

IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE RNA EN CULTIVOS DE TOMATE DEL ORIENTE DE ANTIOQUIA (COLOMBIA) POR SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

Yuliana Gallo García¹, Laura Muñoz Baena², Luisa F. Toro Fernández², Pablo A. Gutiérrez Sánchez² y Mauricio Marín Montoya³

RESUMEN

Las enfermedades de origen viral son unas de las limitantes más importantes en los cultivos de tomate, siendo reportados en el mundo cerca de 136 especies de virus que afectan esta hortaliza. En Colombia sólo se han registrado unas 15 especies de virus en tomate, lo que indica la necesidad de continuar con la caracterización del viroma de este cultivo. En este trabajo se evaluó mediante técnicas moleculares como RT-PCR, RT-qPCR, secuenciación de nueva generación (NGS) y Sanger, la presencia de virus de RNA en muestras foliares de tomate var. Chonto del oriente de Antioquia. Los resultados de NGS identificaron la ocurrencia en las muestras de los virus Potato virus Y (PVY), Potato yellow vein virus (PYVV), Potato virus S (PVS) y Potato virus X (PVX), siendo posible mediante análisis bioinformáticos el ensamblaje de los genomas completos de los virus PVX (6428 nt) y PVS (8492 nt), al presentar el mayor número de *reads* en el transcriptoma analizado. La infección de los cuatro virus en cultivos de tomate en esta región fue confirmada mediante pruebas RT-qPCR y secuenciación Sanger de amplicones obtenidos para la cápside viral utilizando RT-PCR convencional. Estos resultados señalan la necesidad de fortalecer los programas de manejo integrado de enfermedades virales en los cultivos de tomate del país y representan los primeros reportes formales de PVS y PVX sobre este hospedante en Colombia.

Palabras clave adicionales: Carlavirus, Potexvirus, RT-PCR, secuenciación, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

Detection of RNA viruses in tomato crops from eastern Antioquia (Colombia) using next-generation sequencing (NGS)

Viral diseases are one of the most important limiting factors of the production of tomato. In the world about 136 viral species have been reported to infect this plant but only 15 have been registered in Colombia, thus far. The latter suggests that the tomato virome in Colombia is underrepresented. In this work, the diversity of RNA viruses infecting tomato var. Chonto crops in eastern Antioquia was evaluated by RT-PCR, RT-qPCR, Next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing. NGS revealed the presence of Potato virus Y (PVY), Potato yellow vein virus (PYVV), Potato virus S (PVS) and Potato virus X (PVX). PVX (6428 nt) and PVS (8492 nt) were the most abundant viruses and were completely assembled using the RNA-seq data. Infection by all four viruses was confirmed by RT-qPCR and Sanger sequencing of RT-PCR amplicons. These results highlight the need to strengthen the integrated disease management program for tomato in Colombia. This work is the first formal report of PVS and PVX naturally infecting tomato in Colombia.

Additional keywords: Carlavirus, Potexvirus, RT-PCR, sequencing, *Solanum lycopersicum*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de origen viral son uno de los factores bióticos más limitantes para la producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en todo el

mundo (Antignus, 2003; Jones et al., 2014); siendo hasta el momento reportadas unas 136 especies de virus, lo que resulta un número muy alto, si se compara con los registros en otros cultivos de solanáceas como papa (53 virus), pimentón (49

Recibido: Diciembre 5, 2019

Aceptado: Mayo 4, 2020

¹ Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia. e-mail: ygallo@ces.edu.co

² Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. e-mail: lamunozba@unal.edu.co, ltorof@unal.edu.co, paguties@unal.edu.co

³ Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. e-mail: mamarinm@unal.edu.co (autor de correspondencia)

virus) y berenjena (44 virus) (Hanssen et al., 2010).

El alto número de virus en este hospedante se puede explicar por la estrecha base genética que presentan los diferentes cultivares de tomate como resultado de su intenso proceso de mejoramiento genético, la siembra de monocultivos tanto a libre exposición como bajo invernadero y la alta susceptibilidad de este hospedante a diferentes insectos vectores de virus como moscas blancas, áfidos, trips y saltahojas (Hanssen et al., 2010; Prasannath et al., 2014).

Los begomovirus (género *Begomovirus*, familia Geminiviridae), virus de DNA de cadena sencilla (ssDNA) con genomas mono y bipartita tales como Tomato mottle virus (ToMoV), Tomato golden mosaic virus (TGMV), Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y Tomato yellow mosaic virus (TYMV) corresponden al grupo más extenso de virus reportado en tomate (Hanssen et al., 2010; Jones, 2014; Xu et al., 2017); mientras que se han registrado al menos 15 géneros de virus con genomas de RNA positivo (ssRNA+) (*Potyvirus*, *Tombusvirus*, *Cucumovirus*, *Alfamovirus*, *Tobamovirus*, *Nepovirus*, *Luteovirus*, *Tymovirus*, *Potexvirus*, *Crinivirus*, *Torradovirus*, *Anulavirus*, *Illavirus*, *Tomavirus* y *Carlavirus*) (Antignus, 2003; Jones, 2014; Saqibab et al., 2015); dos géneros de RNA negativo (ssRNA-) (*Tospovirus* y *Rhabdovirus*) (Jones, 2014; Xu et al., 2017) y un género de RNA de doble cadena (dsRNA) (*Amalgavirus*) (Padmanabhan et al., 2015). En Colombia se han reportado infectando cultivos de tomate virus de ocho de estos géneros (*Tobamovirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Begomovirus*, *Nepovirus*, *Torradovirus* y *Crinivirus*), siendo aparentemente las especies más incidentes: Tomato yellow mosaic virus (ToYMV), Potato yellow mosaic virus (PYMV) (Vaca-Vaca et al., 2012), Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV), Cucumber mosaic virus (CMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) y Potato virus Y (PVY) (Morales et al., 2009; Tamayo y Jaramillo, 2013; Muñoz et al., 2016, 2017).

