

DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN POR RT-PCR DEL *POTATO VIRUS Y* (PVY)

Design of primers for specific detection of Potato Virus Y (PVY) by RT-PCR

Andrea SIERRA MEJÍA¹, Yuliana GALLO GARCÍA², Pablo Andrés GUTIÉRREZ SÁNCHEZ¹, Mauricio Alejandro MARÍN MONTOYA^{3*}.

¹Laboratorio de Microbiología Industrial, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Carrera 65 n°. 59A - 110, Medellín, Colombia.

²Facultad de Medicina, Universidad CES, Calle 10 A n°. 22 - 04, Medellín, Colombia.

³Laboratorio de Biología celular y molecular, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Carrera 65 n°. 59A - 110, Medellín, Colombia.

*For correspondence: mamarinm@unal.edu.co

Received: 29th November 2018, Returned for revision: 07th March 2019, Accepted: 14th March 2019.

Associate Editor: Geraldo Mäder.

Citation/Citar este artículo como: Sierra A, Gallo Y, Gutiérrez PA, Marín M. Diseño de cebadores específicos para la detección por RT-PCR del *Potato Virus Y* (PVY). Acta biol. Colomb. 2019;24(3):561-565. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n3.76523>

RESUMEN

El *Potato virus Y* (PVY) es uno de los virus más limitantes para la producción de papa (*Solanum tuberosum* y *S. phureja*) en el mundo. Este virus es transmitido por tubérculo-semilla de papa y por diferentes especies de áfidos. Para su manejo es fundamental la siembra de tubérculos certificados por su sanidad viral, para lo que se requieren metodologías de detección altamente sensibles como ELISA y RT-PCR. Para éstas últimas pruebas, es necesario disponer de cebadores específicos que permitan el diagnóstico del virus en tejidos asintomáticos. En este estudio se reportan los cebadores PVY_Col para la detección del PVY en RT-PCR convencional y en tiempo real (RT-qPCR). Estos cebadores fueron diseñados con base en las secuencias de este virus que se han reportado en Colombia sobre diferentes hospedantes, así como de las diferentes variantes encontradas en el mundo. Una particularidad adicional de estos cebadores es que no presentan reacción cruzada con el genoma del *Potato virus V* (PVV), otro potyvirus que recientemente se ha encontrado afectando cultivos de papa en Colombia. Se espera que los cebadores PVY_Col sean utilizados para apoyar los programas de certificación de material de siembra de papa, así como para adelantar estudios epidemiológicos y de manejo fitosanitario de este virus.

Palabras clave: Detección molecular, Papa, *Potyvirus*, Secuenciación, Solanaceae.

ABSTRACT

Potato virus Y (PVY) is one of the most limiting viruses in the production of potato (*Solanum tuberosum* and *S. phureja*) worldwide. This virus is transmitted by aphids and infected tuber-seeds, and for this reason, disease management of PVY requires, among others, using certified planting material through highly sensitive techniques such as ELISA and RT-PCR. However, RT-PCR-based methods require primers of high specificity to allow the unequivocal detection of viruses in asymptomatic tissues. In this work, we report a new set of primers (PVY_Col) for detection of PVY by RT-PCR and real-time RT-PCR (RT-qPCR). These primers were designed using sequences of PVY isolates from Colombia and the rest of the world. An essential feature of these primers is their specificity, since they don't amplify templates from *Potato virus V* (PVV), a close PVY relative that also infects potato crops in Colombia. It is expected that the PVY_Col primer set will be useful to support potato seed certification programs, epidemiological studies, and PVY disease management programs.

Keywords: Molecular detection, Potato, *Potyvirus*, Sequencing, Solanaceae.

