

Capítulo 3

Caracterización molecular de aislados de *Plum pox virus* procedentes de la zona central de Chile

Isabel Ramírez A.

Ingeniera en Biotecnología Molecular
isabel.ramirez@inia.cl

Mónica Madariaga V.

Licenciada en Biología, Dra.

Nelly Nova L.

Ingeniera en Biotecnología Molecular

En Chile, en los últimos 30 años de investigación sobre PPV, se ha determinado sólo la presencia de la raza D (Rosales *et al.*, 1996 y 1998; Reyes *et al.*, 2001 y 2003; Fiore *et al.*, 2010 y 2016). A diferencia de las otras razas, PPV-D es considerada no epidémica o atenuada, produciendo infecciones menos severas, ya que no se transmite por semillas y posee una baja eficiencia de transmisión entre especies de *Prunus*. Su principal hospedero es el ciruelo y damasco, pero también afecta a durazneros y nectarines, aunque sus efectos en ellos son menos severos (Fiore *et al.*, 2016).

En el **Cuadro 2.2** del capítulo anterior, se pueden observar las 10 razas de PPV descritas hasta la fecha, lo que nos permite tener una visión de la variabilidad genética que enfrentamos al estudiar los virus. Estos agentes infecciosos poseen variadas características como su genética, alta tasa de mutación y recombinación entre cepas, que obligan a la comunidad científica a estar actualizada respecto a los posibles cambios epidemiológicos. Por esta razón y, considerando además que los estudios más recientes sobre PPV-D en Chile provienen del año 2016 (Fiore *et al.*, 2016), se hace imprescindible actualizar el estado de la situación de la enfermedad de Sharka en nuestro país. Es así que bajo el alero del proyecto apoyado por FIA "Desarrollo de estrategias de mitigación de la enfermedad de Sharka", se buscó determinar la presencia de otras razas de PPV en Chile, a través una prospección en huertos y viveros durante dos temporadas, en las cuales se recolectaron y analizaron muestras de plantas que presentaban síntomas sospechosos de la enfermedad.

3.1 Determinación de PPV

Durante las temporadas 2020-2021 y 2021-2022, se visitaron huertos en las regiones de Valparaíso, Metropolitana y del Libertador General Bernardo O'Higgins, para recolectar muestras de hojas y frutos de durazneros, nectarinos y ciruelos que presentaban algún síntoma que sugiriera la presencia del virus. Del total recolectado, 130 muestras distribuidas en las tres regiones como indica el **Cuadro 3.1**, fueron analizadas mediante la técnica de laboratorio Transcripción Reversa seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), utilizando partidores universales, los cuales se unen a una región conservada del genoma del virus, permitiendo determinar la presencia del virus sin importar de que raza se trate, es decir, indica si PPV está o no presente en la muestra. Inicialmente se utilizó el par de partidores P1/P2 (Wetzel *et al.*, 1991) (**Cuadro 3.3** y **Figura 3.1**) el más comúnmente usado, sin embargo, al visualizar los resultados el número de muestras positivas sólo fue de un 15,4 % (**Cuadro 3.2**). A raíz de esto, se realizó un PCR para las mismas muestras utilizando el juego de partidores universales PPV-9196/PPV-9506 (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005) (**Cuadro 3.3** y **Figura 3.2**), con los cuales la determinación de la presencia del virus aumentó a un 38,5 % (**Cuadro 3.2**).

Cuadro 3.1. Número de muestras analizadas por región de origen.

Región	Muestras analizadas
Valparaíso	34
Metropolitana	63
Libertador General Bernardo O'Higgins	33
Total	130



Figura 3.1. Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % del PCR con los partidores universales P1/P2 para PPV. Se observa la banda esperada de 243 pb en las muestras M2, M7, M8, M9, M11, M12 y M13. C-: control negativo. C+: control positivo. PM: Estándar de peso molecular de 100 pb.