El conocimiento de los viromas de hospedantes vegetales se encuentra en plena etapa de expansión, gracias a la reciente utilización de diversas metodologías moleculares de detección de virus, especialmente aquellas derivadas de la secuenciación masiva o en paralelo de nueva generación (NGS), que incluyen entre otras las

plataformas HiSeq 2000/2500 y MiSeq, 454 GS FLX, PacBio, IonTorrent y SOLiD (Roossinck et al., 2015; Wu et al., 2015). Estas metodologías permiten la detección, identificación y caracterización de los genomas virales sin la necesidad de un conocimiento previo de las especies o variantes virales a evaluar; es decir a diferencia de las metodologías basadas en PCR/RT-PCR o de las pruebas serológicas (ELISA, flujo lateral), no requieren de la disponibilidad de *primers*, sondas o anticuerpos específicos para la detección de los virus, pues se basan en el empleo de adaptadores genéricos que sirven de molde para los *primers* empleados en las reacciones de amplificación o secuenciación (Wu et al., 2015; Massart et al., 2017; Sierra et al., 2020). Adicionalmente, la disponibilidad de secuencias parciales o completas de los genomas virales identificados por NGS, sirven como base para el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en PCR/RT-PCR, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) o hibridización (Dot-blot, Tissue-print) (Massart et al., 2017).

Específicamente en tomate, el uso de NGS ha permitido en Colombia la secuenciación de los genomas completos de los virus PVY y PVV (Muñoz et al., 2016, 2017) y en otros países como EEUU, China y Australia de los virus Pepino mosaic virus (PepMV), Southern tomato virus (STV) y Tomato matilda virus (TMaV) (especie propuesta) (Adams et al., 2009; Padmanabhan et al., 2015; Saqibab et al., 2015). Recientemente, en un estudio que incluyó 170 muestras de tomate obtenidas en diferentes provincias de China utilizando NGS de RNA pequeños (siRNA), se detectaron 22 especies de virus de 12 géneros diferentes y dos viroides (Xu et al., 2017).

Para continuar con la identificación de virus que afectan los cultivos de tomate en Colombia, el objetivo del presente estudio fue realizar la secuenciación masiva de nueva generación del viroma de hojas de tomate con síntomas de mosaicos y amarillamientos obtenidas en cinco lotes de cultivo del oriente de Antioquia, y su posterior confirmación mediante pruebas de RT-PCR convencional y en tiempo real (RT-qPCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. En visitas de reconocimiento de enfermedades virales en cultivos de tomate var.

Chonto en el municipio de Marinilla (Antioquia) durante el año de 2016, se colectaron cuatro muestras foliares (5x) de igual número de lotes con síntomas de mosaicos y amarillamientos, presumiblemente asociados a infecciones virales. Estas muestras fueron mezcladas (*bulk*) y utilizadas para el análisis de su viroma mediante secuenciación NGS. Posteriormente en 2017, se obtuvieron cinco muestras aleatorias (5x) de tejido foliar de cultivos de tomate del municipio de Marinilla (4 muestras) y El Peñol (1 muestra), con el fin de evaluar por RT-qPCR, la presencia de los virus de RNA detectados mediante NGS.

Secuenciación de nueva generación. El RNA total de la muestra foliar compuesta y con síntomas de posible infección viral se extrajo utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo) y una vez evaluada su integridad en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) mediante el método RIN (RNA Integrity Number) (Imbeaud et al., 2006), se procedió a la remoción del RNA ribosomal con el kit Ribo-Zero rRNA Removal (Illumina). La librería de cDNA se sintetizó con el kit TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina) y la secuenciación NGS se ejecutó en un equipo HiSeq2000 (Illumina); ambos procedimientos se realizaron en la compañía Macrogen de Corea del Sur).

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a la remoción de las bases con baja calidad mediante el algoritmo Phred con el programa SeqTK (<https://github.com/lh3/seqtk>) y la asociación con secuencias de origen viral de los *reads* resultantes fue realizada mediante BLASTN utilizando una base de datos local construida por nuestro grupo con las secuencias disponibles de todas las especies virales reconocidas por el ICTV. Posteriormente, se realizó el ensamblaje de los genomas de los virus detectados utilizando el programa Trinity (Grabherr et al., 2011) y se identificaron los marcos abiertos de lectura (Open reading frames - ORF) mediante BLASTX y ORF finder (Gish y States, 1993). Finalmente, con las secuencias del gen de la cápside viral (CP) derivado de los genomas completos obtenidos en el estudio, se realizaron análisis filogenéticos para nucleótidos por el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood - ML) con el modelo de sustitución LG+G+I. Los alineamientos fueron realizados utilizando el

programa MUSCLE (Edgar, 2004) y los árboles filogenéticos con el software MEGA6 con 1000 réplicas de *bootstrap* (Tamura et al., 2013).

