
OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN DEL *Tamarillo leaf malformation virus* (TALMV) EN TOMATE DE ÁRBOL

Specific Antibodies to Detect *Tamarillo leaf malformation virus* (TaLMV) in Tamarillo

YULIANA GALLO GARCÍA¹, (c)M.Sc.; MAURICIO MARÍN MONTOYA²,
Ph. D.; PABLO ANDRÉS GUTIÉRREZ¹, Ph. D.

¹ Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Colombia.
ymgallo@unal.com

² Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Colombia.
mamarinm@unal.edu.co

Correspondencia: Prof. Pablo Andrés Gutiérrez, Departamento de
Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia
Sede Medellín. Colombia. A.A. 3840. Fax: 57 4 430 93 41.
paguties@unal.edu.co

Presentado 21 de enero de 2011, aceptado 2 de junio de 2011, correcciones 29 de junio de 2011.

RESUMEN

En Colombia el rendimiento del cultivo de tomate de árbol se ha visto seriamente afectado por la expansión de una enfermedad conocida como virosis de tomate de árbol. Esta patología se registró inicialmente en 1991 en el norte de Antioquia y su expansión ha alcanzado todas las regiones cultivadoras de este frutal en el país. Trabajos recientes han detectado la presencia de por lo menos dos especies del género *Potyvirus* (Potyviridae) asociadas a esta enfermedad en los cultivos de tomate de árbol de Antioquia: *Potato virus Y* (PVY) y *Tamarillo leaf malformation virus* (TaLMV, especie propuesta). Con el fin de reducir la diseminación de estos patógenos virales en el país, es necesario contar con herramientas de diagnóstico que permitan la certificación del material de siembra y la detección temprana en plantas asintomáticas. En este trabajo se obtuvieron anticuerpos policlonales específicos para la detección del virus TaLMV utilizando una región antigénica de 15 residuos de la cápside viral. La sensibilidad y especificidad de los anticuerpos anti-TaLMV fue evaluada mediante pruebas de ELISA y *dot-blot* utilizando proteína recombinante y péptidos sintéticos como controles. La utilidad de estos anticuerpos fue validada a partir de una prueba piloto de detección de TaLMV en muestras de plantas de tomate de árbol con y sin síntomas de virosis obtenidas en el oriente antioqueño. Los resultados serológicos fueron comparados con los niveles de detección que ofrece la técnica de RT-PCR con cebadores específicos para la cápside viral de TaLMV.

Palabras clave: anticuerpos, ELISA, *Potyvirus*, TaLMV, tomate de árbol.

ABSTRACT

In Colombia, yields of tamarillo are seriously affected by a complex viral disease known as virosis. This pathology was first reported in 1991 in the north of Antioquia and currently affects all tamarillo growing regions in the country. Recent works have demonstrated the association of two *potyviruses* (potyviridae) with this disease: *Potato virus Y* (PVY) and *Tamarillo leaf malformation virus* (TaLMV, proposed species). Specific diagnostic tools are required for early asymptomatic detection of these viruses and tamarillo certification programs. In this study, we report the obtention of TaLMV specific antibodies using a 15 residues peptide mimicking the N-terminal coat protein. Specificity and sensitivity of the anti-TaLMV antibodies was determined by ELISA and *dot-blot* using recombinant protein and synthetic peptides as controls. The usefulness of these antibodies was validated from a preliminary trial of TaLMV detection in plant samples obtained from tamarillo crops in eastern Antioquia and results were compared with a TaMLV specific coat RT-PCR detection protocol.

Key words: Antibody, ELISA, *Potyvirus*, TaLMV, Tamarillo.

INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), es un frutal de origen andino cultivado principalmente en Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006). Esta fruta presenta excelentes propiedades organolépticas y nutricionales que la hacen muy atractiva para la industria de alimentos y bebidas (Bernal y Tamayo, 2003). En Colombia, este cultivo se extiende a 18 departamentos con un área total de siembra de 7.646 ha, concentradas principalmente en Antioquia y Cundinamarca. La siembra de tomate de árbol se ha convertido en una alternativa viable para la sustitución de cultivos de ilícitos y tradicionales de baja rentabilidad (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006); desafortunadamente, los rendimientos y el período productivo del cultivo en Colombia se ven seriamente afectados por la expansión de la enfermedad conocida como virosis de tomate de árbol (Ayala *et al.*, 2010). Esta enfermedad se registró por primera vez en 1991 en el norte de Antioquia (Tamayo, 1990; 1996) y se extendió prácticamente a todas las regiones del país, tal como lo demuestran estudios recientes en Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Nariño y Putumayo (Betancourth *et al.*, 2003; Cruz, 2005; Cuspoca, 2007; Gil *et al.*, 2009; Jaramillo, 2009; Ayala *et al.*, 2010).