El *Potato virus Y* (PVY) (*Potyvirus*, *Potyviridae*) es uno de los virus más limitantes para la producción de papa en todo el mundo al causar reducciones del 40-70% en los rendimientos de los cultivos (Nolte *et al.*, 2004; Kerlan, 2008). Algunas de sus variantes (ej. PVY^{NTN}) pueden causar la enfermedad de los anillos necróticos de los tubérculos (PNTRD), afectando su calidad comercial y su utilidad como material de siembra (Haltermann *et al.*, 2012; Karasev y Gray, 2013). La infección de PVY en papa y en otros hospedantes de la familia Solanaceae (ej. tomate, lulo, pimentón) se manifiesta por una diversidad de síntomas que incluyen mosaicos, rugosidad foliar, necrosis de nervaduras y PTNRD (Haltermann *et al.*, 2012; Karasev y Gray, 2013). El PVY es transmitido por diferentes especies de áfidos, por herramientas de trabajo y por material de siembra vegetativo (Fageria *et al.*, 2013). Hasta el momento se han encontrado al menos nueve variantes de PVY que difieren en sus características biológicas, serológicas y moleculares, pero que pueden ser divididas en dos serotipos: Ordinario (O) y Necrótico (N); el primero incluye las cepas PVY^O, PVY^{N:O}, PVY^{N-Wi} y PVY^C; y el segundo a PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^E, PVY^Z, PVY^{NA-N} y PVY^{NE11} (Karasev y Gray, 2013; Treder *et al.*, 2018). La identificación del PVY tanto en tejido foliar como en brotes de tubérculos se realiza mediante pruebas de ELISA (Fageria *et al.*, 2013; Stammler *et al.*, 2018), así como con pruebas moleculares como RT-PCR convencional (Singh *et al.*, 2000; 2013; Lorenzen *et al.*, 2006); RT-qPCR (Agindotan *et al.*, 2007; Hühnlein *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013) y LAMP (Treder *et al.*, 2018). En Colombia, se han identificado en cultivos de papa común (*Solanum tuberosum*) y de papa criolla (*S. phureja*), las cepas PVY^N, PVY^{NTN} y PVY^O (Gil *et al.*, 2011; Villamil *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2016 a, b; Riascos *et al.*, 2018), y adicionalmente dos variantes divergentes (I-Col y IV-Col) encontradas en papa y tomate de árbol (Henaó *et al.*, 2013). Recientemente, en un estudio tendiente a identificar con pruebas de RT-PCR convencional y secuenciación los potyvirus que afectan los cultivos de papa común y criolla en el oriente de Antioquia (Colombia), no se encontró la presencia del *Potato virus A* (PVA), pero sí de PVY y del *Potato virus V* (PVV); aunque sorpresivamente el primero sólo se detectó en *S. tuberosum* y el segundo en *S. phureja* (Riascos *et al.*, 2018). Con el fin de corroborar dicha situación, en el presente estudio se evaluó la infección de estos virus en diez muestras de tejido foliar de papa común cv. Diacol-Capiro y diez muestras de papa criolla cv. Criolla-Colombia obtenidas en cultivos del municipio de Marinilla (Antioquia), pero en este caso utilizando pruebas de ELISA y de RT-qPCR. Para la detección serológica de PVY se utilizaron pruebas de TAS-ELISA (SRA 20001), mientras que para PVV se empleó el formato de DAS-ELISA (SRA 10100) (Agdia, EEUU). Para la prueba de RT-qPCR, se procedió a la extracción del ARN total con el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y posteriormente la síntesis de cDNA se realizó en un volumen de 20 µL con 200 U de la