Detección de virus por RT-qPCR. En cada una de las cinco muestras compuestas (5x) de tejido foliar de tomate, se evaluó la presencia de los virus detectados en el análisis NGS (PVY, PVS, PYVV y PVX) utilizando *primers* específicos con pruebas de RT-qPCR en dos pasos. El RNA total fue extraído con el kit GeneJET Plant RNA Purification Mini (Thermo) a partir de 100 mg de tejido macerado con nitrógeno líquido y eluido en 40 μ L de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC). La concentración e integridad de la extracción fue evaluada por lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo). Las reacciones de retrotranscripción se realizaron por 30 min a 42°C con 200 U de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de RiboLock RNase Inhibitor, 100 ng de RNA total y 100 pmol del primer reverso Oligo (dT)18 (para PVY y PVS), o con los *primers* específicos PVXR (5' GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC 3') (Nie y Singh, 2001) y PYVV_R_CP (5' AGT TGC TGC ATT CTT GAA CAG G 3') (Álvarez et al., 2017), para los virus PVX y PYVV, respectivamente.

Para la PCR en tiempo real (qPCR) se utilizó el kit Maxima SYBR Green/ROX (Thermo) en un volumen total de 12,5 μ L con los *primers* específicos (0,3 μ M) PVS_gen_F (5' ATG CCG CCY AAA CCA GAT CC 3') y qPVS_gen_R (5' AGC ATK GCT TCY TCA TTT TGC CCT G 3') (Vallejo et al., 2016); PVY-1_FP (5' CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA C 3') y PVY-1_RP (5' ATA TAC GCT TCT GCA ACA TCT GAG A 3') (Singh et al., 2013); PVX_101-2_FP (5' AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC 3') y PVX_101-2_RP (5' GCT TCA GAC GGT GGC CG 3') (Agindotan et al., 2007); PYVV_F_CP (5' TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG-3') y qPYVV_R_CP (5' AGG TCT CAG GAT CTG GAT CAA CT-3') (Álvarez et al., 2017) y 50-100 ng de cDNA.

El programa consistió de 10 min a 95 °C para activar la Taq polimerasa, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 15 s y 52 °C por 45 s, utilizando un equipo Rotor-Gene Q-5plex (Qiagen, Alemania) para calcular los valores de ciclo umbral (Ct) y de temperatura de fusión (Tm) en el rango 50-

99 °C. Todas las reacciones tuvieron un control positivo y un control negativo, consistentes de tejido foliar infectado (+) o libre (-) de cada virus evaluado.

Variación genética de virus. Con el fin de evaluar la variabilidad de los cuatro virus identificados en los análisis de NGS, se procedió a la amplificación de la cápside de tres amplicones en muestras individuales de tomate, utilizando RT-PCR convencional con los *primers* específicos PVS_gen_F y PVS_gen_R (5' ACC TTC ART ATG ACK CCA AGC AAC ATG C 3') (Vallejo et al., 2016), PVXF (5' TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG 3') y PVXR (Nie y Singh, 2001), PVY-F (5' ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC 3') y PVY-R (5' TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT 3') (Nie y Singh, 2001); PYVV_F_CP y PYVV_R_CP (Álvarez et al., 2017).

Las condiciones de retrotranscripción fueron similares a las descritas anteriormente, mientras que el PCR convencional se realizó en un volumen de 25 µL con 1X de buffer de enzima (10X), 0,2 mM de cada dNTP, 1,8 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerasa (Thermo), 0,2 µM de los *primers* y 1 µL de cDNA.

El programa consistió de una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 50 s, 53 °C por 50 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,8 %, suplementado con GelRed 1X (Biotium) y visualizados en un equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Las bandas del tamaño esperado fueron purificadas directamente del gel utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo) y secuenciados por el método de Sanger en un equipo ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen. A partir de las secuencias obtenidas se generaron los consensos para la región obtenida de CP y se procedió a su alineamiento con el programa MUSCLE (Edgar, 2004) con respecto a secuencias disponibles en GenBank de cepas de ambos virus previamente reportadas en Colombia y en otros países. Finalmente, dichos alineamientos fueron utilizados para generar matrices de identidad a nivel de nucleótidos utilizando el programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuenciación de nueva generación. En el análisis NGS del transcriptoma de tomate se obtuvieron 5.571.097 *reads*, de los cuales cerca de 4.920.677 (88,32 %) correspondieron a secuencias asociadas al hospedante, especialmente a RNA mensajeros nucleares (22,84 %), transcritos cloroplásticos (15,89 %) y mitocondriales (6,97 %) y a otras secuencias de RNA (ej. transferencia, interferencia, ribosomal) (28,29 %). Adicionalmente, se detectaron secuencias reportadas en genomas de otras plantas solanáceas (12,34 %), hongos (0,05 %), bacterias (2,14 %) y virus (2,14 %) asociados a las muestras de tomate analizadas (Figura 1A).

Al separar el conjunto de datos correspondiente a los 134.370 *reads* putativamente de origen viral, se detectó en la muestra compuesta la infección principal por parte de los virus PVX (90.330 *reads*, 67,22 %) y PVS (34.954, 26,01 %), mientras que las secuencias de los virus PVY y PYVV se presentaron en niveles muy bajos, correspondientes al 3,51 y 3,11% del total de secuencias virales, respectivamente (Figura 1B).