Los síntomas asociados a la virosis de tomate de árbol incluyen la presencia de mosaicos con ampollamientos, deformaciones foliares y cambios en la apariencia de flores y frutos (Jaramillo, 2009). También es posible la ocurrencia de síntomas más específicos como bandeamiento de venas, grabados no geométricos en hojas y frutos, amarillamiento de venas, manchas aceitosas, anillos necróticos y bronceamiento del tejido foliar (Ayala *et al.*, 2010). Varios estudios han establecido que esta enfermedad es causada por un complejo viral que incluye las especies de virus isométricos: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Potato leafroll virus* (PLRV), además de los virus flexuosos del género *Potyvirus* PVY y TaLMV (Gil *et al.*, 2009; Jaramillo, 2009; Ayala *et al.*, 2010;

Álvarez *et al.*, 2011). El virus TaLMV fue reportado por Ayala *et al.*, 2010, a partir de comparaciones de secuencias de regiones parciales de los genes de inclusión nuclear (Nib) y cápside, que demostraron niveles de identidad inferiores al 70% entre las especies del grupo *Potyvirus* conocidos, siendo el *Colombian Datura virus* (CDV) el que presentó mayores niveles de identidad.

El incremento en incidencia y severidad de la virosis de tomate de árbol en el país, es ocasionado por deficiencias en las prácticas de manejo que realizan los agricultores y por la ausencia de semilla certificada (Álvarez, 2009). A diferencia de otras patologías, las enfermedades virales no pueden ser tratadas con agroquímicos, por lo que su diagnóstico equivocado también trae consigo graves consecuencias sobre costos de producción y ambiente (Bernal *et al.*, 1998; Khan y Dijkstra, 2006). La infección de plantas por virus debe ser controlada de manera preventiva con medidas de manejo que limiten el aumento y dispersión de poblaciones de los agentes vectores, el uso de variedades resistentes y, en particular, el empleo de material vegetal libre de virus (Bernal *et al.*, 1998; Khan y Dijkstra, 2006). Esto último requiere del desarrollo de metodologías especiales que permitan la detección de virus en plantas asintomáticas. Las técnicas más utilizadas para este fin se basan en pruebas serológicas (*western-blot*, *dot-blot*, ELISA y flujo lateral) o en amplificación de regiones diagnósticas de los genomas virales mediante RT-PCR (Craig *et al.*, 2004).

Las pruebas inmunológicas no solo permiten la detección sino también la identificación de virus, de una manera fácil, sensible y a un costo razonable. Cuando los anticuerpos han sido producidos bajo esquemas estrictos de calidad, su utilización ofrece niveles apropiados de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad (Craig *et al.*, 2004). Sin embargo, el éxito de estas pruebas depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos para las proteínas producidas por las diferentes especies virales. porque la nueva especie propuesta de potyvirus TaLMV ha sido recientemente registrada en cultivos de tomate de árbol en Colombia, es fundamental la generación de herramientas de diagnóstico que permitan su detección en los programas de manejo integrado de enfermedades que se realizan en este cultivo. Pese a que en la actualidad existen anticuerpos para la detección genérica de potyvirus y algunas especies de importancia, no existen anticuerpos específicos para la detección de TaLMV.

Recientemente Ayala *et al.*, 2010, determinaron la secuencia nucleotídica del virus TaLMV entre dos regiones conservadas correspondientes a los genes codificantes para la proteína de inclusión nuclear b y la cápside. La región N-terminal de la cápside es el segmento más variable entre los potyvirus y contiene los principales epítopes específicos (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Estas dos características sustentan la hipótesis de que es posible generar anticuerpos para el reconocimiento de variantes de potyvirus utilizando péptidos correspondientes a secuencias del extremo amino de la cápside viral. En este trabajo se reporta la obtención de anticuerpos policlonales específicos para la detección del virus TaLMV. Como antígeno, se utilizó un péptido sintético diseñado a partir de la región variable del extremo N-terminal del gen de la cápside viral. La sensibilidad de los anticuerpos, fue evaluada mediante pruebas de ELISA y *dot-blot* utilizando proteína recombinante y péptidos sintéticos como controles. La utilidad de estos anticuerpos para la detección del virus TaLMV en muestras de cultivos de tomate de árbol fue comparada con la amplificación parcial del gen de la proteína de

cápside mediante RT-PCR. Se realizó una prueba piloto para validar el uso de los anticuerpos a partir de plantas de tomate de árbol sintomáticas y no sintomáticas. Finalmente, se evaluó la presencia de dicho virus en plantas de papa con el fin de verificar la posibilidad de infección cruzada entre estas dos especies de solanáceas que comparten agroecosis-temas en las regiones andinas de Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

COLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Las muestras de las plantas de tomate de árbol sintomáticas utilizadas en las evaluaciones serológicas de TaLMV, fueron obtenidas en el corregimiento de Santa Elena (Medellín). Para la realización de la prueba piloto de detección, se obtuvieron en total 22 muestras de tejido foliar, de las cuales cinco muestras provenían de plantas sintomáticas y cinco de no sintomáticas, en igual número de cultivos de los municipios de La Ceja y La Unión (Antioquia). Adicionalmente, con el fin de evaluar la presencia del TaLMV en cultivos de papa, en estos mismos municipios se recolectaron nueve muestras foliares de plantas de papa con síntomas virales y tres de asintomáticas.