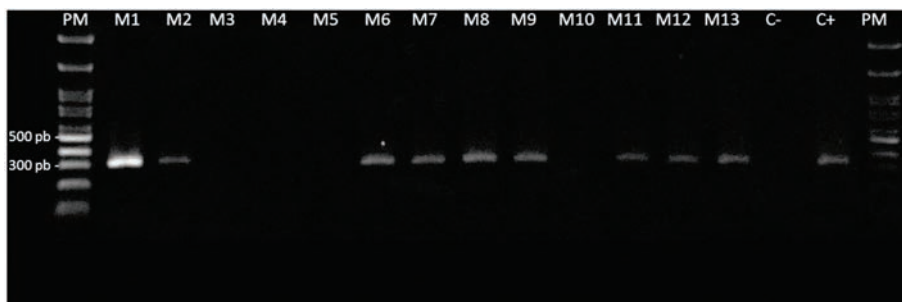


Figura 3.2. Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % del PCR con los partidores universales PPV-9196/PPV-9506 para PPV. Se observa la banda esperada de 313 pb en las muestras M1, M2, M6, M7, M8, M9, M11, M12 y M13. C-: control negativo. C+: control positivo. PM: Estándar de peso molecular de 100 pb.

Cuadro 3.2. Número de individuos positivos y porcentaje de infección en las muestras analizadas con los diferentes pares de partidores universales por región de origen.

Región	Partidores P1/P2		Partidores PPV-9196/PPV-9506	
	Nº Positivos	% Infección	Nº Positivos	% Infección
Valparaíso	6	17,6 %	11	32,4 %
Metropolitana	5	7,9 %	18	28,6 %
O'Higgins	9	27,3 %	21	63,6 %
Total	20	15,4 %	50	38,5 %

En el **Cuadro 3.2** podemos ver que para ambos partidores el porcentaje de positividad es mayor para la región de O'Higgins, así como que con los partidores PPV-9196/PPV-9506 se obtuvo por lo menos el doble de positividad en cada región comparado al otro set de partidores universales.

3.2 Búsqueda de otras razas de PPV

Con el fin de determinar la presencia de otras razas de PPV en Chile, a todas las muestras que resultaron positivas para cualquiera de los partidores universales utilizados en el apartado 3.1, se les realizó un nuevo PCR con los partidores específicos descritos en la literatura para cada una de las razas de PPV que existen (**Cuadro 3.3**), exceptuando las razas Turkey (PPV-T) y Ancestral (PPV-An)

de las cuales no se encontró partidores descritos. En el caso de PPV-C y PPV-EA se realizó un PCR-Nested según indica el protocolo de identificación de esta raza (**Figura 3.3**), el cual consiste en hacer dos series de PCR en cadena con dos sets de partidores distintos, usando como DNA molde en la segunda reacción el producto de PCR de la primera, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. En el **Cuadro 3.3** se destaca con un asterisco el partidador de la primera serie y con dos asteriscos los de la segunda serie.

Cuadro 3.3. Listado de los partidores utilizados para la detección e identificación por PCR de *Plum pox virus* y las posibles razas presentes en muestras colectadas en las regiones de Valparaíso, Metropolitana y el Libertador General Bernardo O'Higgins. Con un asterisco se marca el partidador de la primera serie del PCR Nested y con dos asteriscos el de la segunda serie.