A continuación, se presentan con detalle las características de los genomas de los virus PVX y PVS, mayoritariamente detectados en las muestras foliares, ya que los genomas completos de PVY y PYVV identificados en tomate para esta misma región, fueron reportados previamente por Muñoz et al. (2016; 2017). El set de datos original de NGS se sometió a GenBank bajo el código BioProject ID PRJNA625296.

PVX. Con los 90.330 *reads* asociados a PVX, se ensambló el genoma completo de 6.428 nt con una profundidad promedio de 1.405x, siendo posible detectar los cinco ORF virales que codifican para la replicasa viral (RdRP) entre las posiciones 78 y 4.448, el triple bloque de genes (25K: 4.479-5.159; 12K: 5.140-5.487; 8K: 5.420-5.632) y la proteína de la cápside (CP: 5.643-6.356) (Figura 2A). El tamaño putativo de las seis proteínas resultantes es de 1.456 aa, 226 aa, 115 aa, 70 aa, 237 aa, para los productos de los ORF 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Al realizar las comparaciones del genoma completo de PVX con las bases de datos moleculares, se encontró que dicha secuencia compartió un 97 % de identidad con aislamientos de PVX procedentes de papa en India (KR605396,

JF430080) y con accesiones depositadas en el Centro Internacional de la papa (CIP) en Perú (KU586452, KU586453). Los análisis filogenéticos realizados con base en CP, agruparon esta secuencia de PVX de tomate en el clado que representa el linaje eurasiático (Cox y Jones, 2010), el cual se separa con un valor de bootstrap de 100 % del linaje americano (Figura 2B). De forma interesante, tres aislamientos de PVX reportados en cultivos de papa en el departamento de Antioquia (Colombia) fueron los más cercanos a la cepa aquí reportada en tomate, lo que es un posible indicativo de la patogenicidad cruzada de este virus entre dichos hospedantes; sin

embargo, esto requiere ser confirmado experimentalmente mediante pruebas biológicas. La secuencia del genoma completo de este virus fue depositada en GenBank (MH282866) y corresponde al primer registro de este virus infectando tomate en Colombia. Aunque por mucho tiempo se ha identificado que PVX afecta cultivos de tomate en el mundo (Antignus, 2003), incluido Túnez (Moussa et al., 2000), España (Cueto et al., 2015) y Turquía (Arli-Sokmen y Sevlk, 2006), para nuestro conocimiento, este es el primer reporte del genoma completo de una cepa de PVX procedente de plantas de tomate naturalmente infectadas por este virus.

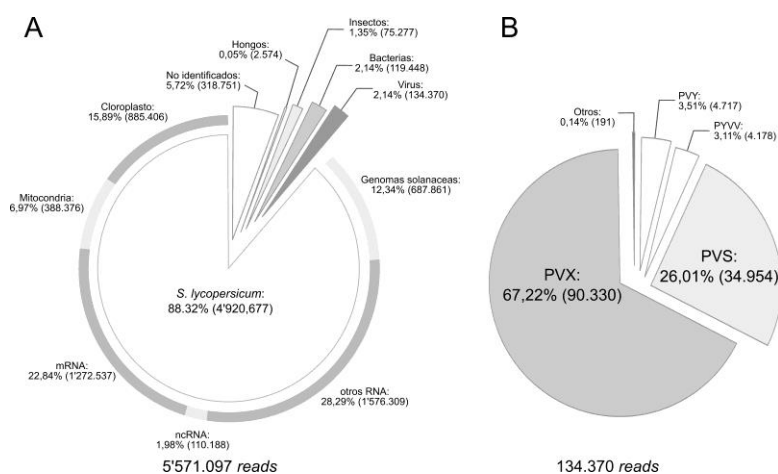


Figura 1. Distribución y asignación de los reads obtenidos en la secuenciación de nueva generación del transcriptoma de una muestra foliar compuesta (5x) de tomate obtenida en el oriente de Antioquia (Colombia).

PVS. Para el caso de PVS se obtuvieron 34.954 reads, con los cuales se logró el ensamblaje del genoma completo de 8.492 nt con una profundidad promedio de 411x, siendo posible detectar los seis ORF virales que codifican para la replicasa viral (RdRP) entre las posiciones 74 y 6.000, el triple bloque de genes (25K: 5.987-6.718; 12K: 6.696-7.022; 7K: 6.986-7.186), la proteína de la cápside (CP: 7.228-8.112) y adicionalmente, en el extremo 3' del genoma se detectó la presencia de una región (ORF6) que traslapa con el ORF5 entre las posiciones 8109-8393 y que se ha reportado codifica para una proteína de unión a nucleótidos denominada 11K (Lin et al., 2014) (Figura 3A). El tamaño de las seis proteínas putativas resultantes es de 1.975 aa, 243 aa, 108 aa, 66 aa, 294 aa y 94 aa, para los productos de los ORF 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. Al realizar

las comparaciones del genoma completo de PVS de tomate con las bases de datos moleculares, se encontró que dicha secuencia comparte un 95 % de identidad con aislamientos procedentes de papa en China (MF033144, KU896946), Nueva Zelanda (KU058657) y Brasil (JQ647830), entre otros. Los análisis filogenéticos realizados con base en CP agruparon esta secuencia con el clado representando la raza PVS Andina (PVS^A) en conjunto con otros aislamientos reportados en Antioquia tanto en papa (*S. tuberosum*) como en papa criolla (*S. phureja*) (Gil et al., 2013; Vallejo et al., 2016) (Figura 3B). Esta situación nuevamente refleja la posible patogenicidad cruzada de este virus entre diferentes solanáceas, tal como lo planteó recientemente Vallejo et al. (2016) al encontrar la nueva variante Phureja de PVS (PVS^P) infectando plantas de *S. phureja* en el