CLONACIÓN DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA CÁPSIDE DE TALMV

El ARN molde necesario para la técnica de RT-PCR se obtuvo de tejido foliar de plantas de tomate de árbol con el *kit RNeasy plant mini* (Qiagen, California, USA). Las reacciones de RT-PCR se realizaron en dos pasos (*Two-Step* RT-PCR) utilizando los cebadores TaLMVCP1F (5'gggaattcCATATGGCTGATAAACTTGATGCCGG-3') y TaLMVCPR (5'-cgcGGATCCTCAAGTGCATGAGATTTATTACTTGC 3') diseñados a partir de la secuencia reportada por Ayala *et al.*, 2010. Estos oligonucleótidos contienen secuencias blanco para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. Los nucleótidos extras en el extremo 5' se adicionaron para garantizar buena eficiencia de corte, durante el proceso de clonación. Las reacciones de retrotranscripción consistieron de un volumen de 20 µL, incluyendo 1,9 µL de agua, 4 µL de buffer RT 5X, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de cebador reverso 10 µM, 0,1 µL de inhibidor de RNasa (40 U/µL), 2 L de enzima M-MuLV transcriptasa reversa (20 U/µL; Fermentas, Lituania) y 5 µL de ARN. La reacción se llevó a cabo a 37 °C por 60 min y 75 °C por 15 min. Las muestras fueron mantenidas a 4° C hasta su uso en el PCR posterior.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µL con 16,2 µL de agua destilada estéril, 2,5 µL de buffer de enzima 10X, 1,8 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de cada cebador para clonación 10 µM, 0,2 µL de Taq ADN polimerasa (5 U/µL; Fermentas) y 2,5 µL de ADNc. El programa de PCR consistió en 95 °C por 30 seg, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 52 °C por 45 seg, 72 °C por 45 seg y una extensión final a 72 °C por 5 min, utilizando un termociclador T3 (Biometra, Göttingen, Alemania). Después de verificar el tamaño del amplicón en gel de agarosa a 1,5%, este fue clonado en el plásmido pET15b (EMD Biosciences) utilizado los sitios *NdeI* y *BamHI* de la región de policlonación. La presencia del inserto se confirmó mediante PCR de colonias, análisis de restricción de plásmidos purificados con el *kit* QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) y secuenciación en ambos sentidos en la compañía Macrogen (Corea del Sur).

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA CÁPSIDE VIRAL

La proteína recombinante de la región N-terminal de la cápside de TaLMV fue expresada en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Se cultivaron 1.000 mL de medio LB suplementado con ampicilina [100 µg/mL] a 37 °C y 250 rpm. Al alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6 - 0,8, se indujo la producción de proteína recombinante mediante adición de IPTG 0,1 mM. La expresión se llevó a cabo durante 4 horas a 30 °C. El botón bacteriano fue recolectado mediante centrifugación y conservado a -80 °C. Para la purificación se utilizó el sistema Profinity™ IMAC Uncharged Resin (Bio-Rad, EE.UU.). El *pellet* fue tratado en condiciones no desnaturizantes siguiendo las recomendaciones del fabricante. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón acetato (NaAc 50 mM, NaCl 0,3 M, pH 4,0) y cargada con 5 VC de NiSO₄ 200 mM. Finalmente, se hizo un lavado con 5 VC de agua destilada y equilibró la columna con tampón de lisis (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol y lisozima 20 µL/g). El lisado celular se pasó a través de la columna equilibrada seguido de 5 VC de la solución de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0). Para la elución de la proteína recombinante se utilizó el buffer de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 400 mM imidazole, pH 8,0). La pureza y peso molecular de la proteína purificada fueron evaluados mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La concentración de proteína fue determinada por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Genesys 6 (*Thermo Scientific*) utilizando el coeficiente de extinción teórico (Edelhoc, 1967).

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

El péptido TaLMV(p) fue diseñado con el método de Hopp y Woods, 1981, implementado en el programa BioEdit (Hall, 1999) utilizando un promedio local de hidrofiliidad de 15 aminoácidos. Para el alineamiento múltiple se utilizaron las siguientes secuencias de cápside, las siglas utilizadas en el artículo y códigos de acceso a GenBank se indican en paréntesis: *Lily mottle virus* (LMV, AAN23111), *Colombian Datura virus* (CDV, CAJ34668.1), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBV, AAA62491.1), *Lupine mosaic virus* (LLLMV, YP_004123732.1), *Narcissus late season yellows virus* (NLSYV, CAD38487.1), *Turnip mosaic virus* (TMV, BAF31158.1), *Sunflower mild mosaic virus* (SMMV, ADC43151.1), *Spiranthes mosaic virus 3* (SMV3, ACI06097.1) y *Vanilla distortion mosaic virus* (VDMV, AAY43686.1). El alineamiento múltiple se realizó con el programa Clustal (Thompson *et al.*, 1994). El péptido antigénico, TaLMV(p) seleccionado, corresponde a la secuencia TGKNVEKKDNQDKTL.

El péptido TaLMV(p) fue sintetizado por la compañía GenScript (New Jersey, EE.UU.) mediante el método de fase sólida y verificado por espectrometría de masas y HPLC. Los anticuerpos fueron producidos en dos conejos utilizando péptido sintético TaLMV(p) conjugado con hemocianina KLH. Se adicionó una cisteína C-terminal para facilitar la conjugación. 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 en columnas por afinidad y resuspendidos en PBS, pH 7,4, obteniéndose una cantidad total de 28,09 mg. El título de anticuerpos fue determinado mediante ELISA utilizando 100 µL de péptido a una concentración de 4 g/mL por pozo, en PBS pH 7,4. Para el revelado se utilizaron anticuerpos anti-conejo producidos en cabra conjugados a fosfatasa alcalina (BioRad; H+L).