Raza PPV	ID Partidor	Secuencia 5'-3'	Producto PCR (pb)	Objetivo	Secuencia Referencia
Todas	P1 P2	ACCGAGACCACTACTCCC CAGACTACAGCCTCGCCAGA	243	CP-3'UTR	Wetzel <i>et al.</i> , 1991
Todas	PPV-9196 PPV-9506	CAATAAAGCCATTGTTGGATC CTCTGTCTCTTCTTGTG	313	CP	Sánchez-Navarro <i>et al.</i> , 2005
D	P3D P4b	ACATTGCGGAGACAGCACTG TGCCCTCAAACGTGGCACTG	467	Nib-CP	Candresse <i>et al.</i> , 1998
M	P1 PM	ACCGAGACCACTACTCCC CTTCAACAACGCTGTGCGT	198	CP-3'UTR	Olmos <i>et al.</i> , 1997
REC	mD5 mM3	TATGTCACATAAAGGCGTTCTC CATTTCATAAATCCAAAAGAC	605	Nib-CP	Subr <i>et al.</i> , 2004
W	W8328F W8711R	GCATCAATGGTAGAGGCATG CATTGACGTTGTGCTCTGCA	384	Nib-CP	Glasa <i>et al.</i> , 2011
Todas*	M3-5' M4-5' M2-3'	TCCAACRTTGTTRRCACCA TCCAAYRTAGTKGTSCATCA CGYYTRACTCCTCATACCA	465 -516	CP	Szemes <i>et al.</i> , 2001
C**	M10-5' M11-3'	GGGAAATGATGACGACGTAECT CAATTACCCATACGAGAAT	224	CP	Szemes <i>et al.</i> , 2001
EA**	M8-5' M9-3'	TAGTCACTACTACAGCAG AGGAGGTGTAGTAGTTGTTG	167	CP	Szemes <i>et al.</i> , 2001
CR	CR8597F CR9023R	ATGATGTGACGTTAGTGGAC TCGTGTGTAGACAGGTCAAC	427	Nib-CP	Glasa <i>et al.</i> , 2013
CV	CV-P1F CV-P1R1	ACTGCAAGCGCATGGAAGGGTTGGATGA TCAGAAATGTTGCGTGGATTGAGGACGA	645	P1	Chirkov <i>et al.</i> , 2018
CV	CV-NibF CV-CPR1	ACGTGGATATATATGATGATCT TTGGTGGCGTATTCTGCAGGCT	617	Nib-CP	Chirkov <i>et al.</i> , 2018

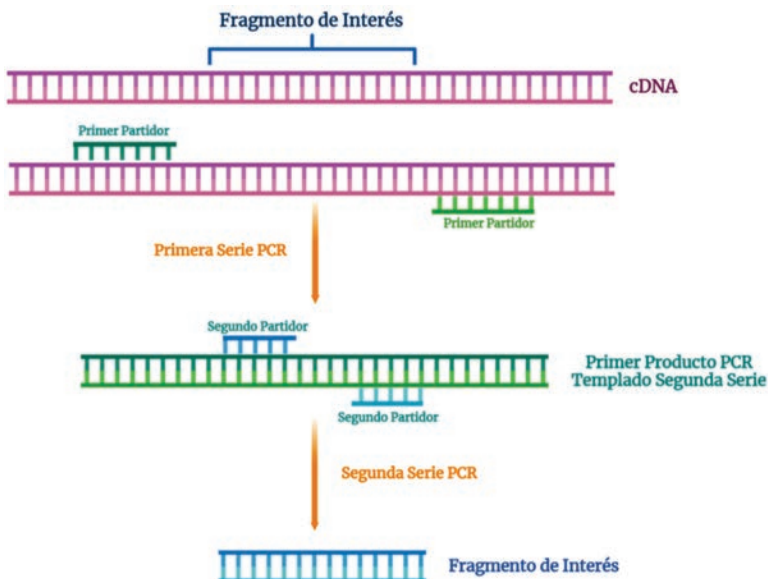


Figura 3.3. Esquema PCR-Nested.

Un total de 39 muestras reaccionaron positivamente a los partidores P3D/P4b específicos para la raza D (**Figura 3.4**). Ninguna muestra amplificó el fragmento de DNA esperado para las razas Marcus (PPV-M), Recombinante (PPV-REC), Winona (PPV-W), Cherry (PPV-C), El Amar (PPV-EA), Cherry Russian (PPV-CR) o Cherry Volga (PPV-CV).

