
NOV197	0,962	0,94	0,957	0,962	0,964	0,962	0,964	0,962	0,962	0,964	0,964	0,968	0,964	0,946	1	0,997	1	ID	1	1	1	0,535
NOV198	0,962	0,94	0,957	0,962	0,964	0,962	0,964	0,962	0,962	0,964	0,964	0,968	0,964	0,946	1	0,997	1	1	ID	1	1	0,535
NOV199	0,962	0,94	0,957	0,962	0,964	0,962	0,964	0,962	0,962	0,964	0,964	0,968	0,964	0,946	1	0,997	1	1	1	ID	ID	0,535
BSBV	0,548	0,54	0,546	0,553	0,553	0,555	0,553	0,548	0,551	0,553	0,553	0,544	0,553	0,544	0,535	0,533	0,533	0,535	0,535	0,535	0,535	ID

Sw1:NC\_003724.1; Finl 1:AM503617.2; Finl 2:AM503631.1; Finl 3: AM503632.1; Finl 4: AM503626.1; Finl 5: AM503623.1; CzRep: DQ102381.1; Sw2:AJ243719.1; Denk 1:AF487407.4; Denk 2:AY196094.2; Finl 6:AM503611.1; Col:HQ285251.1; Finl 7:AM503629.1; Finl 8:AM503627.1; Jap:D16193.1; BSBV:EU785967.1

### 7.3 Producción de péptidos y anticuerpos específicos para el dominio RT del RNA2 del PMTV

La búsqueda de regiones antigénicas se basó en el modelo teórico de Hopp y Woods (1981), que sugiere que epítopes antigénicos pueden ser localizados a partir del c de la estructura primaria de las proteínas. En la Figura 16 se presenta este análisis de las secuencias de CP-RT para diferentes virus transmitidos por protozoos y hongos del suelo, incluyendo a PMTV y en la Figura 17 se observa el resultado de las comparaciones de hidrofiliidad para aislamientos de PMTV de diferentes regiones geográficas, incluyendo la secuencia obtenida en este estudio para el aislamiento R25 de La Unión (Antioquia). Estos resultados indicaron que la región con mayor variabilidad entre las secuencias de CP-RT de los virus bajo análisis, correspondió a la máxima escala de hidrofiliidad; además esta región se presenta como altamente conservada entre aislamientos de PMTV, por lo cual fue seleccionada para el diseño del péptido: EDKRIRKERLKDKDN (Anexo 9).

Los anticuerpos fueron producidos en dos conejos utilizando el péptido sintético con adyuvante de Freund completo (1:1). Se realizó una inoculación primaria con 0,5 mg de péptido conjugado por conejo y tres refuerzos con igual cantidad de antígeno a los días 14, 35 y 56. Los anticuerpos fueron purificados por afinidad y resuspendidos en PBS pH 7.4, obteniéndose 19,26 mg de anticuerpos policlonales y sus diluciones presentaron un título inferior a 1:256.000 en pruebas de ELISA indirecto (Tabla 7) y de 1:8500 en *dot-blot* (Figura 18). Las pruebas de límite de detección realizadas mediante *dot-blot* y ELISA indirecto, determinaron como

concentración mínima de péptido detectable  $5 \mu\text{M}$  (Figura 19) y  $5 \times 10^{-6} \mu\text{M}$  (Tabla 8), respectivamente. Esto indica que el límite de detección de ELISA con los anticuerpos obtenidos en este estudio equivale a una sensibilidad de  $1 \times 10^7$  veces mayor que la prueba de *dot-blot*, por lo que se determinó la primera prueba como la más conveniente para los análisis posteriores.

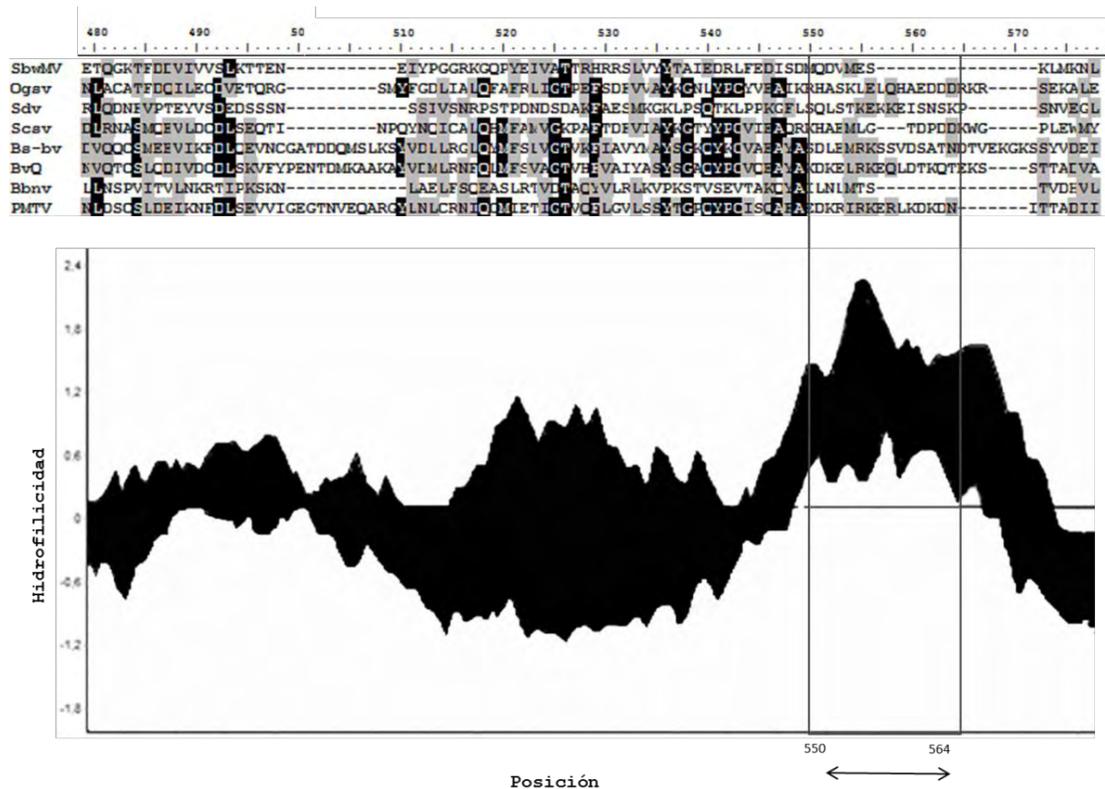


Figura 16. Análisis de la región C-terminal de la proteína CP-RT de PMTV y otros virus transmitidos por protozoos y hongos del suelo. El recuadro indica la secuencia de aminoácidos con el máximo perfil de hidrofiliidad y con alta variabilidad entre secuencias. SbwMV: *Soil-borne wheat mosaic virus*, Ogsv: *Oat golden stripe virus*, Sdv: *Soybean dwarf virus*, Scsv: *Sorghum chlorotic spot virus*,

Bs-bv: *Beet soil-borne virus*, BvQ: *Beet virus Q*, PMTV: *Potato mop top Virus*. La escala está referida a las posiciones de la proteína CP-RT.

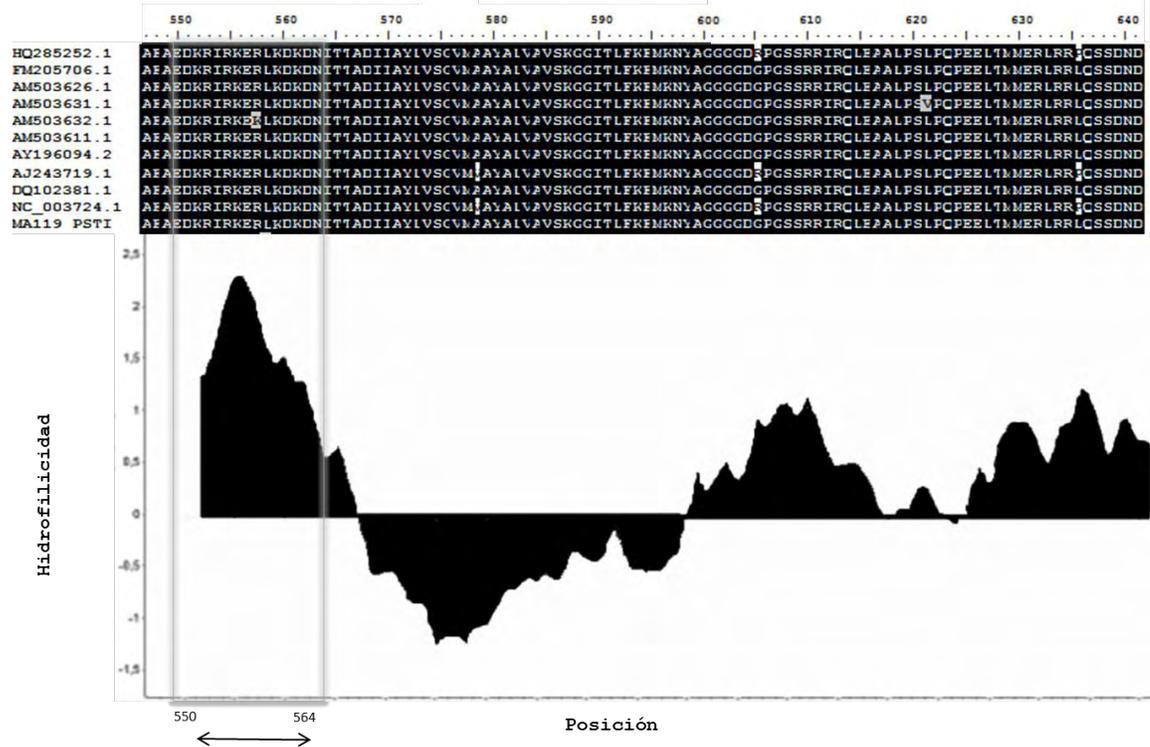


Figura 17. Análisis de la región C-terminal de la proteína CP-RT de diferentes aislamientos de PMTV. El recuadro indica la secuencia de aminoácidos con el máximo perfil de hidrofiliidad y baja variabilidad entre secuencias. HQ285252: Colombia, FM205706: Finlandia, AM503626: Finlandia, AM503631: Finlandia, AM503632: Finlandia, AM503611: Finlandia, AY196094: Dinamarca, NC\_003724: Suecia, AJ243719: Suecia, DQ102381: República Checa, MA119\_PST1: aislamiento R25, Colombia. La escala está referida a las posiciones de la proteína CP-RT.

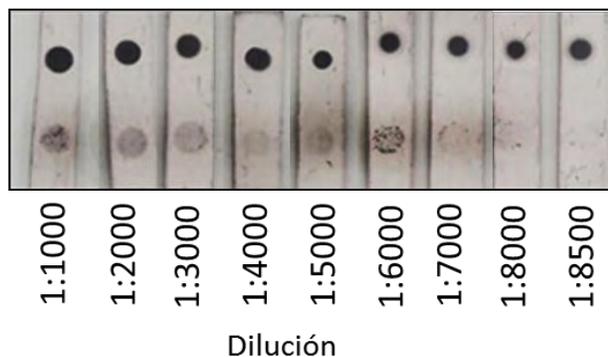


Figura 18. Detección de CP-RT de PMTV a partir de diluciones de Anti\_CP\_RT en pruebas *dot-blot*.

Tabla 7. Resultados de ELISA indirecto utilizando diluciones de Anti\_CP\_RT de PMTV para detectar Pep\_CP\_RT.

Dilución de anticuerpo	A <sub>450</sub> (nm) Anti_CP_RT	Resultado
1:1000	2.693	+
1:2000	2.586	+
1:4000	2.447	+
1:8000	2.063	+
1:16000	1.641	+
1:32000	1.226	+
1:64000	0.727	+
1:128000	0.448	+
1:256000	0.279	+
1:512000	0.164	-
Blanco	0.088	-
Blanco	0.084	-

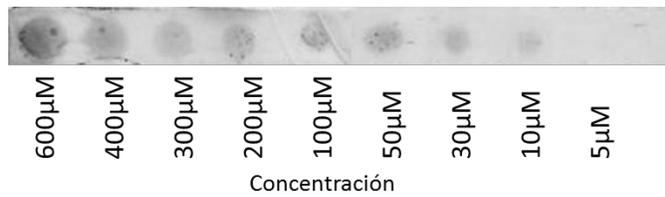


Figura 19. Límites de detección de CP-RT de PMTV, a partir del uso de los anticuerpos Anti\_CP\_RT en pruebas *dot-blot*, utilizando diferentes concentraciones del Pep\_CP\_RT.

Tabla 8. Límites de detección de la proteína CP-RT de PMTV, a partir del uso de los anticuerpos Anti\_CP\_RT en pruebas ELISA indirecto, utilizando diferentes concentraciones del Pep\_CP\_RT.

Concentración de péptido	A <sub>450</sub> (nm) Anti_CP_RT	Resultado
Buffer PBS (C-)	0,135	-
Blanco	0,133	-
1x10 <sup>3</sup> µM	1,059	+
5x10 <sup>-2</sup> µM	1,005	+
5x10 <sup>-3</sup> µM	1,035	+
5x10 <sup>-4</sup> µM	1,016	+
5x10 <sup>-5</sup> µM	0,436	+
5x10 <sup>-6</sup> µM	0,461	+
5x10 <sup>-7</sup> µM	0,27	-

#### 6.4 Detección de PMTV mediante ELISA indirecto

La utilidad de los nuevos anticuerpos fue evaluada inicialmente a partir de muestras de raíz y tejido foliar de plantas señuelo de *N. benthamiana* inoculadas con quistosoros de Sss provenientes de cultivos de papa de Antioquia, Cundinamarca, Boyacá y Nariño. Del total de 42 muestras foliares evaluadas, nueve (21,4%) resultaron positivas en las pruebas de ELISA indirecto utilizando los anticuerpos Anti\_CP\_RT, mientras que este porcentaje fue de 22,7% (10 muestras) cuando se analizaron 44 muestras radiculares. Los valores de absorbancia obtenidos para muestras positivas foliares se presentaron en el rango de 0,427 a 1,437; mientras que para la muestras de raíces, dicho rango varió de 0,425 a 0,953. Los controles negativos presentaron una absorbancia promedio de 0,215 y 0,227 para muestras foliares y de raíz, respectivamente (Tabla 9, Anexo 10).

Tabla 9. Detección de PMTV mediante pruebas de ELISA indirecto en raíces y tejido foliar de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con quistorosos de Sss obtenidos en suelos de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño.