DETECCIÓN POR ELISA

Se utilizaron los anticuerpos policlonales producidos por ambos conejos contra el péptido TaLMV(p). La concentración mínima para la detección se determinó a partir de diluciones seriadas de 1:1000 a 1:512000 del péptido diseñado y la proteína recombinante purificada. La especificidad de los anticuerpos fue establecida mediante comparación con los controles positivos de la compañía Agdia (Indiana, EE.UU.) para la detección genérica de potyvirus y el virus PVY. También se utilizó proteína recombinante de la cápside de PVA y TaLMV. La efectividad de las pruebas de ELISA fue contrastada con pruebas comerciales para la detección de potyvirus transmitidos por áfidos, de la compañía Agdia. Para estas pruebas se tomaron fracciones de las hojas de muestras sintomáticas y previamente evaluadas como positivas para dichos virus mediante RT-PCR, se pesaron 100 mg de tejido foliar, macerándose con buffer de extracción y realizándose el procedimiento estándar del DAS-ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las lecturas de densidad óptica fueron obtenidas en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia). Cada prueba incluyó el péptido como control positivo a una concentración de 0,1 μ M y el buffer de extracción como control negativo. Los pozos considerados con reacción positiva fueron aquellos en los cuales la lectura de absorbancia a 405 nm tuviera un valor mínimo del doble de la lectura obtenida en el control negativo, siguiendo el criterio de Matthews, 1993.

DETECCIÓN POR WESTERN BLOT

Los muestras fueron corridas en un gel SDS-PAGE 10% (Laemmli, 1970) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante una hora a 115 V en buffer de transferencia (192 mM glicina y 25 mM Tris base). La membrana fue bloqueada con leche descremada en polvo a 5% en buffer TBS-T 1X (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4) durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Para el revelado, se incubó la membrana durante tres horas con una dilución 1:1.000 (1,15 μ g/mL) de anticuerpo primario anti-TaLMV diluido en TBS-T. Luego de realizar tres lavados con TBS-T 1X, se llevó a cabo la incubación del segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad) con las mismas condiciones y concentraciones descritas anteriormente. La detección se realizó utilizando el *kit alkaline phosphatase conjugate substrate* de BIORAD (EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y DETERMINACIÓN DE REGIONES ANTIGÉNICAS

La mayoría de los métodos de predicción de epítopes lineales están basados en correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos y la localización de los epítopes en el antígeno (Wee *et al.*, 2010). Pese a que en la actualidad existe gran cantidad de métodos de predicción que incluyen diversas escalas de hidrofiliidad, flexibilidad o accesibilidad al solvente; se ha demostrado que ninguno de estos programas es significativamente mejor en la predicción de epítopes lineales (Blythe y Flower, 2005). Por esta razón y debido a su simpleza, decidimos utilizar el método de Hopp y Woods, 1981. Este procedimiento fue diseñado para predecir determinantes antigénicos en una proteína, asumiendo que estos se encuentran expuestos en la superficie y corresponden a regiones hidrofílicas. Con el fin de garantizar buena especificidad en el reconocimiento

de variantes de potyvirus se correlacionó este análisis con la variabilidad de la cápside (Fig. 1). En el caso de TaLMV, la región de mayor variabilidad corresponde a la de máxima antigenicidad y por lo tanto cumple con los requerimientos necesarios para la generación de anticuerpos específicos. Los resultados del análisis llevaron a diseñar para el virus TaLMV un péptido con potencial antigénico con la siguiente secuencia: TGKNVEKKDNQDKTL y con el cual se obtuvieron 29,08 mg de anticuerpos de conejo a partir de una inoculación con 5 mg de péptido conjugado con hemocianina (KLH-TaLMV). El título de los anticuerpos anti-TaLMV fue inferior a 1:512.000 (Tabla 1).

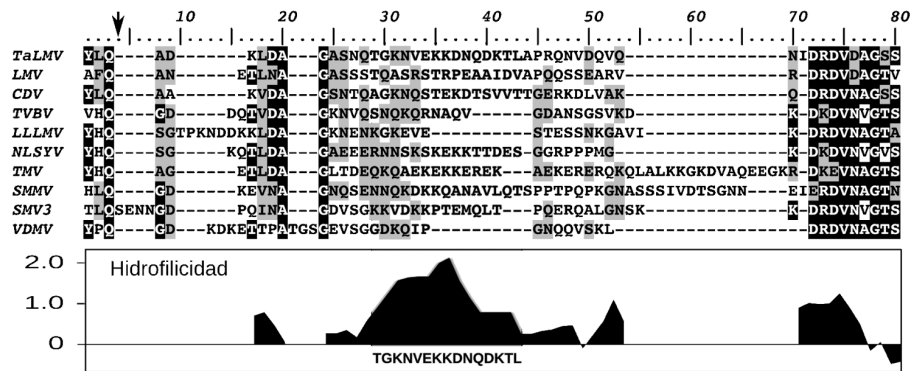


Figura 1. Análisis de la región N-terminal de la cápside de potyvirus. La flecha indica el sitio de procesamiento por la proteasa viral para dar origen a la proteína madura de la cápside. El perfil de hidrofilicidad muestra que la región de mayor exposición corresponde también a la zona de mayor variabilidad de secuencia.