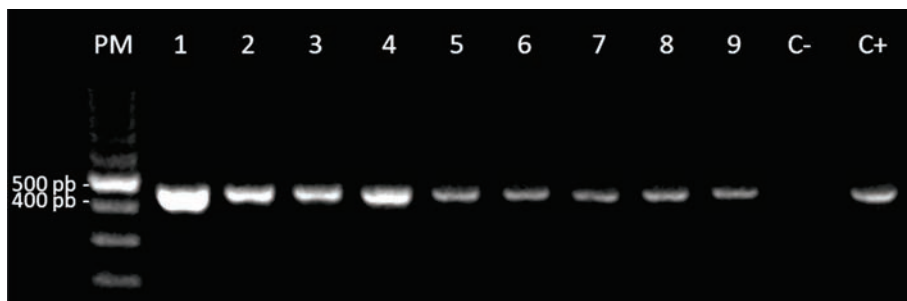


Figura 3.4. Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % del PCR con los partidores P3D/P4b específicos para la raza D de PPV. Se observa la banda esperada de 467 pb. Los carriles 1 a 9 corresponden a muestras analizadas. C-: control negativo. C+: control positivo. PM: Estándar de peso molecular de 100 pb.

Durante la realización de este trabajo, se detectaron tres situaciones relacionadas con la amplificación con los partidores (**Cuadro 3.4**). De estos casos se escogieron algunas muestras para continuar los análisis de los resultados. Es

así que se seleccionaron cuatro muestras que no dieron positivo con los partidores universales P1/P2, pero que sí con los partidores universales PPV-9196/PPV-9506 y P3D/P4b específicos para la raza D (Caso 2), tres muestras que no dieron positivo ni con los partidores P3D/P4b ni con los partidores universales P1/P2 (Caso 3) y dos muestras positivas para los tres juegos de partidores (Caso 1), siendo este el caso observado con mayor frecuencia.

Cuadro 3.4. Casos encontrados en las muestras analizadas al amplificar mediante PCR con los partidores universales P1/P2, PPV-9196/PPV-9506 y el partidior P3D/P4b específico para la raza D. El Caso 1 corresponde al más común. El símbolo (+) indica amplificación con ese partidior y el signo (-) a no amplificación.

	Partidores Universales P1/P2	Partidores Universales PPV-9196/PPV-9506	Partidores Raza D P3D/P4b
Caso 1	+	+	+
Caso 2	-	+	+
Caso 3	-	+	-

Como todos los casos (**Cuadro 3.4**) son positivos para el juego de partidores PPV-9196/PPV-9506, se procedió a clonar y secuenciar los fragmentos amplificados de 313 pb (**Cuadro 3.3**) obtenidos con estos partidores en las nueve muestras anteriores, para corroborar la identidad del virus siguiendo el procedimiento de la **Figura 3.5**.

El análisis de las secuenciaciones de los fragmentos de 313 pb resultó ser idénticas entre sí, independiente de si dieron o no positivo con el partidior P3D/P4b específico para raza D.

Las secuencias obtenidas se compararon con otras publicadas en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en NCBI. Esta comparación mostró que el mayor porcentaje de identidad fue con la secuencia de *Plum pox virus* raza D, número de acceso LC375131.1 de NCBI, con quien comparte un 100 % de identidad. Además, se realizó un dendograma filogenético con las secuencias de PPV almacenadas en NCBI y las obtenidas en este trabajo, el cual nos permite observar un orden de grupos (clados) según el grado de similitud y características compartidas. Es así que, en este caso, se puede ver que las secuencias obtenidas de los aislados chilenos (destacadas en negrita en la **Figura 3.6**) quedaron agrupadas en el clado correspondiente a la raza D.