Muestra	Departamento	Tejido	Absorbancia	Resultado
C- PBS*			0,215	Negativo
C- Br*			0,227	Negativo
C+ Pd**			3,34	Positivo

C+ Qs**	Boyacá	Quistosoros	0,458	Positivo
CS1T <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,286	Negativo
CS15T <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,292	Negativo
CS6T <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,244	Negativo
BS3P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,309	Negativo
BS1P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,282	Negativo
CS1Tf	Cundinamarca	Foliar	0,353	Negativo
CS6T <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,418	Negativo
BS8T <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,311	Negativo
BS9T <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,427	Positivo
BS11P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,359	Negativo
S. R Lote 5 <sup>f</sup>	Antioquia	Foliar	0,609	Positivo
S. R Lote 7 <sup>f</sup>	Antioquia	Foliar	1,437	Positivo
S. R Lote 4 <sup>f</sup>	Antioquia	Foliar	0,429	Positivo
NS1P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,323	Negativo
NS2P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,447	Positivo
NS15T <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,3	Negativo
NS12P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,256	Negativo
NS22P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,277	Negativo
NS8P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,331	Negativo
NS23P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,397	Negativo
NS11P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,315	Negativo
NS26P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,255	Negativo
CS1P <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,283	Negativo
CS6P <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,351	Negativo
CS10P <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,255	Negativo
CS2P <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,33	Negativo

NS24P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,482	Positivo
BS2P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,251	Negativo
BS5P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,346	Negativo
BS7P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,311	Negativo
BS12P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,375	Negativo
NS1T <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,471	Positivo
NS25P <sup>f</sup>	Nariño	Foliar	0,269	Negativo
CS2T <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,334	Negativo
36T <sup>f</sup>	Antioquia	Foliar	0,498	Positivo
24T <sup>f</sup>	Antioquia	Foliar	0,251	Negativo
CS5T <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,429	Positivo
BS5T <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,353	Negativo
BS6P <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,253	Negativo
CS16P <sup>f</sup>	Cundinamarca	Foliar	0,339	Negativo
Tunja 1T <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,281	Negativo
Madrid <sup>f</sup>	Boyacá	Foliar	0,407	Negativo
CS15T <sup>f</sup>	Antioquia	Raíz	0,295	Negativo
NS8T <sup>f</sup>	Antioquia	Raíz	0,329	Negativo
CS4T <sup>f</sup>	Antioquia	Raíz	0,267	Negativo
BS1P <sup>f</sup>	Boyacá	Raíz	0,238	Negativo
BS3P <sup>f</sup>	Boyacá	Raíz	0,248	Negativo
BS4T <sup>f</sup>	Boyacá	Raíz	0,337	Negativo
BS4P <sup>f</sup>	Boyacá	Raíz	0,303	Negativo
BS8T <sup>f</sup>	Boyacá	Raíz	0,267	Negativo
BS9T <sup>f</sup>	Boyacá	Raíz	0,189	Negativo
BS11P <sup>f</sup>	Boyacá	Raíz	0,355	Negativo
RValle <sup>f</sup>	Antioquia	Raíz	0,438	Negativo

S. R Lote 5 <sup>r</sup>	Antioquia	Raíz	0,413	Negativo
S. R Lote 7 <sup>r</sup>	Antioquia	Raíz	0,324	Negativo
S. R Lote 4 <sup>r</sup>	Antioquia	Raíz	0,279	Negativo
NS1P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,953	Positivo
NS2P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,407	Negativo
NS15T <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,246	Negativo
Tunja 1T <sup>r</sup>	Boyacá	Raíz	0,397	Negativo
NS12P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,765	Positivo
NS22P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,382	Negativo
NS8P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,558	Positivo
NS23P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,258	Negativo
NS3P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,512	Positivo
NS11P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,241	Negativo
NS26P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,369	Negativo
CS1P <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,303	Negativo
CS6P <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,288	Negativo
CS10P <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,277	Negativo
CS2P <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,28	Negativo
NS24P <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,284	Negativo
BS6P <sup>r</sup>	Boyacá	Raíz	0,263	Negativo
BS5P <sup>r</sup>	Boyacá	Raíz	0,349	Negativo
BS7P <sup>r</sup>	Boyacá	Raíz	0,318	Negativo
BS12P <sup>r</sup>	Boyacá	Raíz	0,465	Positivo
NS20T <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,377	Negativo
NS1T <sup>r</sup>	Nariño	Raíz	0,283	Negativo
CS16T <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,271	Negativo
CS5T <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,303	Negativo

BS13T <sup>r</sup>	Boyacá	Raíz	0,444	Positivo
CS2T <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,561	Positivo
CS12T <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,459	Positivo
CS1T <sup>r</sup>	Cundinamarca	Raíz	0,36	Negativo
36T <sup>r</sup>	Antioquia	Raíz	0,551	Positivo
24T <sup>r</sup>	Antioquia	Raíz	0,425	Positivo

\*C-PBS: Control negativo Buffer de extracción PBS; C-Br: Control negativo Buffer de extracción Bioreba.

\*\*C+Pb: Control positivo péptido sintético Pep\_CP\_RT; C+ Qs: Control positivo quistosoros de Sss purificados.

#### 7.5 Detección de PMTV mediante IC-PCR y RT-PCR

Con el fin de confirmar la efectividad de los anticuerpos obtenidos en la investigación para detectar PMTV, se procedió a evaluar mediante RT-PCR la presencia del virus en un grupo de muestras (17) evaluadas anteriormente en la prueba de ELISA indirecto. Para esto se utilizaron dos juegos de cebadores, unos dirigidos al gen CP del RNA2 y los otros al TGB2 del RNA3. Las reacciones de RT-PCR resultaron en amplificaciones exitosas obteniéndose los fragmentos de ~460pb y ~417pb para CP y TGB, respectivamente (Figuras 20 y 21), aunque evidentemente resultaron más efectivos los cebadores H360 y C819, pues confirmaron la presencia de PMTV en 16 de 17 muestras evaluadas, mientras que PMTVF4 y PMTVR4 sólo detectaron el virus en siete de las muestras (Tabla 10).

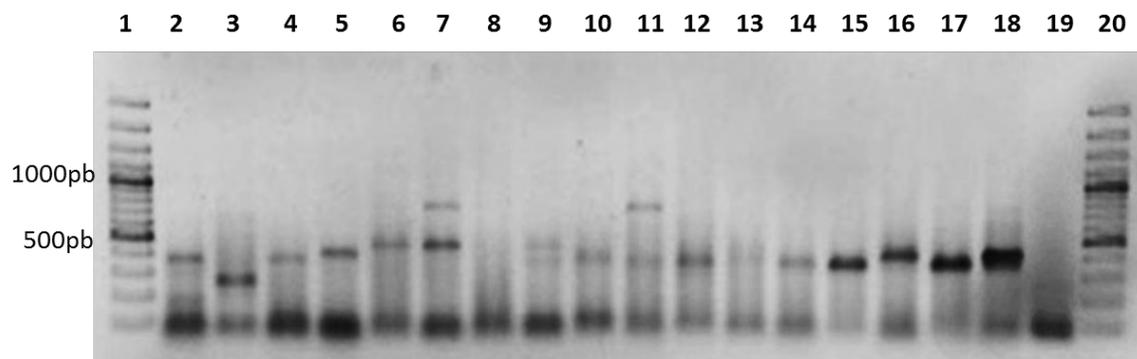


Figura 20. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460 pb) a partir de RT-PCR de PMTV; 1: Marcador 100pb plus, 2:NS23Pr, 3:C6STf, 4:BS11Pf, 5:BS12Pf, 6:NS22Pr, 7:NS20Tr, 8:Tunja1r, 9:CS2Tr, 10:BS12Pr, 11:BS16q, 12: NS12Pf, 13:SRL5f, 14:NS8Pr, 15:SRL7f, 16: SRL4f, 17:NS1Pf, 18: NS12Pr, 19: Control negativo, 20: Marcador 100pb plus.

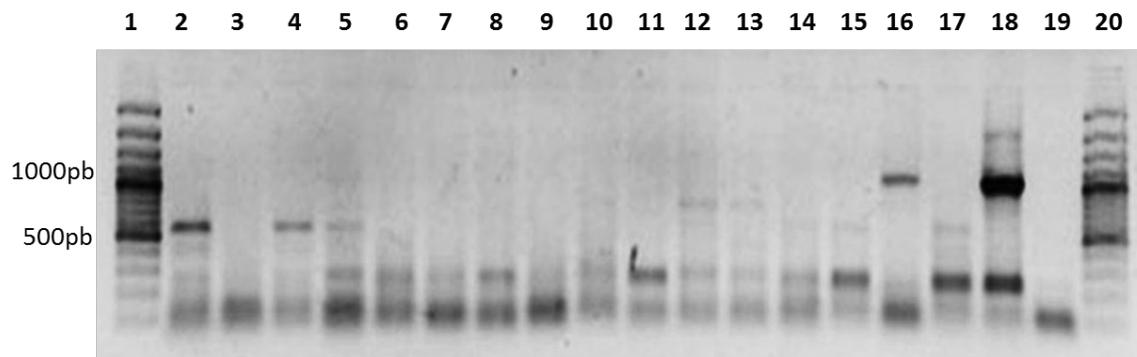


Figura 21. Amplicones obtenidos con los cebadores PMTVF4 y PMTVR4 (~417 pb) a partir de RT-PCR de PMTV; 1: Marcador 100pb plus, 2:NS23Pr, 3:C6STf, 4:BS11Pf, 5:BS12Pf, 6:NS22Pr, 7:NS20Tr, 8:Tunja1r, 9:CS2Tr, 10:BS12Pr, 11:BS16q, 12: NS12Pr, 13:SRL5, 14:NS8Pr, 15:SRL7, 16: SRL4, 17:NS1Pf, 18: NS12Pr, 19: Control negativo, 20: Marcador 100pb plus.

Por otra parte el ensayo de IC-RT-PCR desarrollado a partir de 9 muestras positivas en el ELISA indirecto, permitió confirmar la presencia en seis de las

muestras, al obtener los amplicones de ~460 pb utilizando los cebadores H360 y C819 dirigidos al gen CP (Figura 22).

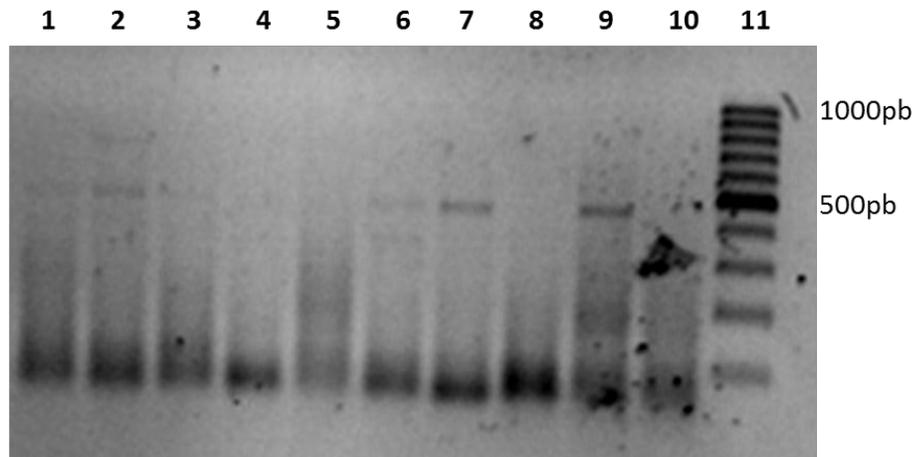


Figura 22. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460 pb) a partir de IC-RT-PCR de PMTV 1: NSP1r, 2: NS12Pr, 3: SRL7f, 4: SRL4f, 5: BS16Pq, 6: SRL5f, 7: BS12Pr, 8: NS3Pr, 9: NS8Pr, 10: Control negativo, 11: Marcador 100pb.

Tabla 10. Detección del virus PMTV en muestras de tejido foliar y de raíz de *S. tuberosum* y plantas de *N. benthamiana* sembradas en turba inoculada con *S. subterranea*, empleando metodologías serológicas y moleculares (ELISA, IC-PCR y RT-PCR).

Muestra	ELISA	RT-PCR		IC-PCR
		CP TGB	CP	
NS1Pr	+	NE	NE	+
NS12Pr	+	+	-	+

NS8Pr	+	+	+	+
BS12Pr	+	+	+	+
Quistosoro	+	+	-	-
S. R Lote 5f	-	+	+	+
S. R Lote 7f	-	+	-	+
S. R Lote 4f	-	+	-	-
NS3Pr	+	NE	NE	-
NS20Tr	-	+	-	NE
NS22Pr	-	+	-	NE
CS2Tr	+	+	-	NE
Tunja1Tr	-	-	-	NE
NS23Pr	-	+	+	NE
NS1Pf	-	+	+	NE
BS12Pf	-	+	+	NE
CS6Tf	-	+	-	NE
BS11Pf	-	+	+	NE
NS12Pf	-	+	NE	NE

---

NE: No evaluada

En los ensayos de ELISA, no fue posible utilizar la proteína del dominio RT expresada en la cepa M15, pues a pesar de que fue detectada en geles SDS-PAGE a partir de la primera hora de inducción con IPTG (Figura 23a), su purificación no resultó exitosa, a pesar de diferentes intentos y cambios en protocolos (Figura 23b). Sin embargo, esta situación fue suplida en la

investigación por el uso del péptido sintético, que representó un excelente control positivo, tal como lo demuestran las altas lecturas de absorbancia ( $> 1$ ) obtenidas en las pruebas de ELISA indirecto.

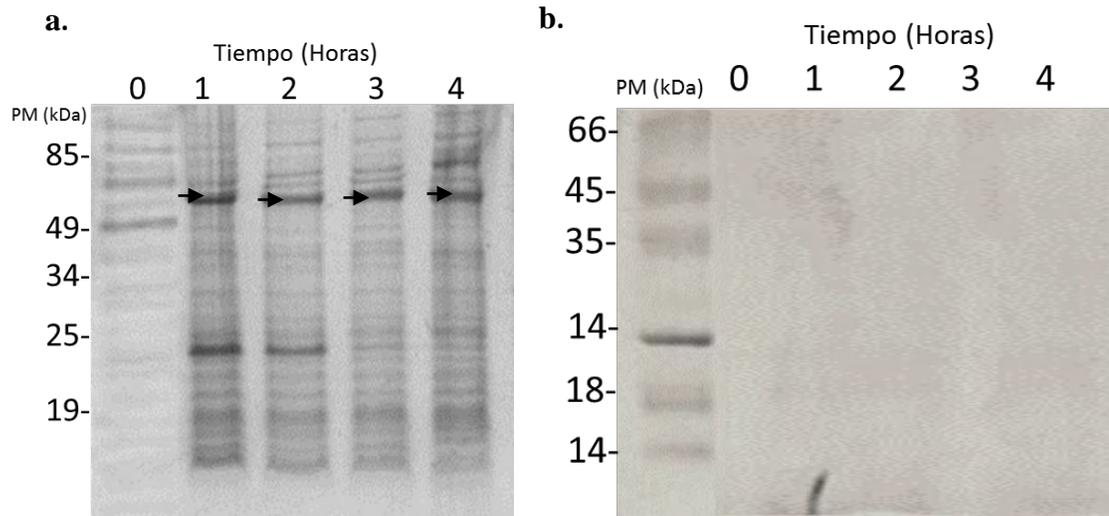


Figura 23. Expresión y purificación de la proteína recombinante del dominio RT de PMTV. a. Perfil de expresión de la proteína recombinante a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas luego de la inducción con IPTG. b. Patrón electroforético de la proteína luego de la purificación. Las flechas indican la banda con el peso molecular esperado de la proteína (74,52 KDa).

## 6.6 Prueba piloto de detección de PMTV en campo

Los lotes seleccionados para el muestreo tenían registros previos de la presencia de Sss y esto se evidenció en las muestras obtenidas, las cuales presentaban síntomas característicos de agallas en las raíces (Figura 24). Los resultados del ELISA indirecto con los anticuerpos obtenidos en el estudio, detectaron la presencia del PMTV en una de las muestras foliares y en 6 de las 12 muestras de raíz obtenidas. Al comparar estos resultados con los registrados cuando se utilizó el kit comercial DAS-ELISA de Bioreba, se encontró que ninguna de las muestras foliares fue detectada como positiva para PMTV, pero sí 10 de las 12 muestras de raíces evaluadas. Los anticuerpos comerciales generaron lecturas de absorbancia en las muestras de papa positivas para PMTV en un rango de 0,353 a 1,072, mientras que con los Anti\_CP\_RT, se obtuvieron absorbancias de 0,316 a 0,967 (Tabla 6). Las reacciones de RT-PCR generaron los amplicones de ~460 pb del gen CP (Figura 25), siendo positivas para PMTV, 11 de las 12 muestras de raíz evaluadas (Tabla 11).