Dilución	A450 (nm) anti-TaLMV
1:1000	2.652
1:2000	2.806
1:4000	2.610
1:8000	2.652
1:16000	2.707
1:32000	2.587
1:64000	2.317
1:128000	1.980
1:256000	1.345
1:512000	0.956
Blanco	0.035
Blanco	0.038

Tabla 1. Determinación del título de anticuerpos para anti-TaLMV.

PRODUCCIÓN DE CÁPSIDE RECOMBINANTE DE TALMV

Con el fin de contar con un control positivo para pruebas de detección futuras y para determinar la especificidad de los anticuerpos se clonó y expresó un segmento de la proteína de la cápside de TaLMV. La proteína recombinante se generó a partir de la se-

cuencia codificante para la región 1-77 de la cápside del virus TaLMV y se expresó como una proteína de fusión con colas de histidina en el extremo amino, TaLMV(r). Esta región comprende el extremo variable N-terminal responsable de la transmisión viral (1-36) y una porción de la región central conservada (37-77). Esta proteína se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) y pudo ser detectada en geles SDS-PAGE a partir de la primera hora de inducción con IPTG (Fig. 2A). La proteína recombinante presentó una migración electroforética compatible con un peso molecular esperado de 10.679 Da. Sin embargo, una vez purificada la proteína, fue evidente la presencia de otras bandas de alto peso molecular múltiplos de la proteína monomérica (Fig. 2B). Dichas bandas fueron reconocidas por el anticuerpo específico anti-TaLMV, aunque parece que este tiene mayor afinidad por la forma dimérica de la proteína (Fig. 2C). Estos dímeros desaparecen en presencia de EDTA 1 mM (datos no mostrados), lo cual sugiere una agregación de la proteína recombinante mediada por metales, un fenómeno frecuente en proteínas purificadas por el sistema de polihistidina, pero irrelevante para su utilización como control serológico (Sprules *et al.*, 1998).

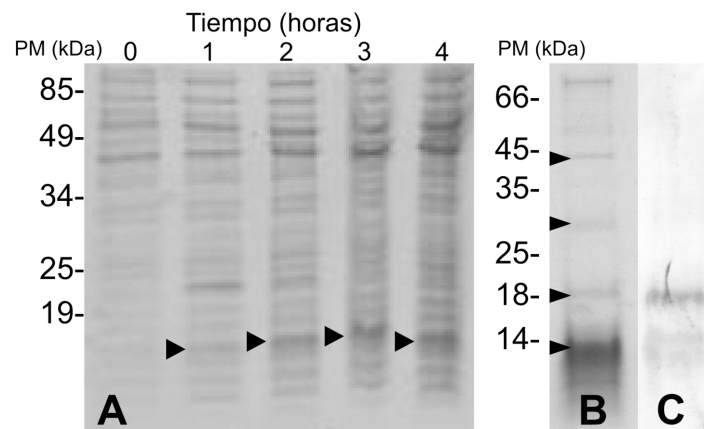


Figura 2. Expresión y purificación de la proteína recombinante de la cápside de TaLMV. (A) Perfil de expresión de la proteína recombinante a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas luego de la inducción con IPTG. (B) Patrón electroforético de la cápside recombinante luego de la purificación. Las flechas indican los diferentes agregados inducidos por la presencia de metales traza. (C) Detección de la proteína recombinante mediante *western-blot*.

ESPECIFICIDAD DEL PÉPTIDO TALMV(P) Y DE ANTICUERPOS ANTI-TALMV

Para descartar la posibilidad de reacción cruzada del péptido TaLMV(p) se llevó a cabo una prueba de ELISA con tres anticuerpos diferentes: anti-Poty (genérico para potyvirus), anti-PVY y anti-TaLMV(p) (Fig. 3A). Dicha prueba demuestra que ni los anticuerpos genéricos para potyvirus ni específicos para la detección de PVY reconocen la región N-terminal de TaLMV. En ambas pruebas, la lectura de ELISA contra el péptido sintético fue inferior al control negativo. Los resultados anteriores son los esperados porque para poder realizar un reconocimiento genérico, dichos anticuerpos deben estar diseñados para detectar la región central conservada de la cápside de potyvirus y no el extremo variable amino terminal. Lo anterior contrasta con el resultado de ELISA utilizando los anti-

cuerpos anti-TaLMV que arrojó valores de absorbancia muy superiores a los del control negativo. Es claro que la región variable de TaLMV no presenta reacción cruzada con otros anticuerpos para potyvirus, lo cual es útil para el diagnóstico específico de TaLMV. La especificidad de los anticuerpos anti-TaLMV fue evaluada por ELISA utilizando los controles positivos de dos pruebas comerciales (anti-*Potyvirus* y anti-PVY), cápside recombinante de PVA, péptido TaLMV(p) y la proteína recombinante de una porción N1b-cápside de TaLMV(r) (Fig. 3B).

