



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización genómica de los virus que infectan los cultivos de gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*) en Antioquia para el apoyo de los programas de certificación de semilla

Daniela Cardona Mejía

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2021

Caracterización genómica de los virus que infectan los cultivos de gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*) en Antioquia para el apoyo de los programas de certificación de semilla

Daniela Cardona Mejía

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director (a):

Pablo Andrés Gutiérrez Sánchez. Biol., Ph. D.

Codirector (a):

Mauricio Alejandro Marín Montoya. I.A., M.Sc., Ph. D.

Línea de Investigación:

Virología vegetal

Grupos de Investigación:

Biotecnología microbiana

Biotecnología vegetal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2021

A mi madre por ser luz en mi vida

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Daniela Cardona Mejía

Nombre

Daniela Cardona Mejía

Fecha 26/11/2021

Agradecimientos

A los profesores Mauricio Marín, Pablo Gutiérrez, Rodrigo Hoyos y Guillermo Correa, por guiar este proceso de aprendizaje y compartir sus conocimientos.

A los grupos de investigación de Biotecnología microbiana y Biotecnología vegetal, especialmente a Andrea Restrepo, Jaime Posada, Erika Corrales y Andrea García por su acompañamiento y apoyo incondicional durante esta investigación. Se agradece al personal técnico de Caribbean Exotics y de Jardín Exotics por su apoyo en la colección de las muestras vegetales utilizadas en la investigación.

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías del Departamento de Antioquia (Proyecto 1101-805-62786, Convenio No. 4600007658-779) y realizado con la participación de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Universidad CES y Caribbean Exotics. El proyecto fue supervisado por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia y por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia. Las muestras biológicas fueron obtenidas bajo la Resolución 0209 del 9 de marzo de 2020 del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia.

Nota al lector

Atendiendo a la normatividad para la presentación de tesis del posgrado en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, los capítulos se presentan directamente como artículos científicos preparados, sometidos o publicados en revistas indexadas por Colciencias; por lo tanto, estos tienen el formato propio de la respectiva revista.

Resumen

La gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) es el segundo frutal exótico más exportado en Colombia, después de la uchuva, adquiriendo un gran potencial en el sector frutícola a nivel mundial. A pesar de su importancia, los conocimientos frente a las prácticas agronómicas del cultivo son reducidos, por lo que el manejo de enfermedades, especialmente aquellas de origen viral, es muy limitado.

Las enfermedades virales de las plantas causan grandes pérdidas en la producción agrícola mundial al reducir los rendimientos de los cultivos, afectar la calidad de los frutos y disminuir la longevidad de las plantas. La sintomatología que inducen los virus en las plantas puede aparecer después de largos periodos de infección causando mosaicos, moteados, deformaciones foliares, enanismos, variegaciones, y amarillamientos, entre otros; sin embargo, en algunos casos las infecciones pueden ser asintomáticas, lo que dificulta aún más la detección temprana de los agentes causales.

Debido a la poca información que aún se tiene sobre el viroma de la gulupa, sus mecanismos de transmisión y la sintomatología asociada, este trabajo de investigación tuvo como objetivo detectar e identificar los virus que infectan los cultivos de gulupa en el Oriente y Suroeste de Antioquia utilizando pruebas moleculares, como RT-qPCR y secuenciación de nueva generación (NGS), para el apoyo de los programas de manejo fitosanitario y certificación de semilla de este frutal. Los resultados obtenidos indicaron que el virus de RNA con mayor prevalencia en los cultivos en producción fue el tymovirus passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) con un 62%, seguido por el potyvirus soybean mosaic virus (SMV) con 22% y por el cucumovirus cucumber mosaic virus (CMV) presente en el 10% de las muestras. Por otro lado, la detección viral en el material de siembra (brotes de semillas y en plántulas) utilizado en estas regiones indicó la presencia del PFYMV (82%), SMV (44%) y CMV (12%). Adicionalmente, se detectó un virus de