Figura 24. Agallas observadas en algunas de las plantas de papa colectadas en lotes del municipio de La Unión (Antioquia), para el ensayo de prueba piloto de detección de PMTV con Anti\_CP\_RT. Fuente: este estudio.

Tabla 11. Resultados de pruebas de ELISA indirecto para detectar el PMTV con Anti\_CP\_RT, a partir de muestras foliares y radiculares de plantas de papa obtenidas en diferentes lotes de cultivo del municipio de La Unión (Antioquia). La prueba fue comparada con el kit comercial de DAS-ELISA de Bioreba y con RT-PCR con cebadores dirigidos a CP (para muestras de raíz).

Muestra	Absorbancia Pruebas de ELISA			
	Tejido	Kit Comercial	Anti_CP_RT	RT-PCR
C- Br*		0,128	0,168	NE
C-PBS*		0,143	0,227	NE
C+Pd**		NE	1,378 (+)	NE
L1R1†	Raíz	0,467 (+)	0,18 (-)	(+)

L1R2 <sup>r</sup>	Raíz	0,784 (+)	0,206 (-)	(+)
L1R3 <sup>r</sup>	Raíz	1,053 (+)	0,172 (-)	(+)
L2R1 <sup>r</sup>	Raíz	0,172 (-)	0,185 (-)	(-)
L2R2 <sup>r</sup>	Raíz	0,155 (-)	0,152 (-)	(+)
L2R3 <sup>r</sup>	Raíz	0,392 (+)	0,801 (+)	(+)
L3R1 <sup>r</sup>	Raíz	1,018 (+)	0,538 (+)	(+)
L3R2 <sup>r</sup>	Raíz	0,922 (+)	0,428 (+)	(+)
L3R3 <sup>r</sup>	Raíz	1,072 (+)	0,316 (+)	(+)
L4R1 <sup>r</sup>	Raíz	0,903 (+)	0,537 (+)	(+)
L4R2 <sup>r</sup>	Raíz	0,353 (+)	0,967 (+)	(+)
L4R3 <sup>r</sup>	Raíz	1,014 (+)	0,215 (-)	(+)
1S4 <sup>f**</sup>	Foliar	0,137 (-)	0,285 (-)	NE
1S9 <sup>f</sup>	Foliar	0,138 (-)	0,334 (+)	NE
2S3 <sup>f</sup>	Foliar	0,132 (-)	0,226 (-)	NE
2S7 <sup>f</sup>	Foliar	0,132 (-)	0,207 (-)	NE
3S4 <sup>f</sup>	Foliar	0,128 (-)	0,235 (-)	NE
3S5 <sup>f</sup>	Foliar	0,135 (-)	0,212 (-)	NE
4S3 <sup>f</sup>	Foliar	0,121 (-)	0,221 (-)	NE
4S5 <sup>f</sup>	Foliar	0,125 (-)	0,201 (-)	NE

\*C-PBS: Control negativo Buffer de extracción PBS; C-Br: Control negativo Buffer de extracción Bioreba.

\*\*C+Pb: Control positivo péptido sintético Pep\_CP\_RT

NE: No Evaluado.

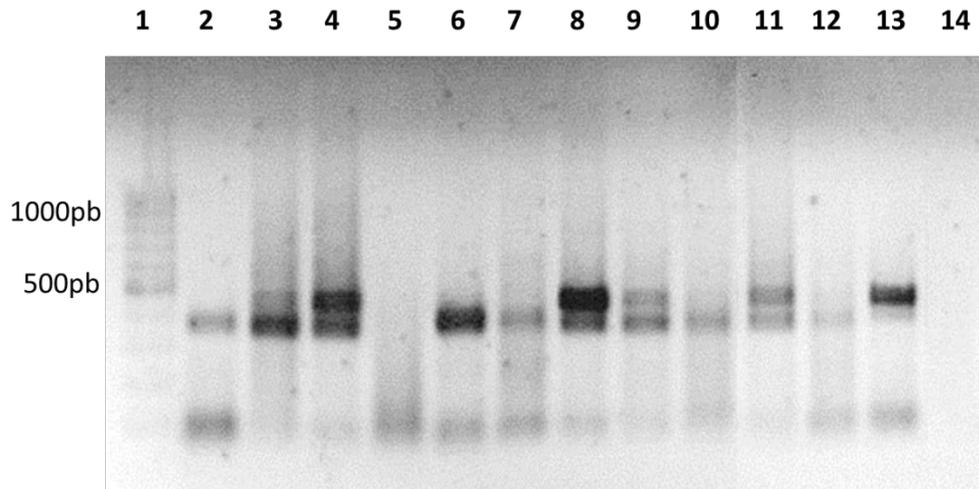


Figura 25. Amplicones obtenidos con los cebadores H360 y C819 (~460pb) a partir de tejido de raíz de plantas de *S. tuberosum*. 1: Marcador 100pb, 2:L1R1, 3:L1R2, 4:L1R3, 5:L2R1, 6: L2R2, 7: L2R3, 8:L3R1, 9:L3R2, 10:L3R3, 11:L4R1, 12:L4R2, 13:L4R3, 14: Control negativo.

Finalmente, dos de los amplicones obtenidos mediante RT-PCR fueron seleccionados al azar, para ser purificados y secuenciados en ambos sentidos con el fin de confirmar su naturaleza viral. El resultado del BLAST, presentó un 99% de identidad entre dichas secuencias con respecto a diferentes aislamientos de PMTV de otros países cuyas secuencias de CP fueron depositadas en GenBank (Tabla 12). Similarmente el análisis de identidad realizado a partir del alineamiento de estas secuencias con respecto a 21 secuencias de referencia de diferentes orígenes geográficos, incluyendo aislamientos de Colombia reportados por Gil *et al.* (2011), indicaron muy alto niveles de identidad para la región estudiada (>98%) (Tabla 13).

Tabla 12. Resultados del análisis BLAST de secuencias parciales del gen CP obtenidos de aislamientos de la Unión, Antioquia.

Aislamiento	Resultado del BLAST	Número accesión	Tamaño del fragmento (pb)	%Identidad	Valor e	%Cobertura
Nov201	Potato mop-top virus	<a href="#">HM776172.1</a>	462	99%	0,000	99%
Nov203	Potato mop-top virus	<a href="#">HM776172.1</a>	461	99%	0,000	99%

El análisis filogenético realizado con las secuencias obtenidas utilizó 431 posiciones, y resultó en un agrupamiento en el que todos los aislamientos de PMTV, incluyendo los dos secuenciados en este estudio, se agruparon en un sólo cluster distantemente relacionado con el grupo externo de análisis (BSBV) (Figura 26).

**Tabla 13.** Matriz de identidad de un fragmento de la región CP de aislamientos de la Unión, Antioquia y de diferentes orígenes geográficos.

Seq	Col1	Finl1	Finl2	EU	Sw1	Finl3	Finl4	Finl5	Finl6	Finl7	Cand	CzRep1	Sw2	Denk1	Thai1	Denk2	Jap	Pol	CzRep2	Denk3	Thai2	NOV121	NOV123	BSBV
Col1	ID	0,988	0,988	0,988	0,99	0,986	0,986	0,988	0,988	0,988	0,988	0,988	0,99	0,983	0,979	0,983	0,983	0,983	0,988	0,986	0,986	0,993	0,99	0,582
Finl1	0,988	ID	1	1	0,997	0,997	0,997	1	1	1	1	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
Finl2	0,988	1	ID	1	0,997	0,997	0,997	1	1	1	1	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
EU	0,988	1	1	ID	0,997	0,997	0,997	1	1	1	1	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
Sw1	0,99	0,997	0,997	0,997	ID	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	1	0,993	0,988	0,993	0,993	0,993	0,997	0,995	0,995	0,993	0,99	0,577
Finl3	0,986	0,997	0,997	0,997	0,995	ID	1	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,995	0,993	0,993	0,993	0,997	0,993	0,997	0,995	1	0,993	0,99	0,58
Finl4	0,986	0,997	0,997	0,997	0,995	1	ID	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,995	0,993	0,993	0,993	0,997	0,993	0,997	0,995	1	0,993	0,99	0,58
Finl5	0,988	1	1	1	0,997	0,997	0,997	ID	1	1	1	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
Finl6	0,988	1	1	1	0,997	0,997	0,997	1	ID	1	1	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
Finl7	0,988	1	1	1	0,997	0,997	0,997	1	1	ID	1	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
Cand	0,988	1	1	1	0,997	0,997	0,997	1	1	1	ID	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
CzRep1	0,988	1	1	1	0,997	0,997	0,997	1	1	1	1	ID	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	1	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
Sw2	0,99	0,997	0,997	0,997	1	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	ID	0,993	0,988	0,993	0,993	0,993	0,997	0,995	0,995	0,993	0,99	0,577
Denk1	0,983	0,995	0,995	0,995	0,993	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,993	ID	0,986	0,99	0,99	0,99	0,995	0,993	0,993	0,99	0,988	0,58
Thai1	0,979	0,99	0,99	0,99	0,988	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,988	0,986	ID	0,986	0,99	0,986	0,99	0,988	0,993	0,986	0,983	0,573
Denk2	0,983	0,995	0,995	0,995	0,993	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,993	0,99	0,986	ID	0,99	0,99	0,995	0,993	0,993	0,99	0,988	0,58
Jap	0,983	0,995	0,995	0,995	0,993	0,997	0,997	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,993	0,99	0,99	ID	0,99	0,995	0,993	0,997	0,99	0,988	0,58	
Pol	0,983	0,995	0,995	0,995	0,993	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,993	0,99	0,986	0,99	ID	0,995	0,993	0,993	0,99	0,988	0,577	
CzRep2	0,988	1	1	1	0,997	0,997	0,997	1	1	1	1	1	0,997	0,995	0,99	0,995	0,995	0,995	ID	0,997	0,997	0,995	0,993	0,58
Denk3	0,986	0,997	0,997	0,997	0,995	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,995	0,993	0,988	0,993	0,993	0,993	0,997	ID	0,995	0,993	0,99	0,577
Thai2	0,986	0,997	0,997	0,997	0,995	1	1	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,995	0,993	0,993	0,993	0,997	0,993	0,997	ID	0,995	0,993	0,99	0,58
NOV121	0,993	0,995	0,995	0,995	0,993	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,993	0,99	0,986	0,99	0,99	0,995	0,993	0,993	ID	0,997	0,584	
NOV123	0,99	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,99	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,99	0,988	0,983	0,988	0,988	0,988	0,993	0,99	0,99	ID	0,584	
BSBV	0,582	0,58	0,58	0,58	0,577	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,577	0,58	0,573	0,58	0,58	0,573	0,58	0,577	0,58	0,584	0,584	ID

Col1:HQ285251.1; Finl1: AM503629.1; Finl2:AM503627.1; E.U:HM776172.1; Sw1:NC\_003724.1; Finl3:AM503617.2; Finl4:AM503631.1; Fin5: AM503632.1;  
 Finl6: AM503626.1; Finl7:AM503623.1; Can: AY327117.1; CzRep1:DQ102381.1; Sw2:AI243719.1; Denk1: AF487407.4; Thai1:EU016676.1; Denk2:AV196094.2;  
 Jap: D16193.1; Pol: GO503252.1; CzRep2:AF9393507.1; Denk3:AF487408.2; Thai2:AM491619.1; BSBV-Ch: EU785967.1

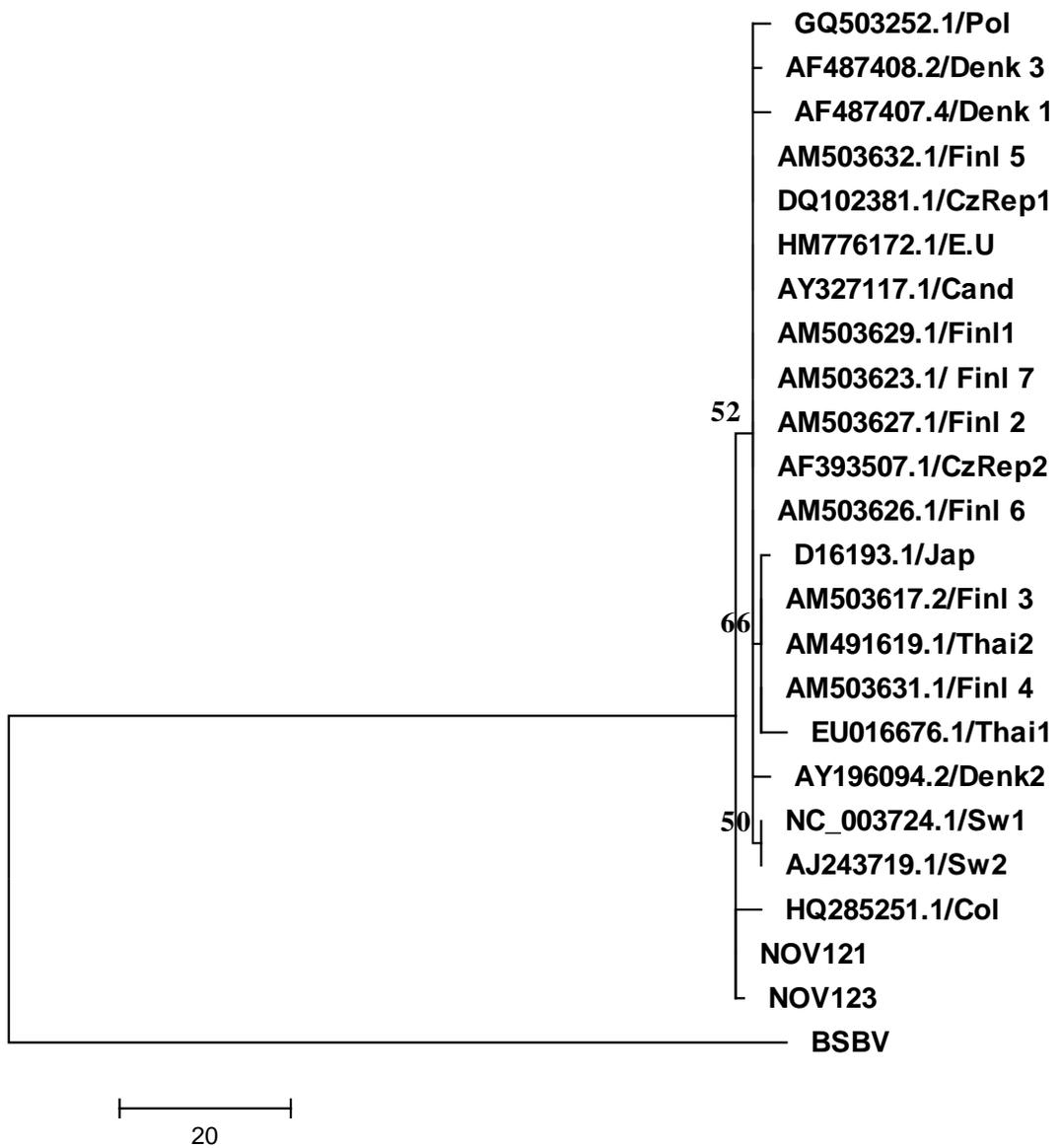


Figura 26. Árbol filogenético realizado a partir de secuencias parciales del gen CP de aislamientos de PMTV de Colombia (NOV 121, NOV123) y otros países del mundo. Los valores de *Bootstrap* se indican sobre las ramas.