retro-transcriptasa (Maxima RT), 1X de buffer RT, 0,5 mM de los cuatro dNTPs, 100 pmol del cebador Oligo-(dT)18 y 20 U de inhibidor de ARNAsas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Las reacciones se incubaron a 65 °C por 5 min, seguidos de 50 °C por 30 min y finalmente a 85 °C por 5 min en un equipo T3 thermal cycler (Biometra, Germany) (Muñoz *et al.*, 2016b). Las reacciones de qPCR se realizaron con el kit Maxima SYBR Green/ROX Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, EEUU), con los cebadores PVY-1 FP (5'CCAATCGTTGAGAATGCAAAAC3') y PVY-1 RP (5'ATATACGCTTCTGCAACATCTGAGA3') diseñados por Singh *et al.*, (2013) para amplificar 74 pb de la cápside viral (CP) de PVY y con los cebadores PVV_phu_F (5'ATGCTGGAAAAGATCCAGC3') y qPVV_phu_R (5'CATCCCGCTCCTCAAC3') diseñados por Álvarez *et al.*, (2016) para amplificar un fragmento de 89 pb de CP. Los resultados de las pruebas de ELISA detectaron al PVY en seis de las muestras de papa común cv. Diacol-Capiro, pero no en ninguna de las muestras de papa criolla; mientras que PVV se detectó en cuatro de las muestras de papa criolla y en ninguna de papa común. Estos resultados, además de llamar la atención de los altos niveles de infección de las muestras bajo análisis, apoyaban los hallazgos antes mencionados de Riascos *et al.*, (2018). Sin embargo, al realizar las pruebas de RT-qPCR, el PVY se encontró en ocho de las diez muestras de papa criolla y en la totalidad de las muestras de papa común; y dicho resultado se mantuvo prácticamente invariable aún después de repetir las reacciones con aumentos sucesivos de temperatura de anillamiento desde 52 °C hasta 62 °C. Los valores de ciclo umbral (CT) y de temperatura de desnaturalización (Tm) para las muestras positivas se ubicaron en el rango de 29,41 - 35 y 77,3 - 78 °C, respectivamente, confirmándose los valores previos de Tm (77,5 ± 0,5 °C) encontrados por Medina *et al.*, (2015). Para el caso de PVV, cinco de las muestras de papa criolla resultaron positivas para este virus, y ninguna de las muestras de papa común. Los valores de Ct encontrados se presentaron en el rango de 16,41 a 21,11 y los de Tm entre 79,5 °C y 80,5 °C, lo que concuerda con el reporte original de Álvarez *et al.*, (2016) para estos cebadores (Tm=78,7 °C -80,2 °C). La clara discrepancia entre los resultados encontrados para PVY con las pruebas de ELISA y RT-qPCR, nos condujeron a evaluar *in silico* la especificidad de los cebadores PVY-1 FP/RP utilizando como base de comparación los genomas de aislamientos colombianos de PVV y PVY recientemente publicados (Álvarez *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2016a, b), además de otros genomas de referencia disponibles en GenBank. En dichos análisis, efectivamente se encontró una región de CP de PVV compatible con la amplificación por estos cebadores de PVY y por tanto se decidió diseñar un nuevo par de cebadores para la detección de PVY sin reactividad cruzada con PVV (Figura 1). De esta forma, se repitió el experimento de detección bajo las mismas condiciones antes descritas,