DNA del género *Badnavirus* (gulupa bacilliform virus A -GBVA) en el 60% del total de las muestras evaluadas, así como un nuevo tymoviridae en el suroeste de Antioquia, cuyo nombre tentativo es: purple passionfruit leaf deformation virus (PpLDV). Finalmente, se estableció un protocolo para el cultivo *in vitro* de explantes de gulupa y enraizamiento *ex vitro* y se evaluaron las técnicas de limpieza viral de termoterapia y quimioterapia sobre plántulas de 2-3 meses, obteniendo un porcentaje de eliminación viral en el tratamiento térmico del 71,4% para PFYMV. Por otra parte, el tratamiento de quimioterapia permitió eliminar el PFYMV en un 66,7% de las muestras. Este estudio confirma la importancia de la implementación de técnicas moleculares y métodos de secuenciación masiva como herramientas eficientes para el diagnóstico temprano de infecciones virales en cultivos de importancia económica. Se espera que estos resultados contribuyan al diseño de programas de manejo integrado de enfermedades en gulupa, a la generación de material de siembra certificado por su sanidad vegetal y al establecimiento de sistemas de vigilancia cuarentenaria que eviten la dispersión de los virus aquí reportados en los cultivos de este frutal en Antioquia y otras regiones del país.

Palabras clave: Passifloraceae, quimioterapia, RT-PCR, secuenciación de alto rendimiento, termoterapia, virus de plantas

Abstract

Genome characterization of viruses infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia as support of seed-certification programs

Due to the little information available on the viruses affecting purple passion fruit, their associated symptoms and transmission mechanisms, this work aimed at characterizing this virome in eastern and southwestern Antioquia. Viruses were detected using PCR-based methods such as RT-qPCR and high-throughput sequencing (HTS). The information presented here will provide significant insights into the design of disease management strategies and seed certification programs for this crop. This study reveals that the most prevalent RNA viruses in purple passion fruit fields are the tymovirus passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) at 62%, the potyvirus soybean mosaic virus (SMV) at 22%, and the cucumovirus cucumber mosaic virus (CMV) at 10%. On the other hand, analysis of viruses infecting the plantlets and seed-sprouts used by farmers in these regions revealed the presence of PFYMV at 82%, SMV at 44%, and CMV at 12%. In addition to these viruses, a new DNA virus, gulupa bacilliform virus A (GBVA, *Badnavirus*), was detected in 60% of samples. Additionally, a new member of the family *Tymoviridae*, tentatively named purple passion fruit leaf deformation virus (PpLDV), was discovered in field samples from the southwest. Protocols to produce *in vitro* explants and *ex vitro* rooting were also developed in this work to investigate the effect of chemotherapy and thermotherapy on virus eradication. Thermotherapy resulted in 71,4% elimination of PFYMV, in contrast to 66,7% with chemotherapy. This work confirms the importance of implementing molecular and high-throughput sequencing methods as routine diagnostic tools for the early detection of viruses in economically important crops. Hopefully, the results presented here will contribute to the implementation of an integrated disease management program for purple passion fruit, the production of planting material free of

viruses, and the establishment of quarantine monitoring and surveillance protocols of incoming planting stocks in Antioquia and elsewhere in Colombia.

Keywords: chemotherapy, high-throughput sequencing, Passifloraceae, plant viruses, RT-PCR, chemotherapy.

Contenido

	Pág.
Resumen	X
Introducción	1
Objetivos	5
Marco teórico	6
Capítulo 1.	77
Detección molecular de virus en cultivos, plántulas y semillas de gulupa (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>) en el oriente de Antioquia	77
A. Anexos: Capítulo 1	105
Capítulo 2.	113
Viruses infecting purple passion fruit (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>) in Southwestern Antioquia (Colombia)	113
B. Anexos: Capítulo 2	139
Capítulo 3.	147
Natural infection of purple passion fruit (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>) by a novel member of the family <i>Tymoviridae</i> in Colombia	147
C. Anexos: Capítulo 3	172
Capítulo 4.	177
Establecimiento de plántulas de gulupa (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>) bajo condiciones de cultivo <i>in vitro</i> para su utilización en programas de certificación de semilla por su sanidad viral	177
D. Anexos: Capítulo 4	204
Capítulo 5.	206

Evaluación de termoterapia y quimioterapia ex vitro en plántulas de gulupa (Passiflora edulis f. edulis) como tratamientos de limpieza viral.	206
E. Anexos: Capítulo 5	228
Conclusiones y recomendaciones	234