## 7. DISCUSIÓN

El PMTV es uno de los virus de papa re-emergentes durante los últimos años en los cultivos de papa de Colombia y otros países de América (Xu *et al.*, 2004; Salazar, 2006; Montero-Astúa, 2008; Gil *et al.*, 2011) y Europa (Davey, 2009; Latvala-Kilby *et al.*, 2009; Santala, J *et al.*, 2010). Aunque se considera que es un virus originario y prevalente de los Andes suramericanos (Salazar, 2006) y a pesar que su vector Sss se ha reportado en diversas regiones del país (Carreño, 2009), su presencia en cultivos de papa de Colombia tan sólo fue confirmada en 2007 (Vélez, 2007), siendo posteriormente determinados los niveles de variación de poblaciones del patógeno presentes en los principales departamentos productores de este tubérculo en el país (Gil *et al.*, 2011; Osorio, 2012). En dichos trabajos utilizando secuenciación del gen CP, se encontró la ocurrencia de dos linajes virales de PMTV, el primero correspondiente a la variante de PMTV mundialmente distribuida, cuyos aislamientos comparten muy altos niveles de identidad en sus genomas (>97%); mientras que el otro linaje presenta menos de 76% de identidad con respecto al primer grupo, lo que de acuerdo a los criterios planteados por Adams *et al.* (2009), para la definición de especies en la familia *Virgaviridae*, correspondería a una nueva especie del género *Pomovirus*, hasta ahora no registrada en otros lugares del mundo. En estos trabajos adelantados en Colombia y en otros realizados principalmente en Europa (Latvala-Kilby *et al.*, 2009; Santala, J *et al.*, 2010) y EEUU (Xu *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2010), se ha identificado el desarrollo de métodos de detección como un aspecto fundamental para apoyar el manejo del mop-top en los cultivos de papa, dada su distribución errática en las

plantas y tubérculos, la gran variación de síntomas que induce en los diferentes cultivares de papa, el bajo título viral que alcanza en los tejidos vegetales y la posibilidad de generar infecciones sistémicas en ausencia de partículas ensambladas, gracias a la presencia de proteínas de movimiento codificadas por el TGB (Wright *et al.*, 2010). Debido a lo anterior se planteó la realización del presente estudio, con el fin de aumentar las secuencias disponibles del genoma de aislamientos colombianos de PMTV, en este caso del RNA2 de una cepa obtenida en el municipio de La Unión (Antioquia) y utilizar dicha información como base para el desarrollo de anticuerpos útiles para el diagnóstico serológico de este virus en Colombia, particularmente de los viriones ensamblados y disponibles en la planta para la transmisión del virus por su vector natural *Sss*.

Para esto se desarrolló la estrategia de ubicar regiones del dominio RT del RNA2 con altos niveles de hidrofobicidad y conservados entre diferentes aislamientos virales, como base para la síntesis de un péptido sintético con capacidad inmunogénica para generar anticuerpos policlonales de utilidad en pruebas de ELISA indirecto y *dot-blot*. La selección de esta región RT, se fundamentó en el papel que cumple la proteína CP-RT en la transmisión del PMTV por parte de *Sss*, tal como ha sido demostrado experimentalmente por Cowan *et al.* (1997) y Sandgren *et al.* (2001) y no pretende sustituir el uso de la región CP como base para la detección serológica de PMTV (Arif y Torrance, 1996, Nielsen y MØlgaard, 1997; Gallo, 2012), sino más bien, ofrecer un complemento en el diagnóstico de

este virus, que no sólo permita su detección, sino también la ocurrencia de viriones en su forma transmisible por Sss.

En este contexto, la secuenciación del RNA2 de la cepa R25 de PMTV alcanzó un 81,8% de este segmento genómico, contándose con la totalidad de la secuencia del dominio RT codificante para 649 aa, así como 147 aa de los 176 aa presentes en la proteína CP. El análisis filogenético, indicó que dicha secuencia presentaba niveles superiores al 97% de identidad con respecto a diferentes cepas europeas de PMTV, lo que claramente demostraba que los anticuerpos desarrollados serían de utilidad para el diagnóstico del linaje internacional de este virus. A pesar de tales niveles de identidad, se registraron nueve sustituciones de aa en el dominio RT de la cepa aquí secuenciada con relación a las cepas de referencia de otros países, siendo necesario en el futuro determinar a partir de análisis de mutantes, si dichos cambios presentan significados biológicos con respecto a la transmisibilidad de estos aislamientos por parte de Sss; especialmente cuando Carreño (2009) y Osorio (2012) han encontrado que en Colombia ocurre un mayor nivel de variación entre los genotipos de Sss definidos por análisis de regiones ITS del DNAr, con respecto a los presentes en la región templada.

Con base en dicha secuencia, se diseñaron cebadores específicos para amplificar la región codificante del dominio RT de la proteína CP-RT, siendo posible obtener mediante RT-PCR amplicones de 1944 pb, los que posteriormente fueron clonados con el fin de confirmar la secuencia utilizada para la búsqueda del

péptido inmunogénico, así como también de obtener la proteína recombinante, para ser empleada como control positivo en las pruebas serológicas realizadas. El primer propósito se cumplió plenamente, siendo la base para la selección del péptido sintetizado; sin embargo, el segundo objetivo de la clonación no pudo ser logrado, a pesar de múltiples intentos y modificaciones en los protocolos de expresión y purificación de la proteína recombinante. Esta situación, aunque no era la deseada, no afectó la continuidad de los experimentos serológicos, por cuanto se utilizó como control positivo el propio péptido purificado, con excelentes resultados en las pruebas de ELISA indirecto, al alcanzar valores de absorbancia superiores a 1.0. La dificultad en la purificación de proteínas recombinantes de PMTV o en su uso para generar anticuerpos útiles en pruebas de ELISA, ha sido frecuentemente reportada en la literatura, como resultado de su insolubilidad, alta fragilidad o cambios conformacionales de los determinantes antigénicos (Cowan *et al.*, 1997; Cerovska *et al.*, 2003; Cerovska *et al.*, 2006; Helias *et al.* 2003).

Con respecto a las pruebas serológicas generadas con base en los anticuerpos dirigidos al dominio RT del RNA2 de PMTV, se confirmó su plena utilidad, al posibilitar la detección del 21,4% y 22,7% de las muestras foliares y radiculares de plantas señuelo de *N. benthamiana* inoculadas con quistorosos de Sss obtenidos en diferentes departamentos del país por Gil (2010) y Osorio (2012). Los resultados de la detección serológica, fueron plenamente confirmados mediante pruebas de RT-PCR con cebadores dirigidos al gen CP y su posterior

secuenciación, siguiendo el esquema convencional de detección molecular de este virus, reportado originalmente por MacKenzie (1996).

Similarmente, en las evaluaciones realizadas a partir de muestras de papa directamente obtenidas de cultivos de la Unión (Antioquia) con registro de sarna polvosa, se logró la detección del virus en una muestra de tejido foliar y en 6 de las 12 muestras de raíces analizadas mediante pruebas de ELISA indirecto con los anticuerpos generados en este estudio. Cuando se comparó este nivel de detección con el ofrecido por el uso de los anticuerpos comerciales de Bioreba dirigidos a la proteína CP viral, las muestras de raíces detectadas como positivas para PMTV fueron inferiores, pues en este caso se determinó la presencia del virus en 10 de las 12 muestras de raíces, mientras que el kit comercial no detectó el virus en ninguna muestra de tejido foliar. La detección de PMTV en una mayor proporción de muestras de raíces con respecto a las de tejido foliar, se puede explicar por la función en la transmisión del virus que cumple la proteína CP-RT, siendo esperado que dicha proteína sea expresada con mayor frecuencia en la porción basal de las plantas donde el vector está presente, mientras que en la zona aérea, el virus preferiblemente se presente en forma desnuda acompañado de proteínas de movimiento (Wright *et al.*, 2010). Así mismo, estos resultados nuevamente ponen de manifiesto la necesidad de utilizar simultáneamente diferentes métodos de diagnóstico para PMTV, pues tal como lo reportan Xu *et al.* (2004) y Santala *et al.* (2010), existen numerosos reportes de inconsistencias en

las pruebas de detección de este virus. Los resultados de la evaluación en campo sugieren la presencia de viriones de PMTV provistos de CR-RT en forma generalizada en las plantas, lo que podría explicarse por los altos niveles de incidencia de Sss en los cultivos de este municipio antioqueño (Jaramillo y Botero, 2007; Osorio, 2012).

Uno de los problemas generalmente discutidos en inmunología es la naturaleza de la antigenicidad de una proteína. En principio, los datos de antigenicidad no son completos, son dependientes del potencial inmunogénico o de la aparente obtención aleatoria de anticuerpos monoclonales o policlonales; sin embargo, la identificación de epítopes puede basarse en procesos experimentales indirectos y en esta situación, los modelos teóricos de antigenicidad recobran valor. Hopp and Woods (1981) sugieren que los epítopes antigénicos pueden ser localizados en los segmentos de la estructura primaria que son marcadamente hidrofílicos. Teniendo en cuenta el modelo propuesto y el previo conocimiento de las regiones antigénicas del virus en la proteína asociada con la transmisión del vector Sss, la generación de anticuerpos contra la proteína CP-RT no solo proporciona una herramienta adicional en el diagnóstico del virión, sino que podría proporcionar una perspectiva sobre la arquitectura de su superficie, siendo esto de particular interés para entender las interacciones de los virus con los factores del huésped y sus vectores.

El epítotope “EDKRIRKERLKDKN” tiene alta reactividad antigénica pues muestra gran sensibilidad al reaccionar con el paratope de los anticuerpos sintetizados, la mínima concentración de antígeno detectable en ELISA es del orden de  $5 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ , mientras que el título viral de los anticuerpos fue de 1:256.000. Por el método de *dot-blot*, el mínimo de detección de los anticuerpos anti\_CP\_RT fue de 1:8500 y la concentración mínima de péptido detectable fue de 5  $\mu\text{M}$ . Considerando estos resultados, podemos decir que los anticuerpos generados en este estudio son altamente eficientes y sensibles al adaptarlos en los diferentes métodos serológicos.

Los anticuerpos generados para la detección específica de CP-RT, pueden ser utilizados tanto con fines diagnósticos, en conjunto con otras pruebas ya desarrolladas para PMTV como RT-PCR convencional (Arif *et al.* 1994; Xu *et al.*, 2004), y en tiempo real (Mumford *et al.*, 2000), macro (Maoka *et al.*, 2011) y microarreglos (Nicolaisen, M. 2011), DAS-ELISA con anticuerpos mono (Davey, 2009) y policlonales (Gallo, 2012) y microplacas de hibridización RT-PCR (RT-PCR-MPH), (Nakayama *et al.* 2010), así como en estudios epidemiológicos tendientes a evaluar las interacciones del PMTV con los diferentes componentes del ciclo de vida de su vector Sss. Así por ejemplo Kirk (2008) plantea en su revisión crítica de la relación del PMTV con su vector, la necesidad de realizar estudios que determinen la localización física del virus en las zoosporas y demás estructuras del protozooario, además de evaluar la persistencia del virus en las estructuras de resistencia de Sss. Dichas preguntas pueden utilizar los

anticuerpos aquí desarrollados utilizando diferentes formatos serológicos como la inmunodetección microscópica y la fusión con proteínas reporteras fluorescentes, entre otros.

Por otra parte, existen diferentes interrogantes básicos relacionados con la biología del virus que pudieran igualmente abordarse con el uso de los anticuerpos dirigidos al dominio RT, especialmente aquellos relacionados con las diferentes etapas de la transmisión del virus por parte de Sss. En este sentido, un estudio prioritario consiste en evaluar las tasas de supresión del codón de parada ámbar del RNA2 viral, en diferentes tejidos de la planta y bajo diferentes niveles de infestación de Sss, pues la única referencia que hasta ahora se tiene indica que dicha supresión ocurre con una frecuencia de 17%; aunque desafortunadamente en el estudio citado no se contempló el efecto del vector sobre este proceso (Cowen *et al.*, 1997).

La problemática creciente que representa Sss para la agroindustria productora y procesadora de papa en Colombia, cuyo efecto directo se reporta en estudios recientes en una reducción de la producción de hasta el 30% en la variedad Diacol-Capiro (Gilchrist *et al.*, 2011), sumada a los altos niveles de incidencia de PMTV registrados por Gil (2010) en diferentes regiones del país, hacen de la implementación de las herramientas de diagnóstico de ambos patógenos desarrolladas en este y otros estudios recientes (Vélez, 2007; Carreño, 2009; Gil, 2011; Gallo, 2012; Osorio, 2012) una prioridad para la cadena productiva de la papa, pues constituyen la base para el apoyo a los programas de certificación de

tubérculo semilla, la definición de medidas cuarentenarias y la generación de materiales resistentes en programas de mejoramiento genético.

## CONCLUSIONES

Se logró amplificar y secuenciar un 81.8% del RNA2 de la cepa R25 de PMTV, contándose con la totalidad de la secuencia del dominio RT codificante para 649 aa, así como 147 aa de los 176 aa de la proteína CP. La secuencia presenta un porcentaje de identidad de 97% y está relacionada con aislamientos Europeos de PMTV. Sin embargo, a pesar de tales niveles de identidad, se registraron nueve sustituciones de aa en el dominio RT con relación a las secuencias de referencia de cepas de otros países, siendo necesario en el futuro determinar a partir de análisis de mutantes, si dichos cambios representan significados biológicos con respecto a la transmisibilidad de estos aislamientos por parte de Sss.

En este trabajo, se presenta un método de búsqueda y diseño de péptidos sintéticos como determinantes antigénicos, utilizando herramientas bioinformáticas basadas en la presencia de regiones hidrofílicas en las proteínas bajo análisis. Los resultados confirman que los anticuerpos policlonales producido contra la proteína CP-RT de PMTV tienen la capacidad de detectar el epítipo de la proteína viral por *dot-blot* y ELISA indirecto.

La detección de PMTV basada en la proteína CP-RT, involucrada en la transmisibilidad del virus por parte de su vector Sss, puede ser utilizada en conjunto con métodos de detección de CP, tales como las pruebas serológicas y moleculares disponibles en el mercado. Estos anticuerpos al detectar la presencia de viriones maduros provistos de las proteínas de transmisión, resultan útiles para

el desarrollo de diferentes estudios epidemiológicos y de biología básica de la interacción del PMTV y Sss.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al apoyo económico y técnico del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (proyecto 090-2007S4527-87-08), de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín y Fedepapa. Se agradece a José Fernando Gil e Inés Osorio por proveer las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con Sss,

Así mismo deseo expresar mis sinceros agradecimientos a:

Mi director de tesis Mauricio Marín Montoya y a mis asesores Luz Estela Lagos Mora, Pablo Andrés Gutiérrez y Yuliana Marcela Gallo por su colaboración en la realización de este estudio, por su permanente disposición y desinteresada ayuda y por la confianza depositada en mí.

A mis jurados Mariela Burbano y Carlos Betancourth por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica.

A todas las integrantes del grupo de Investigación GENPAT, por su paciencia y enseñanzas en el proceso de formación investigativa.

A mis compañeros de laboratorio de Biología celular y Molecular y Laboratorio de Microbiología Industrial por haber hecho amena mi instancia, compartir su experiencia, conocimientos y brindarme su amistad.