oriente de Antioquia. La secuencia del genoma completo de este virus fue depositada en GenBank (MH282867) y muy probablemente corresponde al primer registro completo de este virus infectando tomate de manera natural en América; aunque no para el mundo, pues recientemente utilizando la plataforma NGS de Illumina, se reportó el genoma completo de este virus en Eslovaquia y su confirmación por RT-PCR en 21 % de las 66 muestras individuales de plantas que se evaluaron en dicho estudio (Predajna et al., 2017). En adición, Xu et al. (2017) en China reportaron el genoma completo de 13 virus de tomate, entre los que se incluyó el de una cepa de PVS.

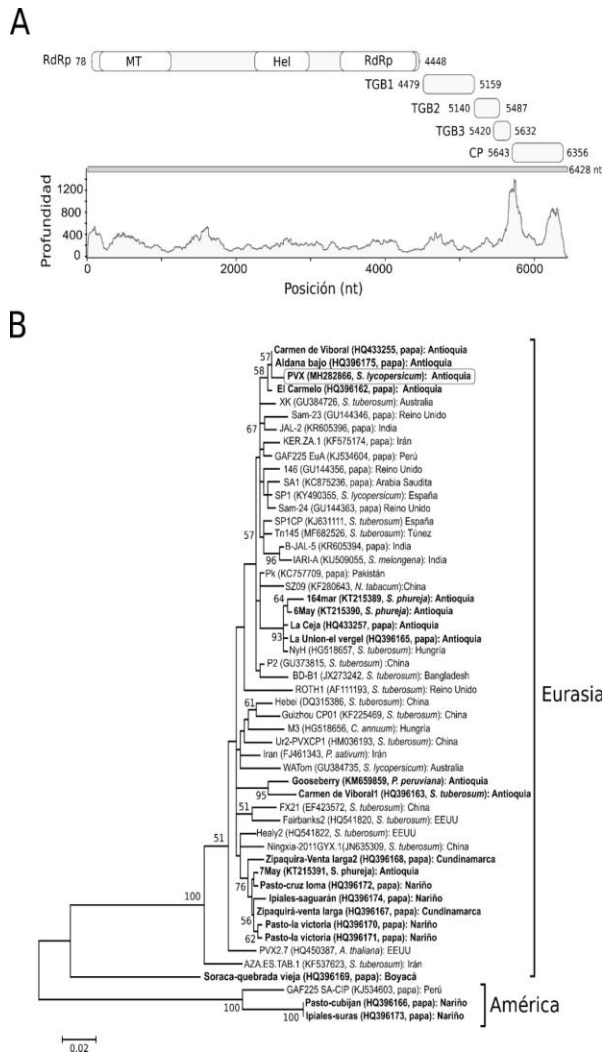


Figura 2. (A) Diagrama del genoma de PVX obtenido en muestras foliares de tomate en el oriente de Antioquia (Colombia). Se presenta

la ubicación de cada ORF, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Árbol filogenético generado a partir de secuencias de la cápside viral de PVX. En la derecha se presentan las denominaciones de los linajes de este virus. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap* y en letra negrita se indican los aislamientos colombianos.

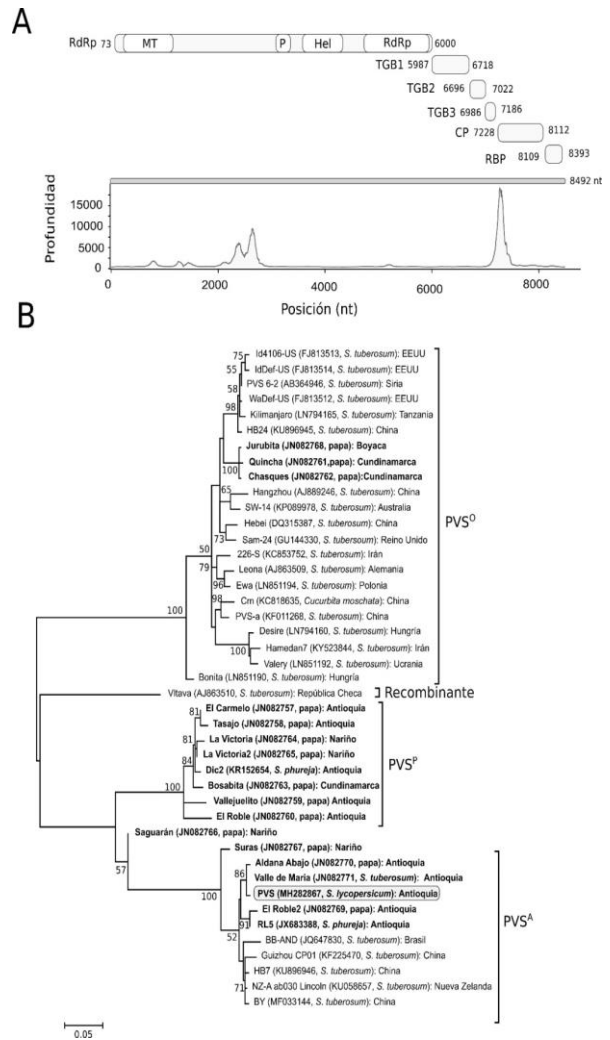


Figura 3. (A) Diagrama del genoma de PVS obtenido en muestras foliares de tomate en el oriente de Antioquia (Colombia). Se presenta la ubicación de cada ORF, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Árbol filogenético generado a partir de secuencias de la cápside viral de PVS. En la derecha se presentan las denominaciones de los linajes de este virus. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de