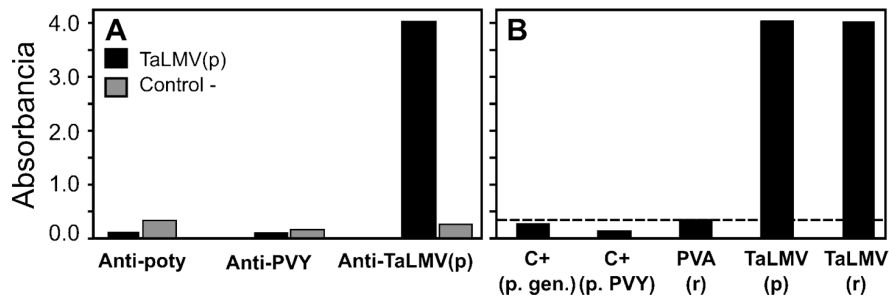


Figura 3. Pruebas de especificidad. (A) Evaluación de la reactividad cruzada del péptido TaLMV(p) contra otros anticuerpos para potyvirus. Los valores de lectura del control negativo se indican en gris. Como control positivo se utilizó anticuerpo anti-TaLMV. (B) Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-TaLMV frente al control positivo de la prueba genérica para potyvirus (C+, p. gen.), control positivo de la prueba para PVY (C+, PVY), proteína recombinante de PVA, péptido TaLMV(p) y proteína recombinante de cápside de TaLMV. El valor del control negativo se indica con la línea punteada.

Los resultados de la prueba indican que el anticuerpo anti-TaLMV solo reconoce TaLMV (p) y TaLMV(r), lo cual resulta altamente deseable para el uso comercial de dichos anticuerpos. Solamente la proteína recombinante PVA dió un valor de absorbancia ligeramente superior al límite determinado por el control negativo, lo que podría indicar una relación filogenética entre ambos virus, para lo cual se hace necesario obtener una secuencia más extensa del genoma de TaLMV, de manera que se pueda evaluar con más detalle dicha situación. Las pruebas de especificidad demuestran que el péptido antigénico es altamente específico para el virus TaLMV y puede ser utilizado como herramienta de diagnóstico para este componente etiológico de la enfermedad de la virosis de tomate de árbol.

LÍMITE DE DETECCIÓN

Para conocer las sensibilidades de los anticuerpos en pruebas de ELISA y *dot-blot* se determinó la concentración mínima de péptido detectable. Para la prueba ELISA, aún a la mínima concentración utilizada (1 nM) el valor de absorbancia fue bastante alto: 2,32 (Fig. 4A). Lo anterior sugiere que el límite inferior de detección sea aproximadamente un orden de magnitud inferior, aproximadamente 0,1 nM. Asumiendo que la cápside de un potyvirus está constituido por aproximadamente 2.000 capsómeros (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001), estimamos que mediante pruebas de ELISA la absorbancia obtenida permite detectar concentraciones de hasta 10^4 partículas virales de TaLMV por

microlitro. En el caso de la detección en membranas mediante *dot-blot*, el límite de detección corresponde a una concentración 1 μM (Fig. 4B). Lo anterior equivale a una sensibilidad 10.000 veces menor respecto a ELISA y un título viral de 10^8 partículas virales por microlitro. Con el fin de establecer si este límite de detección es razonable para el diagnóstico de muestras vegetales, se realizó una prueba de *dot-blot* utilizando plantas con y sin síntomas virales (Fig. 4C). Como control positivo se utilizó el péptido TaLMV (p). En el caso de plantas sintomáticas siempre se observó una zona de coloración concéntrica a la zona de fijación de la muestra (Fig. 4C, derecha).

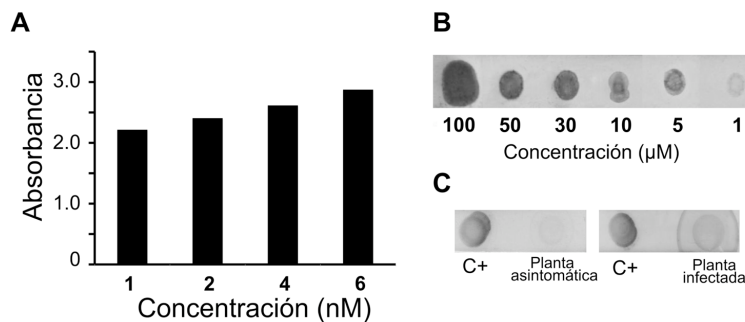


Figura 4. Límite de detección de los anticuerpos. Efecto de la concentración de antígeno sobre la detección por ELISA (A) y *dot-blot* (B). (C) Detección de TaLMV en plantas de tomate de árbol asintomáticas e infectadas.