A mis amigos Diana Burbano, Eliana Villareal, Carolina Obando, Ana Estrada, Verónica Rodríguez, Eliana Revelo, Gabriela Dorado, Sandra Álvarez, Maira Quiroz, Carolina Santa, Eliana Velázquez, Maritza Sierra, Inés Osorio, Emanuela Henao, Francis Ramírez, Robert Rodríguez, Iván Otero, Christian Cabrera, Francisco Ortega, Nevar García quienes con su amistad y su experiencia me enseñaron a confiar en lo que hago y motivarme para seguir adelante.

A Yuliana Marcela Gallo que por sus enseñanzas, su experiencia y su amistad.

Mi familia por su comprensión y su apoyo incondicional en todo mi proceso de formación.

## BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, M. J., ANTONIW, J. F., KREUZE, J. 2009. *Virgaviridae*: a new family of rod-shaped plant viruses. Arch Virol. 154: 1967-1972.

ADAMS, M. J. 1991. Transmission of plant viruses by fungi. Ann Appl Biol. 118: 479-492.

AGINDOTAN, B., PERRY, K. L. 2007. Macroarray detection of plant RNA viruses using randomly primed and amplified complementary DNAs from infected plants. Phytopathology. 97:119-12.

ALONSO, J., HIJMANS R. 2002. World potato atlas. Colombia. International Potato Center. En: [http://www.cipotato.org/wpa/samerica/colombia\\_c.htm](http://www.cipotato.org/wpa/samerica/colombia_c.htm). Consulta: 09/09/2010.

ARCINIEGAS, N. 2003. Técnicas de diagnóstico y evaluación de resistencia al virus del Amarillamiento de las Nervaduras de la papa (PYVV) en accesiones de la Colección Central Colombiana de *Solanum phureja*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia.

ARIF, M., TORRANCE, L., REAVY, B. 1994. Improved efficiency of detection of *Potato mop-top* furovirus in potato tubers and in the roots and leaves of soil-bait plants. *Potato Res.* 37: 373-381.

ARIF, M., L. TORRANCE. 1996. Detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers. *Proceedings Crop Protection in Northern Britain.* 325-330.

ASTIER, S., ALBOUY, J., MAURY, Y., ROBAGLIA, C., LECOQ, H. 2007. *Principles of Plant Virology. Genome, Pathogenicity, Virus Ecology.* Science Publishers, Enfield, NH, USA. Bioassay and RT-PCR-microplate Hybridization. *American Journal.* 87:218–225.

BRUNT, A. A., RICHARDS, K. E. 1989. Biology and molecular biology of Furoviruses. *Adv Virus Res* 36: 1-32.

BÜCHEN OSMOND, C. 2010. The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponible en: <http://www.ictvdb.org>. Consulta: 12 de Julio de 2010.

BYSTRICKA, D., LENZ, O., MRAZA, I., PIHEROVA, L., KMOCHD, S., SIP, M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *J Virol Methods.* 128:176–182.

CALVERT, E.L. 1966. The reaction of potato varieties to potato mop-top virus. Record of Agricultural Research of the Ministry of Agriculture for Northern Ireland. 17: 31–40. *Citado por*: NAKAYAMA, T., MAOKA, T., HATAYA, T., SHIMIZU, M., FUWA, H., TSUDA S., MORY, M. 2010. Diagnosis of *Potato Mop-Top Virus* in soil Using Bait Plant Bioassay and RT-PCR- microplate Hybridization. Am. J. Potato Res. 87:218 - 225

CAMPBELL, R.N. 1996. Fungal transmission of plant viruses. Annu Rev Phytopathol. 34: 87-108.

CAPOTE, N., BERTOLINI, E., OLMOS, A., VIDAL, E., MARTÍNEZ, M.C., CAMBRA, M. 2009. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. Int J Microbiol Res. 12: 1-6.

CARREÑO, A.J. 2009. Evaluación de la variabilidad genética de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* mediante la comparación de regiones ITS del DNA ribosomal de cepas procedentes de las regiones productoras de papa en Colombia (Tesis de Maestría). Bogotá, Colombia: Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia.

ČEŘOVSKÁ, N., MORAVEC, T., ROSECKÁ, P., DĚDIČ, P., FILIGAROVÁ, M. 2003. Production of Polyclonal Antibodies to a Recombinant Coat Protein of Potato. J Phytopathology. 151: 159-200.

ČEŘOVSKÁ, N.C., FILIGAROVA, M., PECENKOVÁ, T. 2006. Production of Polyclonal Antibodies to a Recombinant *Potato Mop-top Virus* Non-structural Triple Gene Block Protein 1. *J Phytopathology*. 154: 422–427.

COOPER J.I., JONES R.A.C., HARRISON B.D. 1976. Field and glasshouse experiments on the control of *Potato mop-top virus*. *Ann Appl Biol*. 83: 215–230.

*Citado por*; SANTALA, J.; SAMUILOVA, O.; HANNUKKALA, A.; LATVALA, S.; KORTEMAA, H.; BEUCH, U.; KVARNHEDEN, A.; PERSSON, P.; BUNDGAARD-TOPP, K.; ØRSTAD, K.; SPETZ, C.; NIELSEN, S.L.; KIRK, H.G.; BUDZISZEWSKA, M.; WIECZOREK, P.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A.; POŚPIESZNY, P.; KRYSZCZUK, A.; SZTANGRET-WIŚNIEWSKA, J.; YIN, Z.; CHRZANOWSKA, M.; ŻIMNOCH-GUZOWSKA, E.; JACKEVICIENE, E.; TALUNTYTĖ, L.; PŪPOLA, N.; MIHAILOVA, J.; LIELMANE, I.; JÄRVEKÜLG, L.; KOTKAS, K.; ROGOZINA, E.; SOZONOV, A.; TIKHONOVICH, I.; HORN, P.; BROER, I.; KUUSIENE, S.; STANIULIS, J.; UTH, J.G.; ADAM, G.; VALKONEN, J.P.T. 2010. Detection, distribution and control of *Potato mop-top virus*, a soilborne virus, in northern Europe. *Ann Appl Biol*, London. 157:163-178.

COWAN, G.H., TORRANCE, L., REAVY, B. 1997. Detection of *Potato mop-top virus* capsid readthrough protein in virus particles. *J Gen Virol* 78:1779-1783.

DAVIS, N., MALLIK, I., CROSSLIN, J.M. y. GUDMESTAD, N.C. 2010. First report of *Potato mop-top virus* in North Dakota. *Plant Dis.* 94:1506.

DAVEY T. 2009. The importance of *Potato mop-top virus* (PMTV) in Scottish seed potatoes (PhD Thesis). Heriot Watt University & Science and Advice for Scottish Agriculture.

DEACON, J. 2010. The Microbial World: Fungal zoospores II. Chytrids and plasmodiophorids. Institute of Cell and Molecular Biology. The University of Edinburgh. Disponible en: <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/chytrid.htm>.

Consulta: 12 de Julio de 2010.

EDELHOCH, H. 1967. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry.* 6:1948-54.

ESTRADA, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Plural Editores. IP-IPGRI-PRACIPA-IBTA-PROINPA-SDC-CID.

FABRE, F., KERVARREC, C., MIEUZET, L., RIAULT, G., VIALATTE, A., JACQUOT, E., 2003. Improvement of *Barley yellow dwarf virus*-PAV detection in single aphids using a fluorescent real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 110: 51–60.

FALLOON, R., GENET, R., LISTER, R., BUTLER, R. 2005. Root function and growth of potato plants reduced by *Spongospora subterranea* infection. Am. J. Potato Res. 82:68.

FREEMAN, W., WALKER, S., VRANA, K. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 26:112-125.

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. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Colombia.

GARCIA, C., NAVIA, E. 2002. Evaluación de estrategias de manejo de la roña polvosa (*Spongospora subterranea*) en las tres regiones más productoras de papa en Colombia. En: <http://www.redepapa.org/practicasculturalesred3.html>.

GERMUNDSSON, A., SANDGREN, M., BARKER, H., SAVENKOV, E., VALKONEN, J.P. 2002. Initial infection of roots and leaves reveals different resistance phenotypes associated with coat protein gene-mediated resistance to *Potato mop-top virus*. J Gen Virol 83:1201- 1209.

GIL, J.F. 2010. Diagnóstico y caracterización molecular de virus asociados al cultivo de la papa en Colombia, con énfasis en el *virus mop-top* (PMTV,

pomovirus). Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias-Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.

GIL, J.F., GUTIÉRREZ, P., COTES, J.M., GONZÁLEZ, E.P., MARÍN, M. 2011. Caracterización genotípica de aislamientos colombianos del *Potato mop-top virus* (PMTV, *pomovirus*). Actual Biol. 33: 69-84.

GILCHRIST, E., SOLER, J., MERZ, U. REYNALDI, S. 2011. Powdery scab effect on the potato *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* growth and yield. Trop Plant Pathol 36: 350-355.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

HARJU, V.A., SKELTON, A., CLOVER, G. R. G., RATTI, C., BOONHAM, N., HENRY, C.M., MUMFORD, R.A. 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. J Virol Methods 123:73-80.

HARRISON, B.D., JONES R.A.C. 1971. Factors affecting the development of spraing in potato tubers infected with *Potato mop-top virus*. Ann Appl Biol, 68:281–289. Citado en: SANTALA, J., SAMUILOVA, O., HANNUKKALA, A., LATVALA, S.,

KORTEMMAA, H., BEUCH, U., KVARNHEDEN, A., PERSSON, P., BUNDGAARD-  
TOPP, K., ØRSTAD, K., SPETZ, C., NIELSEN, S.L., KIRK, H.G.,  
BUDZISZEWSKA, M., WIECZOREK, P., OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A.,  
POŚPIESZNY, P., KRYSZCZUK, A., SZTANGRET-WIŚNIEWSKA, J., YIN, Z.,  
CHRZANOWSKA, M., ZIMNOCH-GUZOWSKA, E., JACKEVICIENE, E.,  
TALUNTYTĖ, L., PŪPOLA, N., MIHAILOVA, J., LIELMANE, I., JÄRVEKÜLG, L.,  
KOTKAS, K., ROGOZINA, E., SOZONOV, A., TIKHONOVICH, I., HORN, P.,  
BROER, I., KUUSIENE, S., STANIULIS, J., UTH, J.G., ADAM. G., VALKONEN,  
J.P.T. 2010. Detection, distribution and control of *Potato mop-top virus*, a soilborne  
virus, in northern Europe. *Ann Appl Biol*, London. 157:163-178.

HARRISON, J.G., SEARLE, R.J., WILLIAMS, D N.A. 1997. Powdery scab disease  
of potato review. *Plant Pathol*. 46: 1–25.

HARRISON, B.D., REAVY, B. 2002. *Potato mop-top virus*. Description of Plant  
Viruses. aab 389. En:<<http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=389>>.  
Fecha de acceso: 14 de enero de 2012.

HAUPT, S., COWAN, G.H., ZIEGLER, A., ROBERTS, A., OPARKA, K.J.,  
TORRANCE, L. 2005. Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic  
recycling pathway. *Plant Cell*. 17: 164-181.

HELIAS, V., JACQUOT E, G.M., LEHINGRAT, Y., GIBLOT-DUCRAY, D. 2003.  
Production of recombinant *Potato mop-top virus* coat protein in *Escherichia coli*

and generation of antisera recognizing native virus protein. *J Virol Methods*. 110:91–97.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. 1993. Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11:1026–1030.

HOOP, T.P., WOODS, K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*. 78: 3824-3828.

HUANG, X., MADAN, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 9: 868-877.

HULL, R. 2009. *Comparative plant virology*. 2 Ed. *Academic Press*. 117-138

ICTV. 2010. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy 2009 Release. Disponible en: <http://www.ictvonline.org>. Consulta: 12 de mayo de 2012.

JARAMILLO, S., BOTERO, J.M. 2007. Respuesta de diferentes poblaciones de *Spongospora subterranea* f. sp. subterranea a la rotación entre dos cultivares de papa (*Solanum tuberosum* ssp. andigena). *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60: 3859-3876.

JONES, R.A.C., HARRISON, B.D. 1969. The behaviour of potato mop-top virus in soil, and evidence for its transmission by *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. Ann Appl Biol. 63:1–17. *Citado por*: TAKATO, N., TETSUO, M., TATSUJI, H., MOTOSHIGE, S., HIDEAKI, F., SHOGO, T., MOTOYUKI, M. 2010. Diagnosis of *Potato Mop-Top Virus* in Soil Using Bait Plant Bioassay and RT-PCR-microplate Hybridization. American journal. 87:218–225.

JONES, R. A. C., HARRISON, B. D. 1972. Ecological studies on *Potato mop-top virus* in Scotland. Ann Appl Biol. 71: 47-57. *Citado por*: FALLOON, R., GENET, R., LISTER, R., BUTLER, R. 2005. Root function and growth of potato plants reduced by *Spongospora subterranea* infection. Am. J. Potato Res. 82:68.

JONES, R. A. C. 1988. Epidemiology and control of *Potato mop-top virus*. In Developments in Applied Biology. II. Viruses with Fungal Vectors. Edited by J. I. Cooper y M. J. C. Asher. Wellesbourne: Association of Applied Biologists. 255-270. *Citado por*: TAKATO, N., TETSUO, M., TATSUJI, H., MOTOSHIGE, S., HIDEAKI, F., SHOGO, T., MOTOYUKI, M. 2010. Diagnosis of *Potato Mop-Top Virus* in Soil Using Bait Plant Bioassay and RT-PCR-microplate Hybridization. American journal. 87:218–225.

KASHIVAZAKI, S., SCOTT, K., REAVY, B., HARRISON. D. 1995. Sequence analysis and gene content of *Potato mop-top virus* RNA 3: further evidence of heterogeneity in the genome organization of furoviruses. *Virology*. 206:701–706.

KELLY THEISEN, utilizando el ESRI ArcGIS 9/ ArcMAP de la Unidad de Informática de la Investigación del CIP, Lima, Perú, junio de 2006. Actualizado noviembre de 2008.  
<https://research.cip.cgiar.org/confluence/pages/viewpage.action?pageId=13605>.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 16:111-120.

KIRK, H.G. 2008. Mop-top virus, relationship to its vector. *Am. J. Potato Res.* 85: 261–265.

KHAN, J., DIJKSTRA, J. 2006. *Handbook of plant virology*. Londres: Food Product Press Oxford.

KLEIN, D., KONG, P., HONG, C.X., JEFFERS, S.N., RICHARDSON, P.A. 2003. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*. 8:257–260.

KOENIG, R., LESEMANN, D. E. 2005. *Genus Pomovirus*. En: *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on taxonomy of Viruses. *Editado por* : van Regenmortel MHV, Fauquet C., Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, McGeogh DJ, Maniloff J, Mayo MA, Pringle CR, Wickner RB. 2000. Academic Press. USA. 3-16.

KOONIN, E. V., DOLJA, V. V. 1993. Evolution and taxonomy of positive- strand RNA viruses: implication of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 28:375–430.

KOGOVSEK, P., GOW L., POMPE-NOVAK, M., GRUDEN, K., FOSTER, G.D., BOONHAM, N., RAVNIKAR, M. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates. *J Virol Methods*. 149: 1-11.

KURPPA, A. 1989. Reaction of potato cultivars to primary and secondary infection by *Potato mop-top* furovirus and strategies for virus detection. *Bulletin OEPP/EPPO Journal*. 19: 593–598.

KURPPA, A. 1990. *Potato mop-top virus*: purification, preparation of antisera and detection by means of ELISA. *Annales Agriculturae*.29: 9-17.