bootstrap y en letra negrita se indican los aislamientos colombianos

Detección de virus por RT-qPCR. Los resultados de las pruebas de RT-qPCR indicaron que los virus PVX y PVY fueron encontrados en los cinco lotes individuales evaluados, mientras que PYVV y PVS se encontraron en cuatro y dos lotes, respectivamente (Cuadro 1). Los valores de Ct señalan que los virus con mayores niveles de título en las muestras de tomate bajo análisis correspondieron a PVY (Ct=15,22) y PYVV

(Ct=18,51) en el lote 1 (Rosario, Marinilla); mientras que el PVS solo se detectó en los lotes de Santa Cruz (L3 y L4) y en ciclos avanzados de la reacción (Ct=26,79 y 28,75) (Cuadro 1). Los valores de Tm obtenidos para todos los virus se presentaron cercanos a los rangos previamente identificados en Colombia para PVY (Tm=77,5 ±0,5°C; Medina et al., 2015), PYVV (Tm=77,28 ±0,6°C; Álvarez et al., 2017), PVX (Tm=80,3 ± 0,5 °C y 83,7 ± 0,5 °C; García et al., 2016) y PVS (Tm= 86,96±1°C; Vallejo et al., 2016).

Cuadro 1. Detección por RT-qPCR de cuatro virus de RNA en cinco lotes de tomate en el oriente de Antioquia (Colombia)

Muestras*	PVS		PVX		PVY		PYVV	
	Ct**	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
L1_Rosario_Marinilla	>35	>35	30,48	83,5	15,22	76,92	18,51	77,09
L2_Rosario_Marinilla	>35	>35	22,22	80,5	32,46	77,1	20,38	77,82
L3_Santa Cruz_Marinilla	28,75	86,5	22,52	84	23,28	77,5	23,2	79
L4_Santa Cruz_Marinilla	26,79	86,2	22,41	84,2	24,13	77,5	>35	>35
L5_Horizonte_El Peñol	>35	>35	22,81	80,5	32,43	77,21	20,33	77
C+	27,96	88	4,5	82,5	28,89	77,44	21,12	77,35
C-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Los nombres de las muestras se refieren al número del lote, la vereda y el municipio de Antioquia (Colombia).

** Ct: ciclo umbral de amplificación; Tm: temperatura de fusión de los amplicones.

C+: control positivo, C-: control negativo

Por su parte, todos los controles positivos empleados en el estudio resultaron en amplificaciones efectivas con valores de Ct inferiores a 30 y Tm correspondientes a los rangos indicados; mientras que en los controles negativos no se detectó amplificación para ninguno de los virus. Un aspecto adicional que llama la atención de este resultado, es la ocurrencia de infecciones mixtas en los cinco lotes de al menos tres de los cuatro virus detectados por NGS, lo que es un indicativo de la necesidad de reforzar las medidas fitosanitarias en este cultivo en Colombia. Sin embargo, esta no es una situación particular del país, pues en un trabajo reciente realizado en China sobre el viroma del tomate a partir de análisis NGS de siRNA, se detectaron 22 especies diferentes de virus y el 89 % de las 170 muestras evaluadas presentaron la infección simultánea de dos o más virus (Xu et al., 2017).

De gran interés resultaría adelantar estudios en los que sea posible definir las interacciones de los virus aquí detectados en tomate (ej. sinergismos, antagonismos, reacciones neutras) y principal-

mente determinar los efectos aditivos de sus infecciones sobre los rendimientos y calidad de los frutos de tomate. En este sentido, Nyalugwe et al. (2012) al evaluar en plantas de papa el efecto de la interacción de PVS y PVX, encontraron que su infección mixta causaba el incremento del título de PVS y de la expresión de los síntomas foliares, lo que en términos de rendimiento representó reducciones de hasta el 23 %.

Variación genética de los virus. A partir de los amplicones obtenidos mediante RT-PCR convencional fue posible la obtención de tres secuencias para cada uno de los virus bajo análisis. Los amplicones presentaron tamaños de 562 pb, 421 pb, 495 pb y 480 pb para PVX, PVS, PYVV y PVY, respectivamente. Las secuencias resultantes fueron utilizadas para realizar análisis de variación genética con respecto a secuencias de aislamientos reportados en GenBank. Para PVS se encontraron niveles de identidad de entre 96 y 98 % con aislamientos representativos de PVS^A, lo que confirma los resultados del análisis NGS (Figura 4). Por su parte, la variación entre los tres

compartieron niveles de identidad cercanos al 80 % (Figura 4). Esta situación aunque parece extraña, dada la procedencia de los aislamientos aquí analizados (oriente de Antioquia, Colombia), ya se ha reportado en varias ocasiones en trabajos con este virus en Colombia (Gil et al., 2012; Gutiérrez et al., 2015; García et al., 2016) y fue recientemente confirmada en un estudio global de variabilidad de PVX (Hajizadeh y Sokhandan-Bashir, 2017), al encontrarse que aislamientos de este virus de Europa, Norte y Sur América formaban parte indistintamente de ambos linajes, lo que indicaba la falta de correlación entre su origen y las afinidades filogenéticas.