PRUEBA PILOTO CON MUESTRAS DE CAMPO

La utilidad de los nuevos anticuerpos fue evaluada a partir de muestras obtenidas directamente de cultivos de tomate de árbol del oriente antioqueño y contrastada con la detección con anticuerpos comerciales y RT-PCR (Fig. 5A). Con este fin, se recolectaron cinco plantas asintomáticas de tomate de árbol (AT1-5) y un número igual de plantas sintomáticas (ST1-5). Como control negativo se utilizaron plantas producidas mediante cultivo de meristemos y presumiblemente libres de virus. Todas las muestras sintomáticas fueron positivas para la presencia de potyvirus utilizando anticuerpos comerciales (OD entre 2,3 y 4,0). Los valores de absorbancia para las muestras asintomáticas fueron significativamente menores a los de las plantas con síntomas (OD entre 0,32 y 0,67), pero superiores o muy cercanas al límite inferior establecido para considerar la prueba como positiva (0,33). Lo anterior confirma observaciones de Jaramillo, 2009, que indican que la falta de síntomas en plantas de tomate de árbol no corresponde necesariamente a la ausencia de virus. La prueba de ELISA con los anticuerpos anti-TaLMV indicó la presencia de este virus en cuatro plantas asintomáticas: AT1, AT3, AT4 y AT5; y cuatro sintomáticas: ST2, ST3, ST4 y ST5. Ninguna de las plantas obtenidas por cultivo de tejidos fue positiva con los anticuerpos utilizados (datos no mostrados).

La detección serológica de TaLMV fue contrastada con la amplificación parcial del gen de la proteína de cápside a partir de muestras sintomáticas mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos para este virus. Los resultados de la amplificación sugieren claramente la presencia del virus en todas las plantas sintomáticas y una asintomática (AT4). Teóricamente la prueba de RT-PCR es más sensible para la detección de virus de

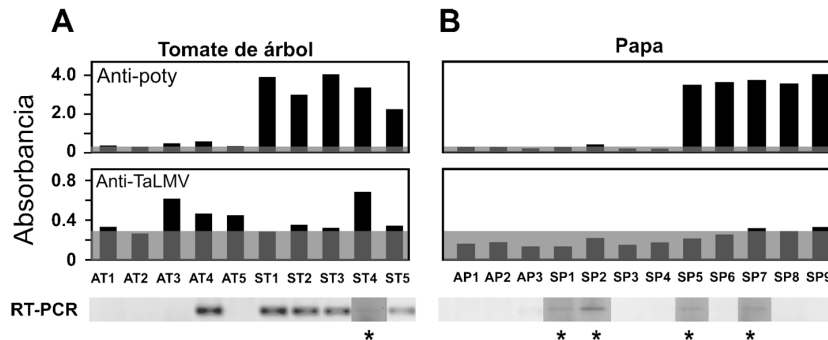


Figura 5. Detección del virus TaLMV en muestras de campo. Detección de virus TaLMV en plantas de tomate de árbol (A) y papa (B) por ELISA utilizando anticuerpos genéricos (Anti-poty) y específicos para TaLMV (Anti-TaLMV). Todas las plantas fueron evaluadas por RT-PCR. Los asteriscos indican muestras para las que utilizó mayor cantidad de muestra y fueron corridas en otra electroforesis.

plantas que las pruebas serológicas (Craig *et al.*, 2004). Sin embargo, la amplificación es altamente dependiente de la calidad del ARN extraído y de la presencia de inhibidores de RT y DNA polimerasa (Hsu *et al.*, 2005). Esto explicaría algunos de los problemas de amplificación en muestras positivas por ELISA, más aún cuando Jaramillo, 2009; Álvarez, 2010 reportan que la oxidación de las muestras de tomate de árbol una vez maceradas, aún bajo tratamientos con agentes reductores, afecta dramáticamente la eficiencia de las reacciones de RT-PCR. Estos mismos autores plantearon la posibilidad de transmisión cruzada de virus entre cultivos de papa y tomate de árbol. Esta hipótesis está fundamentada en la detección de cepas virales PVY y PLRV en plantas de tomate de árbol (Álvarez *et al.*, 2011); con secuencias idénticas a las encontradas por Gil, 2010, en papa. Para este fin, se evaluó la presencia de potyvirus y TaLMV en tres plantas de papa asintomáticas (AP1-3) y nueve plantas con síntomas virales (SP1-9) como amarillamientos, mosaicos, enanismos y/o aclareamiento de venas secundarias. Las muestras fueron colectadas en la misma zona de recolección del material de tomate de árbol (municipios de La Unión y La Ceja), donde confluyen ambos cultivos. Los anticuerpos genéricos comerciales detectaron altos niveles de potyvirus en las muestras de papa sintomáticas SP5-SP9. La muestra SP2 fue positiva pero con bajos niveles de título viral. Todas las demás muestras fueron negativas. La detección con anticuerpos anti-TaLMV fue positiva para plantas de papa sintomáticas SP7 y SP8. La detección de TaLMV mediante RT-PCR fue positiva para las muestras SP1, SP2, SP5 y SP7 (Fig. 5B). Estos resultados apoyan la hipótesis de transmisión cruzada de virus entre papa y tomate de árbol y reafirman la necesidad de establecer evaluaciones biológicas de patogenicidad cruzada. En el caso que dichas pruebas confirmaran los resultados serológicos y moleculares aquí encontrados, sería fundamental revisar los sistemas de producción en las zonas productoras de estas solanáceas y ajustar sus programas de manejo integrado de enfermedades.