LATVALA-KILBY, S., AURA, J., PUPOLA, N., HANNUKALA, A., 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. *Phytopathology*. 99:519-531.

LUKHOVITSKAYA,N.I.,YELINA,N.E.,ZAMYATHIN,A.A., SCHEPETILNIKOV,M.V., SOLOVYEV,A.G.,SANDGREN,M.,MOROZOV,S.Y.,VALKONEN,J.P.T., SAVENKOV, E.I. 2005. Expression, localization and effects on virulence of the cysteine-rich 8 Kda protein of *Potato mop-top virus*. *J Gen Virol*. 86: 2879-2889.

MACKENZIE, D.J. 1996. Detection of *Potato mop-top virus* in leaf or tuber tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. Document CPHBT96K03, Centre for Plant Health, Agriculture and Agri-Food Canada, Sidney, B.C., Canada.

MADR y FEDEPAPA. 2004. Guía ambiental para el cultivo de papa. Dirección de desarrollo sectorial sostenible. Disponible en: <http://www.siame.gov.co/>

MAKKOUK, K.M., HSU, H.T., KUMARI, S.G. 1993. Detection of three plant viruses by dotblot and tissue-blot immunoassay using chemiluminescent and chromogenic substrates. *J Phytopathology*. 139: 97-102.

MAOKA, T., SUGIYAMA, S., MARUTA, Y., HATAYA, T. 2010. Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. *Plant Dis*. 94:1248-1254.

MAS, P., PALLAS, V. 1995. Non-isotopic tissue-printing hybridization: A new technique to study long- distance plant virus movement. *J Virol Methods*. 52: 317-326.

MARTIN, C., TORRES, H. 1989. Control of *Rhizoctonia* and other soil-borne diseases of

TPS. in: *Fungal Diseases of the Potato. Report of Planning Conference on Fungal Diseases of the Potato. Held at CIP, Lima, Peru. September 21-25, 1987.* 191-205.

MATTHEWS, R.E.F. 1991. Methods for assay, detection and diagnosis. *Plant Pathol J*, 3:12-53.

MATTHEWS, R.E.F. 1993. Diagnosis of plant virus diseases. *Citado en:*  
MCGEACHY, K. D., BARKER, H. 2000. Potato mop-top RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. *Mol Plant Microbe Interact*. 13: 125–128.

MAYO, M.A., TORRANCE, L., COWAN, G., JOLLY, C.A., MACINTOSH, S.M., ORREGA, R., BARRERA, C., SALAZAR, L.F. 1996. Conservation of coat protein sequence among isolates of potato mop-top virus from Scotland and Peru. *Arch Virol*. 141:1115-1121.

MCGEACHY, K. D., 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.

MERZ, U. 1995. PMTV-like particles inside resting spores of *Spongospora subterranea*. *J Phytopathology.* 143: 731–733.

MERZ, U. 2008. Powdery Scab of Potato Occurrence, Life Cycle. *Am. J. Potato Res.* 85:241–246.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2006. Observatorio agrocadenas Colombia. Documento de trabajo No 100. La cadena de la papa en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. (<http://www.agrocadenas.gov.co>).

MOCHIZUKI, T., OHNISHI, J., OHKI, T., KANDA, A., TSUDA, S. 2008. Amino acid substitution in the coat protein of Melon necrotic spot virus causes loss of binding to the surface of *Oospidium bornovanus* zoospores. *J. Gen. Plant Pathol.* 74:176–181.

MONTERO-ASTUA, M., VASQUÉZ, V., TURECHEK, W.W., MERZ, U., RIVERA, C., 2008. Incidence, distribution, and association of *Spongospora subterranea* and *Potato mop-top virus* in Costa Rica. *Plant Dis.* 92:1171-1176.

MUMFORD, R., WALSH A, K., BARKER I., 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. *Virology*. 90:448-453.

NAKAYAMA, T., MAOKA, T., HATAYA, T., SHIMIZU, M., FUWA, H., TSUDA S., MORY, M. 2010. Diagnosis of *Potato Mop-Top Virus* in soil Using Bait Plant Bioassay and RT-PCR- microplate Hybridization. *Am. J. Potato Res.* 87: 218 - 225.

NIELSEN, S.L., MOLGAARD, J.P. 1997. Incidence, appearance and development of potato mop-top furovirus-induced spraing in potato cultivars and the influence on yield, distribution in Denmark and detection of the virus in tubers by ELISA. *Potato Res.* 40:101-110.

NICOLAISEN, M. 2011. An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *J Virol Methods.* 173: 137-143.

OLMOS, A., BERTOLINI, E., GIL, M., CAMBRA, M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of nonpersistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *J Virol Methods.* 128:151-155.

OSORIO, G.I. 2012. Variabilidad genética de *Spongospora subterranea* y su virus asociado PMTV en Colombia. (Tesis de Maestría). Medellín, Colombia: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

PARK, J., LEE, K., KIM, E., CHO, Y., PARK, Y. 2001. Simultaneous detection and genotyping of hepatitis C virus (HVC) by oligonucleotide microarray. *Clinical Chemical*. 47:329.

PEREIRA, L. G., TORRANCE, L., ROBERTS, I. M., HARRISON, B. D. 1994. Antigenic structure of the coat protein of *Potato mop-top* Furovirus. *Virology*. 203: 277- 285.

RANTANEN, T., LEHTINEN, U., KURPPA, A. 1999. Development of a IC- RT-PCR test for the detection of potato mop-top virus. *Proceed-ings of the 14th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, Sorrento, Italy*. 547-548.

RYAZANTSEV, D.Y., ZAVRIEV, S. K. 2009. An efficient diagnostic method for the Identification of Potato Viral Pathogens. *Mol Biol*. 43: 515–523.

SAITOU, N., NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

SALAZAR, L.F. 1995. Los Virus de la Papa y su control. Centro Internacional de la Papa CIP (Perú). Publicado por el Centro Internacional de la Papa. p 226.

SALAZAR, L. F. 1997. Identificación y Control de Enfermedades Virales y Fitoplasmas de la Papa. Simposium Internacional de la Papa. Metepec, Estado de México.

SALAZAR, L. F. 2006. Emerging and Re-emerging Potato Diseases in the Andes. *Potato Res.* 49: 43-47.

SAMPOL, B., BOTA, J., RIERA, D., MEDRANO, H., FLEXAS, J. 2003. Analysis of virus-induced inhibition of photosynthesis in malmeuse grapevines. *New Phytol.* 260: 403-412.

SANDGREN, M. 1995. *Potato mop-top virus* (PMTV): distribution in Sweden, development of symptoms during storage and cultivar trials in field and glasshouse. *Potato Res.* 38: 387–397.

SANDGREN, M., SAVENKOV, E., 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., KORTEMMAA, H., BEUCH, U., KVARNHEDEN, A., PERSSON, P., BUNDGAARD-TOPP, K., ØRSTAD, K., SPETZ, C., NIELSEN, S.L., KIRK, H.G., BUDZISZEWSKA, M., WIECZOREK, P., OBREŃPALSKA-STEPLOWSKA, A., POŚPIESZNY, P., KRYSZCZUK, A., SZTANGRET-WIŚNIEWSKA, J., YIN, Z., CHRZANOWSKA, M., ZIMNOCH-GUZOWSKA, E., JACKEVICIENE, E., TALUNTYTĖ, L., PŪPOLA, N., MIHAILOVA, J., LIELMANE, I., JÄRVEKÜLG, L., KOTKAS, K., ROGOZINA, E., SOZONOV, A., TIKHONOVICH, I., HORN, P., BROER, I., KUUSIENE, S., STANIULIS, J., UTH, J.G., ADAM, G., VALKONEN, J.P.T. 2010. Detection, distribution and control of *Potato mop-top virus*, a soilborne virus, in northern Europe. *Ann Appl Biol*, London. 157:163-178.

SAVENKOV, E. I., SANDGREN, M., VALKONEN, J. P. 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. I., GERMUNDSSON, A., ZAMYATHIN, A. A., SANDGREN, M., VALKONEN, J.P.T. 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.

SEOK-IL HONG, M.D. 1990. Dot -blot Enzyme Immunoassay, A simple, cheap and stable test for antibody to human T-cell lymphotropic virus 1 (HRLV-I). *Korean J Lab Med*. 10:1.

SHCHERBAKOVA, L. 2007. Advanced methods of plant pathogen diagnostics. Editado por: Dyakiv, T.Yu. Dzhavakhiya, V.G., Korpela, T. Comprehensive and molecular phytopathology. Edition 1. Elsevier B. V.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., y KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol (submitted). (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)

TENORIO, J., FRANCO, Y., CHUQUILLANQUI, C., OWENS, R. A., SALAZAR, F. 2006. Reaction of potato varieties to *Potato mop-top virus* infection in the Andes. Am Potato J. 83:423-431

TORRANCE, L., COWAN, G. H., PEREIRA, L. G. 1993. Monoclonal anti-bodies specific for *Potato mop-top virus*, and some properties of the coat protein. Ann Appl Biol. 122: 311-322.

TORRANCE, L., MAYO, M. A. 1997. Proposed re-classification of Furoviruses. Arch Virol. 142: 435-439.

TORRANCE, L., COWAN, G. H., SOKMEN, M. A., REAVY, B. 1999. A naturally occurring deleted form of RNA2 of *Potato mop-top virus*. J Gen Virol. 80: 2211-2215.

VÉLEZ, P.B. 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). Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

VERCHOT, LUBIEZ, J. 2003. Soilborne viruses: advances in virus movement, virus induced gene silencing, and engineered resistance. Physiol Mol Plant Pathol. 62: 55-63.

VAIRA, A. M., VECCHIATI, M., MASENGA, V., ACCOTTO, G. P. 1996. A polyclonal antiserum against recombinant viral protein combines specificity and versatility J Virol Methods. 56: 209-219.

VAN DE GRAAF, P., LEES A. K., CULLEN D. W., DUNCAN J. M. 2003. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissue samples using real-time PCR. Eur. J. Plant Pathol. 109: 589-597.

VREUGDENHIL, D., BRADSHAW, J., GEBHARDT, C., GOVERS, F., TAYLOR, M., MACKERRON, D., ROSS, H. 2007. Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. Elsevier Science.

WEBSTER, C.G., WYLIE, S.J., JONES- MICHAEL, G. K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. Review article. Current science. 86:12.

WRIGHT, K.M., COWAN, G.H., LUKHOVITSKAYA, N.I., TILSNER, J., ROBERTS, A.G., SAVENKOV, E. I., TORRANCE, L. 2010. The N-Terminal Domain of PMTV TGB1 Movement Protein Is Required for Nucleolar Localization, Microtubule Association, and Long-Distance Movement. The American Phytopathological Society. 23: 1486–1497.

XU, H. DEHAAN, T.L. DE BOER, S.H. 2004. Detection and confirmation of *Pota mop-top virus* in Potatoes produced in the United States and Canada. Plant Dis. 88: 363-367.

ZHONGHUA, M., THEMIS, J. 2007. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. Crop Prot 26:145–161.

## Anexo 1.

Protocolo de extracción de RNA total: *RNeasy Plant Mini kit* (QIAGEN).

1. Lavar el material vegetal y dejar secar muy bien.
2. Pesar de 70 a 100 mg de muestra y transferir a un mortero previamente esterilizado.
3. Macerar con nitrógeno líquido
4. Adicionar 450  $\mu$ l de buffer RLC. Realizar vortex vigoroso.

Para ayudar a la disrupción del tejido, se incuba el tejido por 3 min a 56°C; además, al buffer RLC se le adiciona previamente  $\beta$ -Mercaptoetanol en proporción de 10  $\mu$ l de  $\beta$ -M por 1 ml de Buffer RLC.

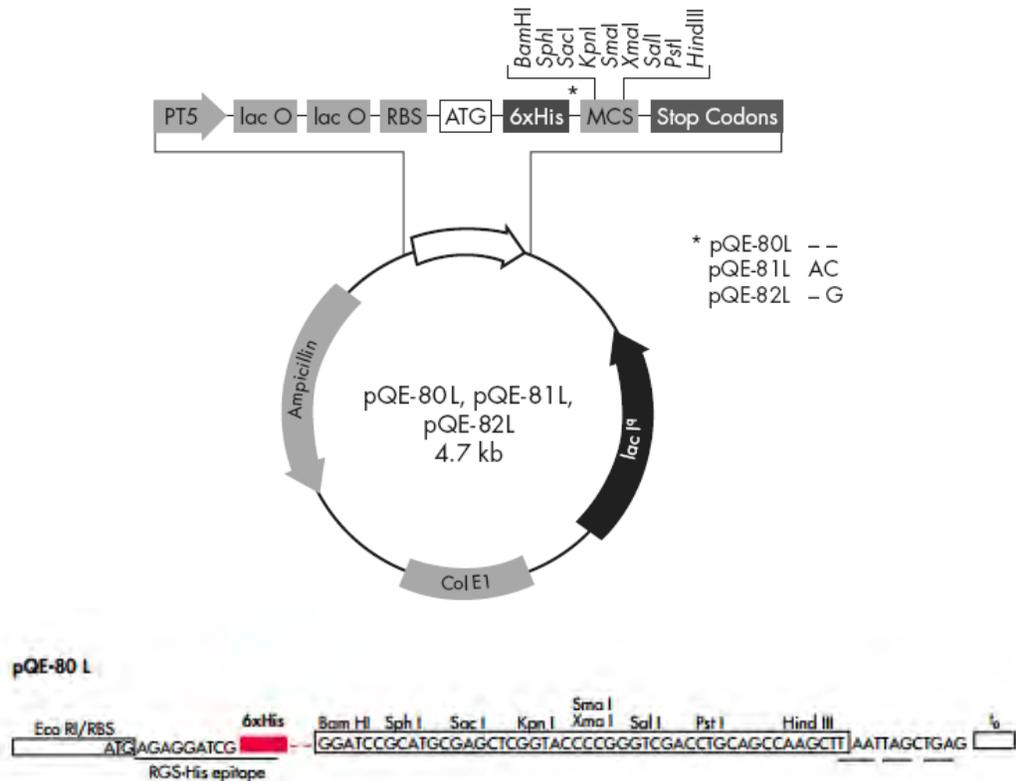
5. Transferir el lisado a una columna QIAshredder spin (lila) y centrifugar por 2 min a velocidad máxima. Con cuidado transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga sin perturbar los residuos celulares en el tubo colector.
6. Adicionar 0.5 vol. de etanol (96-100%) al lisado y mezclar inmediatamente por pipeteo.
7. Transferir la muestra (usualmente 650  $\mu$ l), incluyendo algunos precipitados formados a una columna *RNeasy spin* (Rosada). Centrifugar por 15 s a 10.000 rpm y descartar el precipitado.
8. Adicionar 700  $\mu$ l de Buffer RW1 a la columna. Centrifugar por 15 s a 10.000 rpm y descartar el precipitado.
9. Adicionar 500  $\mu$ l de Buffer RPE a la columna. Centrifugar por 15 s a 10.000 rpm y descartar el precipitado.

10. Adicionar 500  $\mu$ l de Buffer RPE a la columna. Centrifugar por 2 min a 10.000 rpm y descartar el precipitado. Centrifugar nuevamente durante 2 min a 10.000 rpm.
11. Pasar la columna *RNeasy spin* a u nuevo tubo colector y eluir la muestra en 40  $\mu$ l de agua tratada con DEPC en dos pasos, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 min. Almacenar hasta su uso a -80°C.