Finalmente, los tres aislamientos de PYVV de tomate no presentaron variación entre las secuencias CP, así como tampoco con respecto a una cepa de La Unión (Antioquia) previamente secuenciada por Álvarez et al. (2017) en *S. phureja* (Figura 4). Sin embargo, en un trabajo previo adelantado por Muñoz et al. (2017) en PYVV infectando plantas de tomate en Antioquia, se habían detectado dos variantes de este virus, que presentaban 162, 401 y 42 sitios polimórficos para los segmentos genómicos RNA1, RNA2 y RNA3, respectivamente y niveles de variación internos para cada ORF viral en el rango de 92,2 % (p10) a 99,4 % (p26). De esta forma, los análisis de identidad aquí realizados señalan que las tres cepas obtenidas corresponden al clado general de este virus (I) y no al hasta ahora sólo detectado en tomate (II). De importancia sería continuar con la evaluación de este virus en tomate para determinar la ocurrencia de posibles diferencias patogénicas, de transmisión y de rango de hospedantes entre ambas variantes virales.

CONCLUSIONES

Se detectó la infección de cuatro virus de RNA (PVX, PVS, PVY y PYVV) en muestras foliares de tomate obtenidas en cultivos del oriente de Antioquia (Colombia) utilizando la metodología molecular de secuenciación de nueva generación (NGS); siendo posible la secuenciación del genoma completo de los virus PVX (6.428 nt) y PVS (8.492 nt).

Utilizando pruebas de RT-qPCR con *primers* específicos se confirmó la infección en lotes individuales de tomate de los cuatro virus identificados en el análisis *in silico* del

transcriptoma, siendo detectados el PVX y PYVV en los cinco lotes evaluados, mientras que los virus PVY y PVS se encontraron en cuatro y dos de los lotes, respectivamente.

Utilizando RT-PCR convencional y secuenciación Sanger se logró obtener tres secuencias de la región de la cápside para los cuatro virus identificados en el estudio. Los análisis de variabilidad genética indicaron bajos niveles de variación entre los aislamientos de cada virus y su asociación con los linajes filogenéticos y/o razas PVS^A, PVY^{NTN}, PVX Eurasiático y con el clado I de PYVV.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de investigación de la Universidad Nacional de Colombia (Proyecto 40817).

LITERATURA CITADA

1. Adams, I.P., R.H. Glover, W.A. Monger, R. Mumford, E. Jackeviciene, M. Navalinskiene, et al. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10(4): 537-545.
2. Agindotan, B.O., P.J. Shiel y P.H. Berger. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142(1-2): 1-9.
3. Álvarez, D., P. Gutiérrez y M. Marín. 2017. Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PYVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro* 29(1): 3-14.
4. Antignus, Y. 2003. Tomato. *In*: G. Loebenstein y G. Thottappilly (eds.). *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries*. Kluwer Academic Publishers. Londres. 800 p.
5. Arli-Sokmen, M. y M.A. Sevilik. 2006. Viruses infecting field-grown tomatoes in Samsun province, Turkey. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 39(4): 283-288.
6. Cox, B.A. y R.A.C. Jones. 2010. Genetic

- variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Archives of Virology* 155(7): 1163-1169.
7. Cueto, A.I., F. Aparisi, M.A. Achón, V. Pallás, M.A. Arcal, S. Lade y V. Medina. 2015. Characterization of a new Spanish Potato virus X strain inducing symptoms in tomato. *Journal of Plant Pathology* 97(2): 369-372.
 8. Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.
 9. Gil, J., J. Cotes y M. Marín. 2011. Incidencia de potyvirus y caracterización molecular de PVY en regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(1): 85-93.
 10. Gil, J.F., J.M. Cotes y M. Marín. 2012. Detección y caracterización molecular del virus X de la Papa (PVX) en regiones productoras de papa de Colombia. *Revista Protección Vegetal* 27(2): 69-76.
 11. Gil, J.F., J.M. Cotes y M. Marín. 2013. Detección serológica y caracterización molecular de Potato virus S (PVS, Carlavirus) en cultivos de papa de Colombia. *Revista de Biología Tropical* 61(2): 565-575.
 12. Gish, W. y D.J. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3: 266-272.
 13. Grabherr, M.G., B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29(7): 644-652.
 14. Gutiérrez, P.A., J.F. Alzate y M. Marín. 2015. Complete genome sequence of an isolate of Potato virus X (PVX) infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Virus Genes* 50(3): 518-522.
 15. Hanssen, I.M., M. Lapidot y B. Thomma. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(5): 539-548.
 16. Hajizadeh, M. y N. Sokhandan-Bashir. 2017. Population genetic analysis of Potato virus X based on the CP gene sequence. *Virus Disease* 28(1): 93-101.
 17. Imbeaud, S., E. Graudens, V. Boulanger, X. Barlet, P. Zaborski, E. Eveno et al. 2005. Toward standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research* 33(6): e56.
 18. Jones, R.C.A. 2014. Plant virus ecology and epidemiology: Historical perspectives, recent progress and future prospects. *Annals of Applied Biology* 164: 320-347.
 19. Lin, Y.H., J.A. Abad, C.J. Maroon-Lango, K.L. Perry y H.R. Pappu. 2014. Molecular characterization of domestic and exotic Potato virus S isolates and a global analysis of genomic sequences. *Archives of Virology* 159(8): 2115-2122.
 20. Massart, S., T. Candresse, J. Gil, C. Lacomme, L. Predajna, M. Ravnikar et al. 2017. A Framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory, and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Frontiers in Microbiology* 8: 45.
 21. Medina, H, P. Gutiérrez y M. Marín. 2015. Detección del Potato virus Y (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS-ELISA y qRT-PCR en Antioquia (Colombia). *Bioagro* 27: 83-92.
 22. Morales, F., P. Tamayo, M. Castaño, C. Olaya, A. Martínez y A. Velasco, A. 2009. Enfermedades virales del tomate (*Solanum lycopersicum*) en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 33: 23-27.
 23. Moussa, A.B., M. Makni y M. Marrakchi, M. 2000. Identification of the principal viruses infecting tomato crops in Tunisia. *Bulletin OEPP* 30(2): 293-296.
 24. Muñoz, L., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Detección y secuenciación del genoma del Potato virus Y (PVY) que infecta plantas de tomate en Antioquia, Colombia. *Bioagro* 28(2): 69-80.
 25. Muñoz, L., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2017. Secuenciación del genoma completo del Potato