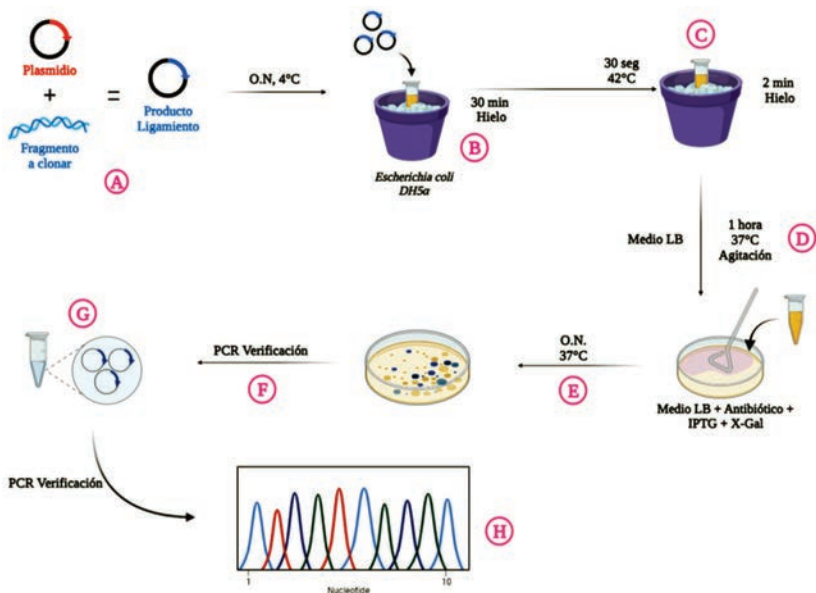


Figura 3.5. Esquema procedimiento de clonación con bacterias *E. coli*. A: Ligamiento plasmidio (vector) y fragmento de DNA a clonar. B: Incubación producto ligamiento con bacteria *E. coli* DH5α quimiocompetente. C: Transformación *E. coli* a través de shock térmico. D: Recuperación bacterias. E: Siembra de *E. coli* transformadas en medio de selección. F: Selección colonias bacterianas transformadas con el producto de ligamiento. G: Purificación plasmidio desde colonias seleccionadas. H: Secuenciación fragmento de interés.

Como otra forma de corroborar la identidad del virus presente en nuestros aislados, se observó que las secuencias analizadas en este trabajo poseen los sitios de corte de las enzimas de restricción RsaI y AluI, el cual corresponde a un rasgo característico de los genomas de PPV raza D (Thompson *et al.*, 2001) (**Figura 3.7**).

Respecto al caso 3 (**Cuadro 3.4**), donde los análisis de las secuencias de los aislados obtenidos en este trabajo muestran que corresponden a raza D, pero no pudieron ser amplificados por el set de partidores específicos P3D/P4b para esta raza, se necesitan estudios más profundos, como secuenciación completa, que permitan ahondar en que está ocurriendo a nivel de secuencia nucleotídica.

Además, en las muestras donde no se obtuvo amplificación con el set de partidores universales P1/P2, se pudo analizar la secuencia del sitio de unión de P2 a través de los fragmentos de 313 pb obtenidos con el set de partidores universales PPV-9196/PPV-9506, ya que este fragmento cubre el sitio de unión de P2 (**Figura 3.8**). Este análisis permitió observar que no existen diferencias en su secuencia,