El control de enfermedades virales en plantas requiere de un manejo diferente respecto a otras patologías. El éxito en su control radica principalmente en una combinación de buenas prácticas de manejo y en la disponibilidad de herramientas diagnósticas de detección temprana. Esto último requiere un conocimiento apropiado de la biología del

virus. Desafortunadamente, la mayoría de los sistemas comerciales de detección están diseñados para evaluar la infección por virus de importancia económica global, dejando a un lado patologías asociadas a cultivos exóticos como tomate de árbol. Algunas de las herramientas más eficientes de detección, como *western-blot*, *dot-blot*, ELISA y flujo lateral, requieren de la obtención de anticuerpos específicos que, por lo general, son difíciles de lograr. En este trabajo hemos demostrado la viabilidad de utilizar péptidos sintéticos para la producción de anticuerpos específicos. Para el caso de los potyvirus, el diseño del antígeno requiere del conocimiento de la secuencia N-terminal de la cápside viral. Nuestro procedimiento difiere significativamente de metodologías clásicas que requieren de la purificación del virus a partir de plantas infectadas, los cuales son bastante laboriosos, costosos y no garantizan la producción de anticuerpos de alta especificidad (Craig *et al.*, 2004; Khan y Dijkstra, 2006). Por otra parte, hemos demostrado la utilidad de estos anticuerpos en la detección de variantes de potyvirus específicas para nuestro país mediante métodos inmunodiagnósticos como ELISA y *dot-blot*. Esto hace viable la implementación de métodos de diagnóstico *in situ* de fácil utilización como las pruebas de flujo lateral, lo cual constituiría un aporte importante para el manejo de fitopatógenos de importancia económica en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto COLCIENCIAS Código 1118-405-20317 Contrato 408-2007 y por la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín a través del proyecto DIME BICENTENARIO 2008-2009: 20101007745.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ J. Caracterización serológica y molecular de virus asociados al material de siembra de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Bosh) en Colombia [Tesis de Maestría]. Bogotá: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2009.
- ÁLVAREZ J, COTES JM, MARÍN M. Detección de virus asociados al material de siembra de tomate de árbol en Colombia. Biotec Sector Agrop y Agroind. 2011;9(1):43-50.
- AYALA M, GONZÁLEZ P, GUTIÉRREZ P, COTES JM, MARÍN M. Caracterización serológica y molecular de potyvirus asociados a la virosis del tomate de árbol en Antioquia (Colombia). Acta biol Colomb. 2010;15(3):1-37.
- BERNAL JA, SALDARRIAGA A, ZAPATA JL. Evaluación de la transmisión del virus del tomate de árbol. [Informe final]. CORPOICA-PRONATTA; 1998.
- BERNAL JA, TAMAYO PJ. Tecnología para el cultivo del tomate de árbol. Manual técnico n.º 3. Centro de Investigación La Selva. Corpoica; 2003.
- BETANCOURTH C, GOYES R, BRAVO DA. Caracterización biológica de un virus del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Send) en el departamento de Nariño. Fitopatol Colomb. 2003;27:7-10.
- BLYTHE MJ, FLOWER DR: Benchmarking B cell epitope prediction underperformance of existing methods. Protein Sci. 2005;14:246-248.
- CRAIG G, STEPHEN W, WYLIE J, JONES M. Diagnosis of plant viral pathogens. Curr Sci india. 2004;86:1604-1607.

CRUZ J. Identificación de virus en *Solanum betaceum* [Trabajo de grado]. Bogotá: Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia; 2005.

CUSPOCA J. Evaluación de virus de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en plantas indicadoras y su detección por PCR [Trabajo de grado]. Bogotá: Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia; 2007.

EDELHOCH H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry-US*. 1967;6(7):1948-1954.

GIL JF. Diagnóstico y caracterización molecular de virus asociados al cultivo de la papa en Colombia, con énfasis en el virus mop-top (PMTV, Pomovirus) [Tesis de Maestría]. Medellín: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2010.

GIL JF, AYALA ML, MARÍN M, GONZÁLEZ P. Identificación de *potyvirus* en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* cav.) en Antioquia mediante detección serológica. *Rev Politécnica*. 2009;5:112-120.

HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S*. 1999;41:95-98.

HOPP TP, WOODS RK. Predictions of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(6):3824-3828.

HSU YC, YEH TJ, CHANG YC. A new combination of RT-PCR and reverse dot blot hybridization for rapid detection and identification of *potyviruses*. *J Virol Methods*. 2005;128:54-60.

JARAMILLO M. Análisis serológico y molecular de virus asociados al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia [Tesis de Maestría]. Medellín: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2009.

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

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.

MATTHEWS REF. Diagnosis of plant virus diseases. New Zealand: CRC Press; 1993.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL 2006. Observatorio agro-cadenas Colombia. [Citado, diciembre de 2008]; Disponible en: <http://www.agrocadenas.gov.co>.

SPRULES T, GREEN N, FEATHERSTONE M, GEHRING K. Nickel-induced oligomerization of proteins containing 10-histidine tags. *Biotechniques*. 1998;25(1):20-22.

TAMAYO PJ. Mosaico del tomate de árbol. *Ascolfi Inf*. 1990;16:54-55.

TAMAYO PJ. Enfermedades virales del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. en Colombia. *Ascolfi Inf*. 1996;22:26-29.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-4680.

URCUQUI-INCHIMA S, HAENNI AL, BERNARDI F. *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. *Virus Res*. 2001;74:157-175.

WEE LJ, SIMARMATA D, KAM YW, NG LF, TONG JC. SVM-based prediction of linear B-cell epitopes using Bayes Feature Extraction. *BMC Genomics*. 2010;4:S21.