## Anexo 2.

### Proceso de clonación del dominio RT de la proteína CP-RT de PMTV

A partir de las secuencias obtenidas para el RNA2 de la cepa R25 de PMTV y de aislamientos reportados en la base de datos del GenBank, se diseñaron cebadores específicos para obtener la secuencia completa del dominio RT de PMTV. Para seleccionar las enzimas de restricción se utilizó el software NEBcutter V2.0 y además, a cada cebador se le adicionaron adaptadores para facilitar su clonación en el vector pQE80L.



Mapa del vector de clonación pQE80L.

El plásmido contiene un promotor T5 (PT5), operador lac (*lac o*), secuencia codificante para 6xHis en el extremo N-terminal, sitio de clonación múltiple (MCS), sitio de unión al ribosoma (RBS), codón de inicio (ATG), codón de parada, región de terminación transcripcional *rrnBT1*, secuencia codificante del represor lac (*lacI<sup>q</sup>*), origen de replicación ColE1, gen de resistencia a ampicilina y secuencia codificante de  $\beta$ -lactamasa.

Los cebadores diseñados contienen secuencias adicionales para las enzimas de restricción *SacI* y *PstI* en el cebador *Forward* y *Reverse*, respectivamente. Los nucleótidos extras en el extremo 5' se adicionaron para garantizar una buena eficiencia de corte durante el proceso de clonación.

*Forward* CPRTFSacI: 5'- cgagctcCAATTAACCGCTCAGGCTTTTTGG-3'

*Reverse* CPRTRPstI: 5'- aactgcagtcaAACAGCCATCTTACCTGACATC-3'

El RNA molde y la síntesis de cDNA fueron obtenidos como se describe en la metodología. Debido a que los cebadores diseñados para amplificar el gen CP-RT resultaron ser inespecíficos por la presencia de bandas de diferentes tamaños, se optó por purificar desde gel mediante el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) la banda esperada de ~1944pb (Figura 15). Para su clonación se realizó digestión sencilla del plásmido y del inserto, iniciando con la enzima *PstI*, seguida por *SacI* purificando con *QIAquick PCR purification Kit* (Qiagen) entre cada digestión (Figuras 27 y 28).

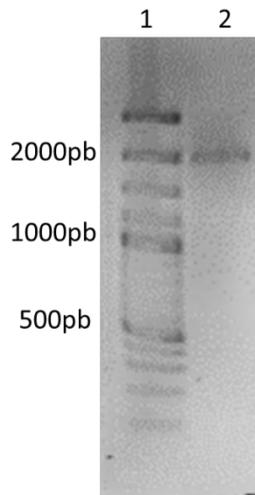


Figura 27. Amplicón obtenido del dominio RT de PMTV. El amplicon se obtuvo utilizando los cebadores CPRTFSacl y CPRTRPstI correspondiente a la región completa del dominio RT, a partir de la muestra R25 de la Unión- Antioquia. 1: Marcador 100pb plus, 2: R25.

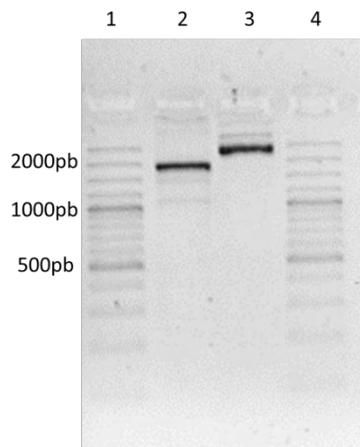


Figura 28. Gel de verificación de la primera digestión con Sacl. 1: Marcador 100pb plus fermentas, 2: Amplicon RT, 3: Plásmido pQE80L, 4: Marcador 100pb plus (Fermentas).

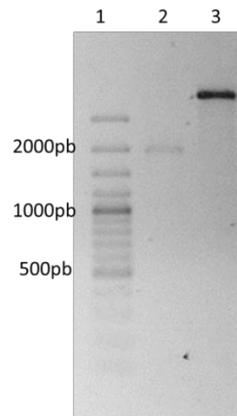


Figura 29. Gel de verificación de la segunda digestión con PstI. 1: Marcador 100pb plus (Fermentas), 2: Amplicón CP-RT, 3: Plásmido pQE80L.

La reacción de ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa en el sitio de policlonación del vector pQE80L se realizó manteniendo una relación molar 5:1 inserto: vector, según las recomendaciones del fabricante y la transformación se realizó en la cepa DH5 $\alpha$  mediante choque térmico. En la Figura 30 se presenta un resultado de la secuenciación del fragmento clonado.

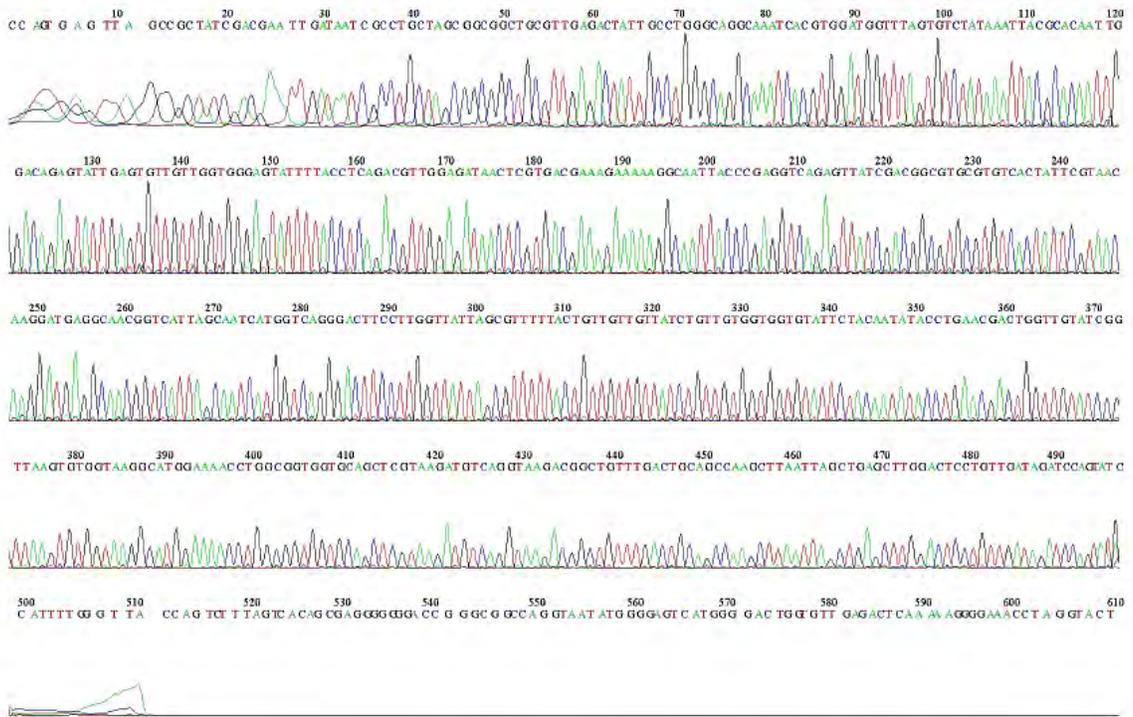


Figura 30. Electroferograma de una región clonada correspondiente al dominio RT de PMTV.

### Anexo 3.

#### Transformación de células competentes DH5 $\alpha$

1. Transferir una alícuota de la mezcla de ligación (10  $\mu$ l o menos) a un tubo de microcentrifuga estéril frío y almacenar en hielo.
2. Fundir una alícuota de células competentes DH5 $\alpha$  sobre hielo.
3. Suavemente resuspender las células y transferir 100  $\mu$ l en el tubo de microcentrifuga con el mix de ligación, mezclar suavemente y almacenar en hielo por 20 min.
4. Transferir el tubo al baño María a 42°C por 45 s.
5. De forma rápida, transferir el tubo en hielo durante 10 min.
6. Adicionar 1ml de medio líquido LB y resuspender de forma suave, incubar a 37°C por 45 min.
7. Colectar las células por centrifugación (13000 rpm, 15 s)
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 200 $\mu$ l de medio líquido LB.
9. Platear alícuotas de 100  $\mu$ l en medio agar LB suplementado con 100 $\mu$ g/ $\mu$ l de ampicilina. Incubar los platos a 37°C toda la noche.

Control positivo para chequear la eficiencia de la transformación:

Transformar las células competentes con 1 ng de pQE80L como plásmido control (no digerido). Platear el producto transformado en medio agar LB suplementado con 100 $\mu$ g/ $\mu$ l de ampicilina.

Control negativo para chequear la religación del producto.

Transformar las células competentes con producto de ligación que solo tenga plásmido digerido y ausencia de muestra a insertar. Platear el producto transformado en medio agar LB suplementado con 100ug/ul de ampicilina.

## Anexo 4.

### Preparación de células competentes.

#### Materiales

Células DH5 $\alpha$ , Medio LB, Agar LB, Solución stock de ampicilina 100mg/ul

1. Crecer 100 ul del stock celular de DH5 $\alpha$  en medio agar LB durante 12 h a 37°C.
2. Remover una colonia bacteriana e inocularla en 5 ml medio líquido LB; incubar a 37°C por 200 rpm durante 12 h.
3. Adicionar 1ml del cultivo a 50 ml de medio líquido LB y agitar a 37°C a 250 rpm, hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> de 0.6.
4. Transferir el cultivo a un tubo de estéril polipropileno de 50 ml y enfriar en hielo durante 10 min.
5. Colectar las células por centrifugación a 4000 rpm, 4°C durante 5 min y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender las células suavemente en 50 ml de 100 mM de CaCl<sub>2</sub> frío y conservar durante 5 min en hielo.
7. Colectar las células por centrifugación (5 min, 4000 rpm, 4°C).
8. Resuspender las células en frío, 2 ml de 100 mM de CaCl<sub>2</sub> suplementado con 15% de glicerol.
9. Preparar alícuotas de 200 ul en tubos de microcentrifuga estériles y almacenar a -80°C.

## Anexo 5.

### Protocolo de purificación de plásmido usando *QIAprep Spin Miniprep Kit*

Se transfiere una colonia de un cultivo nuevo a un tubo de ensayo de 5 ml con LB líquido suplementado con antibiótico. Se incuba por 12 a 16 h a 37°C a 230 rpm. Las células se colectan por centrifugación a 4000 rpm por 7 min.

1. El pellet se resuspende en 250 µl de Buffer P1 y se transfieren a un tubo de microcentrifuga.
2. Se adicionan 250 µl de Buffer P2 y se mezclan por inmersión en 1-4 tiempos.
3. Luego se adicionan 350 µl de Buffer N3 y se mezclan por inmersión 4-6 tiempos.
4. Centrifugar por 10 min a 13000 rpm.
5. El sobrenadante se transfiere a una columna QIAprep, se centrifuga por 60 s y se descarta el sobrenadante.
6. Para lavar la columna se adicionan 0,75 ml de Buffer PE y se centrifuga durante 60 s a 13000 rpm.
7. Descartar lo filtrado en el tubo colector y pasar la columna a un nuevo tubo de centrifuga.
8. La muestra se diluye en 30 µl de H<sub>2</sub>O y se almacena a -80°C.

## Anexo 6

Protocolo para la síntesis de péptidos y producción de anticuerpos policlonales

Síntesis de péptidos:

La síntesis se lleva a cabo por el método manual en fase sólida utilizando la química Fmoc estándar en resina 2-Cl-tritilo en la escala de 0.2 mmol.

Todos los grupos de cadena lateral funcionales son protegidos con tritilo, tert-butilo o un grupo Boc.

DIC / HOBt es utilizado como reactivo activador y el 20% de piperidina en DMF como reactivo de desprotección.

La prueba de ninhidrina es empleada para monitorear la reacción de acoplamiento. Si el resultado es positivo, entonces se realiza el doble acoplamiento seguido por la limitación con anhídrido acético en DMF anhidro.

Después de elongación de la cadena peptídica, la resina de péptidos se trata con el reactivo K y el péptido es precipitado, lavado tres veces con éter etílico anhidro.

Purificación:

Los péptidos en bruto se disuelven en 10% de acetonitrilo y son analizados por HPLC en fase reversa en un sistema de Shimadzu 20<sup>a</sup>, utilizando aguas X- X-bridge column (i.d.4.6mm x 250 mm).

Condiciones de HPLC: Sistema de Shimadzu20, Aguas X--bridge column, i.d. 4.5mm x 250mm; gradiente: 5-95% B en 45 mins. Solvente A: 0,1% TFA, solvente B: 0,1% TFA en acetonitrilo. Detector de longitud de onda: 214nm y 254nm.

#### Protocolo de preparación de anticuerpos policlonales

Se emplearon dos conejos, con una hemorragia pre-inmune (1 ml), 2 hemorragias (4/ ml /conejo) y 4 inmunizaciones.

1. Suero pre-inmune: 1 ml de suero se puede suministrar el día de la primera inmunización. (A menos que se requiera chequear la primera hemorragia pre-inmune.)
2. Día 1. La primera inyección es con adyuvante de Freund completo (1:1), ya sea a los ganglios linfáticos, en el poplíteo o varios puntos en la parte posterior del conejo (subcutánea). Se recomienda 50 µg - 0,5 mg por inyección en conejo y de 0.5 ml a 1 ml de solución de antígeno.
3. Día 14. Primer estímulo con adyuvante de Freund incompleto (1:1), ya sea al área de los ganglios linfáticos o en las zonas subcutáneas (se suministro la misma cantidad que el anterior).
4. Día 21. Primer sangrado. Chequear la producción de anticuerpos y dejar que el laboratorio de anticuerpos analice los resultados.
5. Día 35. Segunda hemorragia inter-muscular con adyuvante de Freund incompleto (1:1) (cantidad igual que el anterior o menos).

6. Día 42. Hemorragia y prueba de ELISA para verificar si el estímulo prolongado es necesario después de la cuarta inmunización.
7. Día 56. El estímulo final se realiza con adyuvante de Freund incompleto (1:1) (cantidad igual que el anterior o inferior).
8. Día 63. El tercer sangrado y la tercera prueba de ELISA se realiza para verificar si se puede dar fin a las inmunizaciones
9. Día 64. Después de la prueba ELISA, se desangran a los animales para obtener el antisuero o anticuerpos purificados.

## Anexo 7.

### Protocolo de ELISA indirecto de PMTV usando anti\_CP\_RT.

1. Se pesan aproximadamente 100 mg de tejido vegetal y se maceran en buffer de extracción de la compañía Bioreba (Suiza) (Buffer de extracción 1X, suplementado con 10g de albumina de huevo en 1000 ml de Buffer de extracción) para tejido de raíz o en buffer PBS (pH 7,4) para tejido foliar.
2. Se adicionan 200 µl del homogenizado a cada pozo de poliestireno y se incuba en cámara húmeda durante 1 hora.
3. Se realizan tres lavados de los pozos con Buffer PBS-T (PBS suplementado con 0.05% Tween 20).
4. Se adicionan 200 µl de anticuerpo anti\_CP\_RT (1:1000) y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente o alternativamente a 4°C durante toda la noche.
5. Los pozos son lavados 4 veces con PBS-T.
6. Se adicionan 200 µl de anticuerpos anti-conejo conjugados a fosfatasa alcalina (1:1000) (Biorad) y se incuban por 1 hora,
7. Para realizar el revelado se adicionan 200 µl de una solución de revelado (4 ml de H<sub>2</sub>O, 1 ml de Buffer sustrato 25X, 1 pastilla de con p-nitrofenil fosfatasa (1mg/ml)). El plato se incuba en oscuridad por 30 min y los resultados se evalúan en un equipo lector de placas.