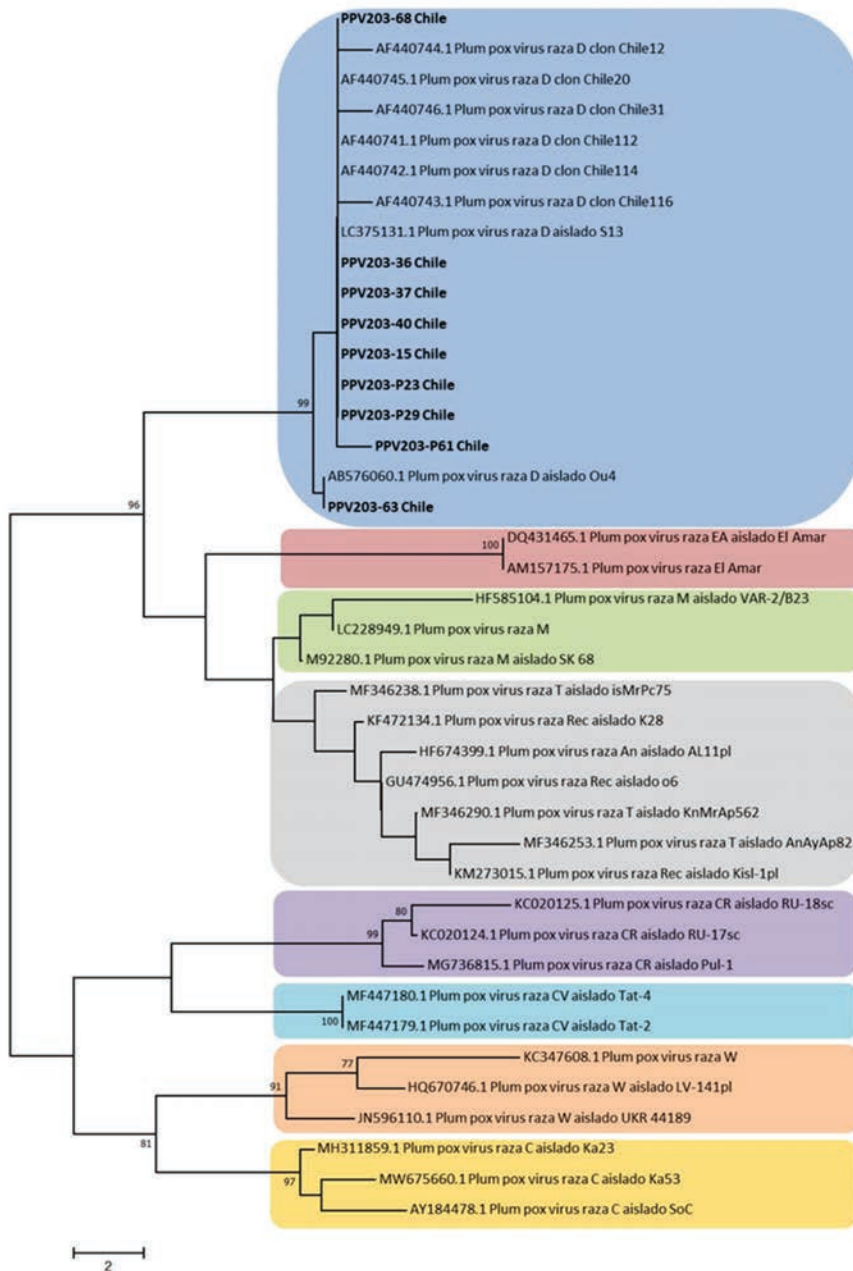


Figura 3.6. Dendrograma filogenético de las secuencias de PPV obtenidas en este trabajo (destacadas en negrita) y las encontradas en NCBI, construido con el método Neighbor-Joining con 1000 repeticiones. El análisis fue realizado usando el software MEGA7.

PPV203-68 CAATAAAGCCATTGTTGGATCATGCGAAACCCACCTTTAGACAAATTTATGGCACATTTTCAGTAACGGTGGCTGAAGCGTATATTGAAAAACGAA 60 120 180
 PPV203-68 ATTATGAAAAAGCATACATGCCAAGGTATGGAATTCAGCGCAACCTGACAGACTACAGCCTCGCCAGATATGCCTTTTGATTTTTACGAAATGA 140 200 260
 PPV203-68 CTTCAACGACACCCCGTACGGGCACGTGAAGCTCATATCCAGATGAAGCCAGCAGCATTGAGAAAATGTTCAAAAATCGTTTTTGGCTTGGATG 280 300
 PPV203-68 GAAACGTCGGAACACACAGAAGAGGACACAGAG

Figura 3.7. Secuencia del aislado PPV203-68 obtenida en este trabajo, proveniente de duraznero. Se puede observar la ubicación de los sitios de corte de las enzimas RsaI y AluI en la secuencia nucleotídica del aislado.