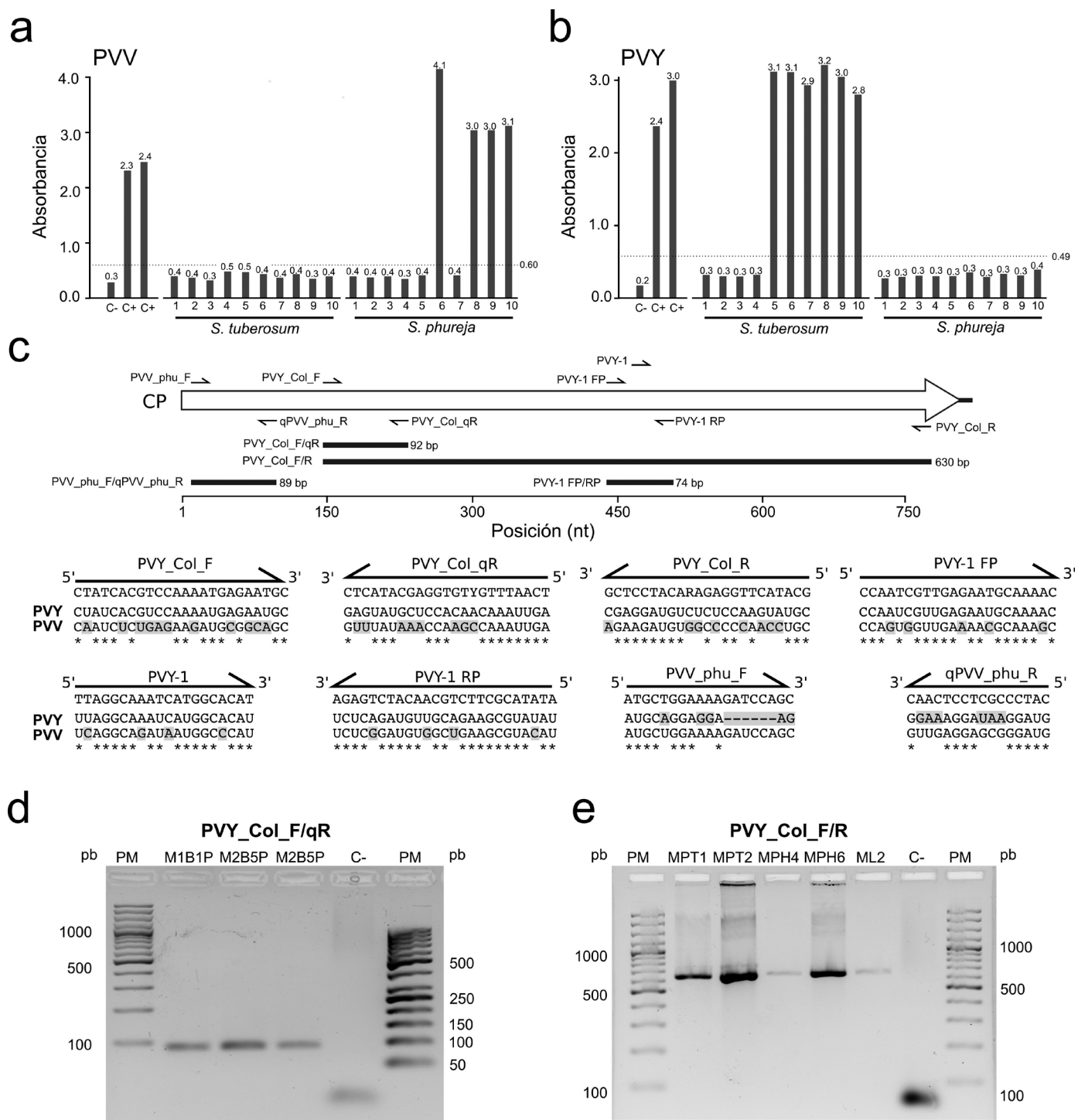


Figura 1. a y b) Detección por pruebas de ELISA de los virus PVV y PVY en diez muestras de papa común cv. Diacol-Capiro y de papa criolla cv. Criolla-Colombia del Oriente de Antioquia. Las muestras positivas son aquellas en las que las barras sobrepasan la línea punteada. Esta línea indica el punto de corte de valores de absorbancia obtenidos en el revelado de la prueba. c) Secuencias y ubicación de los cebadores diseñados en este trabajo (PVY_Col) y en otros reportes para la detección de PVY y PVV. Los nucleótidos sombreados en los genomas de PVY y/o PVV corresponden a los sitios no complementarios para cada cebador. d y e) Corridos electroforéticos de los amplicones obtenidos a partir de reacciones de RT-qPCR y RT-PCR convencional con los cebadores diseñados en este trabajo. PM: Marcador de peso molecular de 100 pb y/o 50 pb. C-: Control negativo.