- yellow vein virus (PVV) en tomate (*Solanum lycopersicum*) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 22(1): 5-17.
26. Muñoz-Escudero, D., P. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Detection and genome characterization of Potato virus Y isolates infecting potato (*Solanum tuberosum* L.) in La Unión (Antioquia, Colombia). *Agronomía Colombiana* 34(3): 317-328.
27. Nie, X. y R.P. Singh. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *Journal of Virological Methods* 91(1): 37-49.
28. Nyalugwe, E.P., C.R. Wilson, B.A. Coutts y R.A.C. Jones. 2012. Biological properties of Potato virus X in potato: effects of mixed infection with Potato virus S and resistance phenotypes in cultivars from three continents. *Plant Disease* 96(1): 43-54.
29. Padmanabhan, C., Y. Zheng, R. Li, Z. Fei y K. Ling. 2015. Complete genome sequence of Southern tomato virus naturally infecting tomatoes in Bangladesh. *Genome Announcements* 3(6): e01522-15.
30. Prasannath, K., K.N.P. Dharmadasa, D.M. De Costa y K.S. Hemachandra. 2014. Variations of incidence, types of virus diseases and insect vector populations of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), grown in different agroecological regions of Sri Lanka under two crop management systems. *Tropical Agricultural Research* 25(3): 376-395.
31. Predajna, L., K. Šoltys, J. Kraic, D. Mihálik y M. Glasa. 2017. First report of Potato virus S infecting tomato in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* 99(3): 811.
32. Riascos, M., P.A. Gutiérrez y M.A. Marín. 2018. Identificación molecular de Potyvirus infectando cultivos de papa en el oriente de Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana* 23(1): 39-50.
33. Roossinck, M.J., D.P. Martin y P. Roumagnac. 2015. Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. *Phytopathology* 105(6): 716-727.
34. Santillan, F.W., C. Fribourg, I.P. Adams, A.J. Gibbs, N. Boonham, M.A. Kehoe, S. Maina y R.A.C. Jones. 2018. The biology and phylogenetics of Potato virus S isolates from the andean region of South America. *Plant Disease* 102(5): 869-885.
35. Saqibab, M., S.J. Wylie y M.G.K. Jones. 2015. Serendipitous identification of a new Iflavirus-like virus infecting tomato and its subsequent characterization. *Plant Pathology* 64(3): 519-527.
36. Sierra Mejía, A., Y. Gallo García, M. Estrada Arteaga, P.A. Gutiérrez y M. Marín Montoya. 2020. Detección molecular de seis virus de ARN en brotes de tubérculos de papa criolla (*Solanum phureja*) en Antioquia, Colombia. *Bioagro* 32(1): 3-14.
37. Singh, M., R.P. Singh, M.S. Fageria, X. Nie, R. Coffin y G. Hawkins. 2013. 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. *American Journal of Potato Research* 90(1): 43-50.
38. Tamayo, P. y P. Jaramillo. 2013. Enfermedades del tomate, pimentón, ají y berenjena en Colombia guía para su diagnóstico y manejo. Corpoica, Rionegro. 162 p.
39. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
40. Vaca-Vaca, J.C., J.F. Betancur-Pérez y K. López-López. 2012. Distribución y diversidad genética de Begomovirus que infectan tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1): 60-76.
41. Vallejo, D., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Genome characterization of a Potato virus S (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. *Agronomía Colombiana* 34(1): 51-60.
42. Wu, Q., S. Ding, Y. Zhang y S. Zhu. 2015. Identification of viruses and viroids by Next-Generation Sequencing and homology

dependent and homology independent algorithms. Annual Review of Phytopathology 53: 1-20.

43. Xu, C., X. Sun, A. Taylor, C. Jiao, Y. Xu, X.

Cai et al. 2017. Diversity, distribution, and evolution of tomato viruses in China uncovered by small RNA sequencing. Journal of Virology 91(11): e00173-17.