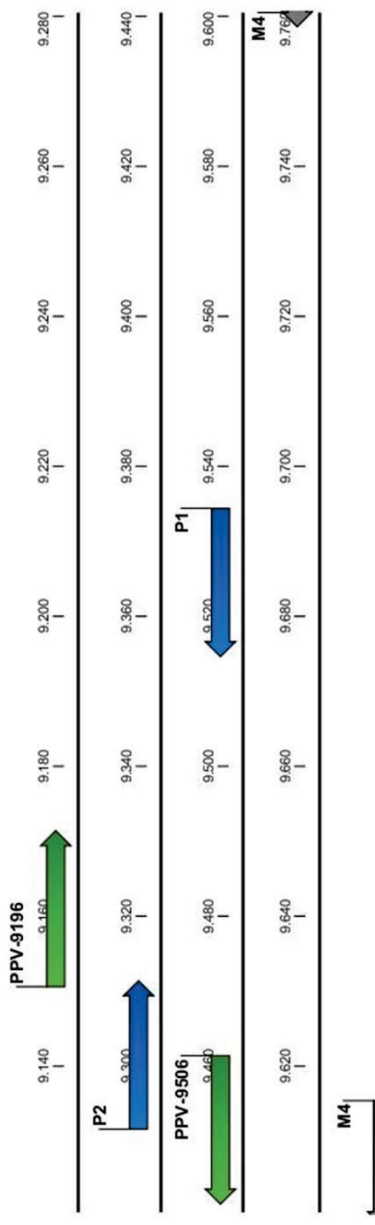


Figura 3.8. Fragmento de la secuencia genómica de PPV, que abarca del nucleótido 9120 al 9772. Los números sobre la línea representan la ubicación del nucleótido en el genoma del virus. Se muestran los sitios de unión de los partidores PPV-9196/PPV-9506 (fechas verdes), P1/P2 (fechas azules) y M4 (flecha gris).

por lo tanto, no deberían existir problemas para su unión. Para determinar si el partidor P1 presentaba problemas en su unión, se realizó un PCR formado el set de partidores PPV-9196 (**Cuadro 3.3**) y M4 (Chen *et al.*, 2001), este último utilizado para la detección de Potyvirus. Este juego de partidores amplificó un fragmento de 622 pb que contiene la secuencia del sitio de unión de P1 (**Figura 3.8**). Los fragmentos de 622 pb obtenidos fueron clonados y secuenciados, y su posterior análisis mostró que no existen diferencias en la secuencia de unión del partidor P1, por lo tanto, tampoco debería haber problemas para su unión. Entonces, la discrepancia en los resultados obtenidos en los PCR con ambos juegos de partidores universales puede deberse más bien a una diferencia en la eficiencia de ellos y no a un cambio en la secuencia de unión de los partidores P1/P2.

Todos estos resultados permiten confirmar que, en las muestras analizadas de duraznero, nectarino y ciruelo, de las regiones de Valparaíso, Metropolitana y de O'Higgins, sólo está presente la raza de PPV Dideron (PPV-D), corroborando de esta forma los datos que disponen investigadores, productores y el SAG.