pero en este caso con los cebadores PVY_Col_F (5'CTATCACGTCCAAAATGAGAATGC3') y PVY_Col_qR (5'TCAATTTGTYGTGGAGCATACTC3') que amplifican 92 pb de CP. Adicionalmente, se diseñó el cebador PVY_Col_R (5'GCATACTTGGAGARACATCCTCG3') para su utilización con PVY_Col_F en reacciones de RT-PCR convencional para amplificar una región de 630 pb de CP. Estos cebadores se evaluaron en cuatro muestras de papa y una de lulo (*S. quitoense*) (control positivo), siguiendo las condiciones descritas por Riascos *et al.*, (2018). Los resultados con los nuevos cebadores diseñados para RT-qPCR indicaron la presencia de PVY en una de las diez muestras de papa criolla evaluadas (Ct = 23,64; Tm = 76,5 °C), mientras que en papa común el virus se detectó en ocho de las muestras con valores de Ct en el rango de 8,56 a 15,66 y de Tm= 77-77,8 °C. Para el caso de las reacciones de RT-PCR convencional, el uso de los nuevos cebadores permitió obtener los amplicones del tamaño esperado en las cinco muestras evaluadas para este fin (Figura 1), confirmando su naturaleza viral por secuenciación Sanger, al presentar 99 % de identidad (cobertura = 100 %; valor e = 0,0) con secuencias de la región CP de cepas de PVY^{NTN} previamente depositadas en GenBank (ej. MF176820, MF176827, MF176821) por Riascos *et al.*, (2018). Los hallazgos de este trabajo sobre la reactividad cruzada de los cebadores PVY-1 FP/RP con el genoma de PVV, hacen necesario reevaluar su uso para la detección de PVY en sistemas de RT-qPCR con SYBR-Green; aunque es probable que su utilización con la sonda PVY-1 (5'-FAM TTA GGC AAA TCA TGG CAC AT MGB-NFQ-3') que originalmente reportaron Singh *et al.*, (2013) ofrezca la especificidad requerida para PVY. El diseño de los cebadores PVY_Col amplía las herramientas disponibles para la detección molecular de este virus (Lorenzen *et al.*, 2006; Agindotan *et al.*, 2007; Hühnlein *et al.*, 2013; Treder *et al.*, 2018), no sólo en Colombia sino en otras partes del mundo donde se presenta la coinfección de varios potyvirus en los cultivos de papa y muy especialmente en países como Perú (Spetz *et al.*, 2003), Estados Unidos (Shiel *et al.*, 2004), Irán (Shamsadden-Saeed *et al.*, 2014) Holanda, Reino Unido y Noruega (Oruetxebarria *et al.*, 2000) donde PVV y PVY se han registrado afectando diferentes variedades de *S. tuberosum*. Se espera que los cebadores PVY_Col en conjunto con los PVV_phu_F/R diseñados por Álvarez *et al.*, (2016) para PVV, sean utilizados en programas de certificación de tubérculo-semilla, estudios epidemiológicos y manejo fitosanitario de estos potyvirus en cultivos de papa y de otras solanáceas susceptibles a su infección.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Colombia (Proyecto 40817) y por la Universidad CES (Proyecto: INV032017003).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2007;142(1-2):1-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.12.012>
- Álvarez D, Gutiérrez P, Marín M. Caracterización molecular del *Potato virus V* (PVV) infectando *Solanum phureja* mediante secuenciación de nueva generación. *Acta biol. Colomb*. 2016;21(3):521-531. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v21n3.54712>
- Fageria MS, Singh M, Nanayakkara U, Pelletier Y, Nie X, Wattie D. Monitoring current-season spread of *Potato virus Y* in potato fields using ELISA and real-time RT-PCR. *Plant Dis*. 2013;97(5):641-644. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0283-RE>
- Gil JF, Cotes JM, Marín M. Incidencia de potyvirus y caracterización molecular de PVY en regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Colombia. *Rev Col Biotecnol*. 2011;13(1):85-93.
- Gutiérrez P, Jaramillo-Mesa H, Marín-Montoya M. Genome sequence of a divergent Colombian isolate of potato virus V (PVV) infecting *Solanum phureja*. *Acta Virol*. 2016;60(1):49-54. Doi: https://doi.org/10.4149/av_2016_01_49
- Halterman D, Charkowski A, Verchot J. Potato viruses and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Tech*. 2012;6(1):1-14.
- Henao E, Gutiérrez P, Marín M. Análisis filogenético de aislamientos del *Potato virus Y* (PVY) obtenidos en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. *Actual Biol*. 2013;35(99):219-232.
- Hühnlein A, Drechsler N, Steinbach P, Thieme P, Schubert J. Comparison of three methods for the detection of potato virus Y in seed potato certification. *J Plant Dis Protect*. 2013;120:57-69. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF03356455>
- Karasev AV, Gray SM. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. *Annu Rev Phytopathol*. 2013;51(1):571-586. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102332>
- Kerlan C. Potato viruses. In: Mahy BW, van Regenmortel MH, editores. *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Oxford: Academic Press; 2008. p. 458-471.
- Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis*. 2006;90(7):935-940. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0935>
- Medina HC, Gutiérrez PA, Marín M. Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS ELISA y qRT-PCR en Antioquia (Colombia). *Bioagro*. 2015;27:83-92.