## Anexo 8.

Protocolo de DAS-ELISA de PMTV con anti\_CP de la compañía BIOREBA.

1. *Coating*: absorción de anticuerpos específicos a la superficie de las celdas de poliestireno. Se diluye IgG 1000X en buffer *Coating*; por ejemplo 20 µl de IgG en 20 ml de buffer *Coating*. En cada celda se adicionaron 200 µl, se cubren los platos en cámara húmeda y se incuban a 30°C por 4 horas o 4-6°C toda la noche.
  - 1a. Lavado. Enjuagar las celdas de 3 a 4 veces con buffer de lavado PBS-T (PBS suplementado con 0.05% Tween 20). Remover cualquier rastro de líquido utilizando las toallas de papel.
2. Antígeno. Incubación de extracto de planta. Se homogenizan las muestras 1:20 en Buffer de extracción (buffer de extracción de Bioreba para raíz y buffer PBS para tejido foliar), se adicionan 200 µl del homogeneizado en las celdas, se cubren los platos en cámara húmeda y se incuban a 4°C durante toda la noche.
  - 2a. Lavar de forma similar a 1a.
3. Conjugado. Incubación de anticuerpos marcados con enzima conjugada. Diluir la enzima conjugada 1000X en buffer *conjugate*, adicionar 200 µl en cada celda y cubrir el plato en cámara húmeda, incubar a 30°C por 5 horas.
  - 3a. Lavar de forma similar a 1a.
4. Reacción de color del sustrato que indica a una muestra infectada. Disolver p-nitrofenil fosfatasa a 1mg/ml en buffer *Sustrate*, adicionar 200

$\mu$ l en cada celda e incubar a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción y desarrollo del color se observan después 30 a 120 minutos y se cuantifican por fotometría a 405 nm.

## Anexo 9.

### Análisis Bioinformático del Pep\_CP\_RT de PMTV.

Para confirmar que la secuencia peptídica EDKRIRKERLKDKDN es única para PMTV y que solo pueda ser reconocida por los anticuerpos anti\_CP\_RT, se realizó un BLAST en donde se contrasta la secuencia peptídica con secuencias de los diferentes organismos reportadas en la base de datos de GenBank (Figura 31). Con un porcentaje de identidad del 83% pero con una cobertura de solo 80%, la secuencia se relacionó con un producto proteínico de *Clostridium beijerinckii* (YP\_001310697.1), una bacteria común del suelo.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">YP_001310697.1</a>	hypothetical protein Cbei_3621 [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]	33.3	33.3	80%	0.88	83%	<a href="#">G</a>
<a href="#">CBY32679.1</a>	unnamed protein product [Oikopleura dioica]	32.3	33.3	66%	0.90	90%	
<a href="#">ZP_02618625.1</a>	conserved hypothetical protein [Clostridium botulinum BF] >gb EDT	32.9	32.9	100%	1.2	65%	
<a href="#">XP_007465595.1</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g041830 [Sorghum bicolor] >g	32.9	32.9	66%	1.3	90%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>
<a href="#">EHR83244.1</a>	PF03618 domain protein [Staphylococcus epidermidis VCU118] >gt	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">EHM73056.1</a>	PF03618 domain protein [Staphylococcus epidermidis 14.1.R1.SE]	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">EHQ73370.1</a>	PF03618 domain protein [Staphylococcus epidermidis VCU041] >gt	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">EHM69429.1</a>	hypothetical protein SEVCU071_0281 [Staphylococcus epidermidis]	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">EGS75016.1</a>	hypothetical protein SEVCU105_2231 [Staphylococcus epidermidis]	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">EFV89118.1</a>	conserved hypothetical protein [Staphylococcus epidermidis FRI90]	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">ZP_07841100.1</a>	putative phosphotransferase [Staphylococcus caprae C87] >gb EI	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">ZP_04797280.1</a>	protein of hypothetical function DUF299 [Staphylococcus epidermi	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">ZP_03614424.1</a>	protein in Sigma70 operon (ORF30) [Staphylococcus capitis SK14]	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">NP_764805.1</a>	hypothetical protein SE1250 [Staphylococcus epidermidis ATCC 12	32.0	32.0	86%	2.2	60%	<a href="#">G</a>
<a href="#">EHS01275.1</a>	PF03618 domain protein [Staphylococcus epidermidis VCU128]	32.0	32.0	86%	2.2	60%	
<a href="#">CCD34594.1</a>	hypothetical protein [Botryotinia fuckeliana]	32.0	32.0	93%	2.3	59%	
<a href="#">EG162703.1</a>	Peroxidasin [Acromyrmex echinator]	32.0	32.0	86%	2.3	67%	
<a href="#">Q05327.1</a>	RecName: Full=Putative phosphotransferase in Sigma70 operon; Al	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">EHT47238.1</a>	putative phosphotransferase yqfL [Staphylococcus aureus subsp.	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">EHQ90980.1</a>	PF03618 domain protein [Staphylococcus aureus subsp. aureus 21	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">ZP_05147727.1</a>	hypothetical protein SS7213T_12317 [Staphylococcus simiae CCM	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">YP_005325920.1</a>	unnamed protein product [Staphylococcus aureus subsp. aureus N	31.6	31.6	73%	3.1	77%	<a href="#">G</a>
<a href="#">EGG97732.1</a>	hypothetical protein SEVCU121_1181 [Staphylococcus epidermidis]	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">ZP_06327074.1</a>	phosphotransferase [Staphylococcus aureus subsp. aureus C427]	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">ZP_04867352.1</a>	protein of hypothetical function DUF299 [Staphylococcus aureus s	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">ZP_04819442.1</a>	protein of hypothetical function DUF299 [Staphylococcus epidermi	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">ZP_04678587.1</a>	putative phosphotransferase [Staphylococcus warneri L37603] >g	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">YP_188460.1</a>	hypothetical protein SACOL1620 [Staphylococcus aureus subsp. a	31.6	31.6	73%	3.1	77%	<a href="#">G</a>
<a href="#">NP_372087.1</a>	hypothetical protein SAV1563 [Staphylococcus aureus subsp. aure	31.6	31.6	73%	3.1	77%	<a href="#">G</a>
<a href="#">EHS74544.1</a>	PF03618 domain protein [Staphylococcus aureus subsp. aureus IS	31.6	31.6	73%	3.1	77%	
<a href="#">CBL16054.1</a>	polyribonucleotide nucleotidyltransferase [Ruminococcus bromii L2	31.6	31.6	73%	3.2	82%	

Figura 31. Resultados obtenidos a partir del BLAST del péptido CP\_RT, excluyendo las secuencias de PMTV.

El alineamiento de la primera secuencia reportada en el BLAST excluyendo las secuencias de PMTV es:

```
□ ref|YP_001310697.1|      hypothetical protein Cbei_3621
[Clostridium beijerinckii NCIMB
8052]
gb|ABR35741.1|    hypothetical protein Cbei_3621 [Clostridium
beijerinckii NCIMB
8052]
Length=272
```

```
GENE ID: 5294787 Cbei 3621 | hypothetical protein
[Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]
```

```
Score = 33.3 bits (71), Expect = 0.88
Identities = 10/12 (83%), Positives = 10/12 (83%), Gaps =
0/12 (0%)
```

```
Query    4    RIRKERLKDKDN    15
          RIR E LKDKDN
Sbjct   33    RIRNEILKDKDN    44
```

Posteriormente, se realizó un segundo BLAST con el péptido, sólo contra las secuencias del GenBank reportadas para plantas del orden Solanales (Figura 32), encontrando un porcentaje de identidad máximo de 71% con un porcentaje de cobertura de 80%, con la proteína 8-like conjugada a Ubiquitina de *Solanum tuberosum*.

En el alineamiento se observan pocos aminoácidos acoplados a la secuencia blanco, de los aminoácidos alineados se presentan inserciones, deleciones y cambios en aminoácidos, lo que implica cambios de la carga peptídica, por tanto es poco probable que los anticuerpos sintetizados puedan reaccionar con otra secuencia proteínica diferente a la de CP-RT.

Sequences producing significant alignments:									
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links		
<a href="#">AFA86326.1</a>	ubiquitin-protein ligase [Solanum nigrum]	22.7	22.7	80%	0.23	71%			
<a href="#">ADW66140.1</a>	ubiquitin-conjugating enzyme E2,Ubiquitin-protein ligase [Solanum	22.7	22.7	80%	0.23	71%			
<a href="#">AFA86328.1</a>	ubiquitin-conjugating enzyme E2 [Solanum nigrum]	22.7	22.7	80%	0.23	71%			
<a href="#">NP_001234437.1</a>	ubiquitin conjugating enzyme E2 [Solanum lycopersicum] >emb CA	22.7	22.7	80%	0.23	71%	<a href="#">UG</a>		
<a href="#">ABA81863.1</a>	ubiquitin-conjugating enzyme 8-like [Solanum tuberosum]	22.7	22.7	80%	0.23	71%			
<a href="#">AAR83891.1</a>	ubiquitin-conjugating enzyme 8 [Capsicum annuum] >gb ABB54487	22.7	22.7	80%	0.23	71%			
<a href="#">NP_001234247.1</a>	ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa [Solanum lycopersicum] >	22.7	22.7	80%	0.23	71%	<a href="#">UG</a>		
<a href="#">AAB63275.1</a>	resistance complex protein I2C-2 [Solanum lycopersicum]	22.7	22.7	46%	0.23	86%			
<a href="#">BAD15110.2</a>	similar to CDK5 regulatory subunit-associated protein [Nicotiana ta	22.3	22.3	40%	0.33	100%			
<a href="#">NP_001233780.1</a>	heat shock protein 70 [Solanum lycopersicum] >gb ABW76421.1	22.3	35.2	93%	0.33	100%	<a href="#">UG</a>		
<a href="#">AAR89518.1</a>	60S ribosomal protein L13a [Capsicum annuum]	21.4	21.4	60%	0.66	78%			
<a href="#">BAJ21224.1</a>	acyltransferase-like [Solanum melongena]	21.4	21.4	46%	0.66	88%			
<a href="#">NP_001234847.1</a>	cytochrome P450 71 family protein [Solanum lycopersicum] >gb A	21.4	46.5	86%	0.66	100%	<a href="#">G</a>		
<a href="#">ABO15685.1</a>	NBS-NBS-LRR type disease resistance protein [Ipomoea batatas]	21.4	31.0	66%	0.66	100%			
<a href="#">YP_173352.1</a>	hypothetical protein NitaMp002 [Nicotiana tabacum] >dbj BAD834	21.0	21.0	53%	0.92	75%	<a href="#">G</a>		
<a href="#">ACA53560.1</a>	MADS-box transcription factor PFSOC1 [Physalis pubescens]	21.0	21.0	73%	0.93	42%			
<a href="#">CAA53782.1</a>	transcription factor [Nicotiana tabacum]	21.0	21.0	73%	0.93	42%			
<a href="#">BAE16174.1</a>	polyamine oxidase [Nicotiana tabacum]	21.0	21.0	46%	0.94	70%			
<a href="#">AEP82776.1</a>	terpene synthase [Solanum lycopersicum]	21.0	21.0	53%	0.94	75%			
<a href="#">YP_001542576.1</a>	hypothetical chloroplast RF19 [Cuscuta exaltata] >sp ABW3G9.1	21.0	61.5	66%	0.94	100%	<a href="#">G</a>		
<a href="#">NP_001234162.1</a>	cytoplasmic ribosomal protein S13 [Solanum lycopersicum] >gb AA	20.6	29.7	66%	1.3	100%	<a href="#">UG</a>		
<a href="#">ABB86273.1</a>	cytoplasmic ribosomal protein S13-like [Solanum tuberosum]	20.6	29.7	66%	1.3	100%			
<a href="#">ACE81174.1</a>	putative disease resistance protein CC-NBS-LRR [Solanum demissu	20.6	31.4	60%	1.3	86%			
<a href="#">AAT40507.2</a>	40S ribosomal protein S13, putative [Solanum demissum]	20.6	29.7	66%	1.3	100%			
<a href="#">ABB00411.1</a>	I2 [Capsicum annuum]	20.6	20.6	46%	1.3	86%			
<a href="#">ABB00406.1</a>	I2 [Capsicum annuum]	20.6	20.6	46%	1.3	86%			
<a href="#">ABB00413.1</a>	I2 [Capsicum annuum]	20.6	20.6	46%	1.3	86%			
<a href="#">ABB00401.1</a>	I2 [Capsicum annuum]	20.6	20.6	46%	1.3	86%			
<a href="#">ABB72809.1</a>	60S ribosomal protein L7A-like protein [Solanum tuberosum]	20.6	39.5	73%	1.3	78%			
<a href="#">ABB87129.1</a>	60S ribosomal protein L7A-like [Solanum tuberosum]	20.6	39.5	73%	1.3	78%			
<a href="#">ACF22051.1</a>	NBS-coding resistance gene protein [Nicotiana tabacum]	20.6	36.5	46%	1.3	100%			

Figura 32. Resultados obtenidos a partir del BLAST del péptido CP\_RT, solo contra secuencias de plantas del orden Solanales.

El alineamiento de la primera secuencia reportada en el BLAST contra Solanales es:

```

□ gb|ABA81863.1|      ubiquitin-conjugating enzyme 8-like
[Solanum tuberosum]
Length=148

```

```

Score = 22.7 bits (46), Expect = 0.23
Identities = 10/14 (71%), Positives = 10/14 (71%), Gaps =
3/14 (21%)

```

```

Query 3 KRIRKERLKD--KD 14
      KRI KE LKD KD
Sbjct 4 KRILKE-LKDLQKD 16

```

## Anexo 10

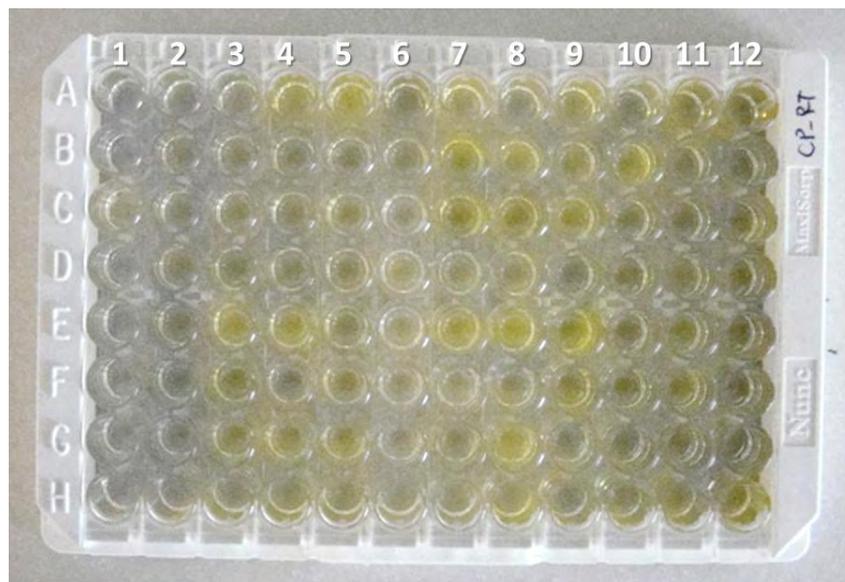


Figura 33. Foto de detección mediante ELISA indirecto de CP-RT de PMTV en tejido foliar y raíces de plantas de *S. tuberosum* y *N. benthamiana* procedentes de muestras de los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Boyacá y Nariño. Pozo A(1): Buffer PBS, pozo B(1): Buffer Bioreba, pozo C(1): Péptido Pep\_CP\_RT (5 $\mu$ M).