3.3 Bibliografía

- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J.B., y Dunez, J. (1998). Comparison of Monoclonal Antibodies and Polymerase Chain Reaction Assays for the Typing of Isolates Belonging to the D and M serotypes of *Plum Pox Potyvirus*. *Phytopathology*, 88(3), 198-204. DOI: 10.1094/PHYTO.1998.88.3.198.
- Chen, J., Chen, J., y Adams, M.J. (2001). A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 146(4), 757-766. DOI: 10.1007/s007050170144.
- Chirkov, S., Sheveleva, A., Ivanov, P., y Zakubanskiy, A. (2018). Analysis of genetic diversity of Russian sour cherry *Plum pox virus* isolates provides evidence of a new strain. *Plant Disease*, 102(3), 569-575. DOI: 10.1094/PDIS-07-17-1104-RE.
- Fiore, N., Araya, C., Zamorano, A., González, F., Mora, R., Sánchez-Navarro, J., Pallás, V., y Rosales, I.M. (2010). Tracking *Plum pox virus* in Chile throughout the year by three different methods and molecular characterization of Chilean isolates. *Julius-Kühn-Archiv*, 427, 156-161.

- Fiore, N., Zamorano, A., Pino, A.M., González, F., Rosales, I.M., Sánchez-Navarro, J.A., y Pallás, V. (2016). Survey of stone fruit viruses and viroids in Chile. *Journal of Plant Pathology*, 98(3), 631-635. <http://www.jstor.org/stable/44280512>
- Glasa, M., Malinowski, T., Predajňa, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L., y Candresse, T. (2011). Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of *Plum pox virus*. *Phytopathology*, 101(8), 980-985. DOI: 10.1094/PHYTO-12-10-0334.
- Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Subr, Z., Cambra, M., y Candresse, T. (2013). Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga Basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103(9), 972-979. DOI: 10.1094/PHYTO-11-12-0285-R.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T., y Asensio, M. (1997). Simultaneous detection and typing of *Plum pox potyvirus* (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68(2), 127-137. DOI: 10.1016/s0166-0934(97)00120-1.
- Reyes, F., Reyes, M.A., Sepúlveda, P., Herrera, G., Hinrichsen, P., López-Moya, J., y Prieto, H. (2001). New insights on *Plum pox virus* present in Chile. *Acta Horticulturae*, 550, 135-140. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.550.19.
- Reyes, F., Fiore, N., Reyes, M.A., Sepúlveda, P., Paredes, V., y Prieto, H. (2003). Biological Behavior and Partial Molecular Characterization of Six Chilean Isolates of *Plum pox virus*. *Plant Disease*, 87(1), 15-20. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.1.15.
- Rosales, M., Hinrichsen, P., y Herrera, G. (1996). PCR-specific detection of a *Plum pox virus* (PPV) isolate in Chile. *Agricultura Técnica*, 56, 89-98. https://oes.chileanjar.cl/files/V56I2A03_es.pdf
- Rosales, M., Hinrichsen, P., y Herrera, G. (1998). Molecular characterization of *Plum pox virus* isolated from apricots, plums and peaches in Chile. *Acta Horticulturae*, 472, 401-407. DOI: 10.17660/ActaHortic.1998.472.47.
- Sánchez-Navarro, J.A., Aparicio, F., Herranz, M.C., Minafra, A., Myrta, A., y Pallás, V. (2005). Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 111(1), 77-84. DOI: 10.1007/s10658-004-1422-y.

- Subr, Z., Pittnerová, S., y Glasa, M. (2004). A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48(3), 173–176. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15595211/>
- Szemes, M., Kálmán, M., Myrta, A., Boscia, D., Németh, M., Kölber, M., y Dorgai, L. (2001). Integrated RT-PCR/nested PCR diagnosis for differentiating between subgroups of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*, 92(2), 165–175. DOI: 10.1016/s0166-0934(00)00284-6.
- Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M., y James, D., (2001). First report of *Plum pox Potyvirus* in Ontario, Canada. *Plant Disease*, 85(1), 97. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.1.97C.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., y Dunez, J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 33(3), 355–365. DOI: 10.1016/0166-0934(91)90035-x.