- Muñoz D, Gutiérrez P, Marín M. Detección y caracterización molecular del Potato virus Y (PVY) en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) del norte de Antioquia, Colombia. *Rev Prot Veg*. 2016a;31(1):1-11.
- Muñoz D, Gutiérrez P, Marín M. Detection and genome characterization of *Potato virus Y* isolates infecting potato (*Solanum tuberosum* L.) in La Union (Antioquia, Colombia). *Agron Colomb*. 2016b;34(3):317-328. Doi: <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n3.59014>
- Nolte P, Whitworth JL, Thornton MK, McIntosh CS. Effect of seedborne *Potato virus Y* on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato. *Plant Dis*. 2004;88(3):248-252. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.3.248>
- Oruetebarria I, Kekarainen T, Spetz C, Valkonen JPT. Molecular characterization of *Potato virus V* genomes from Europe indicates limited spatiotemporal strain differentiation. *Phytopathology*. 2000;90(4):437-444. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.4.437>
- Riascos M, Gutiérrez PA, Marin-Montoya MA. Identificación molecular de Potyvirus infectando cultivos de papa en el oriente de Antioquia (Colombia). *Acta biol. Colomb*. 2018;23(1):39-50. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.65683>
- Shamsadden-Saeed F, Massumi H, Moradi S, Maddahian M, Heydarnejad J, Pour AH, Varsani A. Incidence and characterization of *Potato virus V* infections in Iran. *Virus Dis*. 2014;25(1):78-84. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0178-4>
- Shiel PJ, Miller L, Slack SA, Berger PH. Isolation and partial nucleic acid characterization of a new isolate of *Potato virus V* with distinct biological and serological properties. *Plant Dis*. 2004;88(4):368-372. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.4.368>
- Singh RP, Nie X, Singh M. Duplex RT-PCR: Reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance. *J Virol Methods*. 2000;86(2):121-129. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00138-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00138-5)
- Singh M, Singh RP, Fageria MS, Nie X, Coffin R, Hawkins G. Optimization of a real-time RT PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of potato virus Y in dormant potato tubers. *Am J Potato Res*. 2013;90:43-50. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12230-012-9274-z>
- Spetz C, Taboada AM, Darwich S, Ramsell J, Salazar LF, Valkonen JP. Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the centre of origin in Peru. *J Gen Virol*. 2003;84(9):2565-2578. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.19208-0>
- Stammler J, Oberneder A, Kellermann A, Hadersdorfer J. Detecting potato viruses using direct reverse transcription quantitative PCR (DiRT-qPCR) without RNA purification: an alternative to DAS-ELISA. *Eur J Plant Pathol*. 2018;152(1):237-248. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1468-x>
- Treder K, Chołuj J, Zacharzewska B, Babujee L, Mielczarek M, Burzyński A, Rakotondrafara AM. Optimization of a magnetic capture RT-LAMP assay for fast and real-time detection of *potato virus Y* and differentiation of N and O serotypes. *Arch Virol*. 2018;163(2):447-458. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3635-3>
- Villamil-Garzón A, Cuellar WJ, Guzmán-Barney M. Natural co-infection of *Solanum tuberosum* crops by the *Potato yellow vein virus* and potyvirus in Colombia. *Agron Colomb*. 2014;32(2):213-223. Doi: <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n2.43968>