Lista de figuras

	Pág.
Marco teórico	
Figura 1: Características morfológicas de la gulupa.	9
Figura 2: Estimativos del área, producción y rendimientos del cultivo de gulupa en Colombia durante 2009 a 2019	11
Figura 3: Síntomas de algunas enfermedades causadas por hongos y bacterias en cultivos de gulupa.	13
Figura 4: Síntomas asociados a enfermedades virales en hojas de gulupa	15
Figura 5 : Estructura y genoma de virus pertenecientes al género <i>Potyvirus</i> .	17
Figura 6: Estructura y genoma del virus del género <i>Cucumovirus</i> .	20
Figura 7: Estructura y genoma de un carlavirus	22
Figura 8: Estructura y genoma de un virus de la familia <i>Rhabdoviridae</i> .	23
Figura 9 : Estructura y genoma de un virus de género <i>Tymovirus</i> (A) Estructura del virión de <i>Tymovirus</i> . (B) Genoma lineal de RNA de cadena positiva.	25
Figura 10: Estructura y genoma de un virus del género <i>Badnavirus</i> (A) Estructura del virión de <i>Badnavirus</i> (B) Genoma de DNA de doble cadena circular.	26
Figura 11: Principales estructuras en las zonas de transición derivadas del meristemo apical.	45
Capítulo 1	
Figura 1. Síntomas asociados a enfermedades virales en plantas de gulupa en producción procedentes del oriente de Antioquia.	99
Figura 2. Resultados de la detección molecular de virus en muestras de gulupa utilizando RT-qPCR y PCR convencional	100
Figura 3. Detección y caracterización de genomas de virus mediante secuenciación masiva de nueva generación (HTS)..	101
Figura 4. Diagrama del genoma de PFYMV obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa en producción..	102
Figura 5. Diagrama del genoma de SMV obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa en producción.	103

Figura 6. Diagrama del genoma de GBVA obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa en producción (BPE89), así como de plántulas (BPE16) y semillas (BPE15). 104

Capítulo 2

Figure 1. Plant samples used in this study.	118
Figure 2. RT-qPCR detection of RNA viruses in purple passion fruit.	124
Figure 3. PCR detection of RNA viruses in purple passion fruit.	125
Figure 4. Detection of virus-like sequence in the five RNAseq datasets.	126
Figure 5. Scaffold assembly and phylogenetics of virus partial genomes detected in purple passion fruit samples.	128

Capítulo 3

Fig. 1. Collection sites and symptoms of viral infection in purple passion fruit.	167
Fig. 2. General description of the purple passionfruit leaf deformation virus (PpLDV) genome.	168
Fig. 3. Relationship of purple passionfruit leaf deformation virus (PpLDV) to other members of the family <i>Tymoviridae</i> .	169
Fig. 4. Detection of PpLDV by RT-qPCR in purple passion fruit samples from different regions in Antioquia.	170
Fig. 5. Detection of PpLDV by standard RT-PCR.	171

Capítulo 4

Figura 1. Análisis de varianza y prueba de medias de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los medios de cultivo evaluados y las variables respuesta para el establecimiento de plantas <i>in vitro</i> de gulupa	187
Figura 2. Respuestas morfológicas de explantes de gulupa en diferentes medios de cultivo bajo condiciones <i>in vitro</i> .	188
Figura 3. Crecimiento y desarrollo <i>in vitro</i> de explantes de gulupa en medio de cultivo 6	189
Figura 4. Inducción de enraizamiento <i>ex vitro</i> en explantes de <i>P. edulis f. edulis</i> procedentes del medio de cultivo 6	191
Figura 5. Detección molecular de PFYMV, CMV y SMV a partir de plantas madre de gulupa mediante RT-qPCR.	192

Figura 6. Detección de virus en plantas de *P. edulis* f. *edulis* mediante HTS utilizando la plataforma PVDP.. 193

Capítulo 5

Figura 1. Análisis de varianza y prueba de medias de Tukey para determinar los efectos entre las temperaturas y las variables fenotípicas de plántulas de gulupa. 215

Figura 2. Análisis de varianza entre las concentraciones de ribavirina en diferentes tiempos de inmersión radicular de gulupa respecto a las variables fenotípicas. 219

Lista de tablas

	Pág.
Marco teórico	
Tabla 1. Área, producción y rendimiento del cultivo de gulupa en Colombia en los departamentos con mayor producción de 2017 a 2019.	10
Tabla 2. Virus reportados infectando especies del género <i>Passiflora</i> en el mundo.	16
Capítulo 1	
Cuadro 1. Lista de primers utilizados en este estudio para la detección de virus en gulupa.	105
Capítulo 2	
Table 1. List of primers used in this study.	121
Capítulo 3	
Table 1. Description of the RNAseq datasets used in this study.	154
Table 2. Comparison of the PpLDV amino acid sequences of functional domains with equivalent regions from different members of the family <i>Tymoviridae</i> .	159
Capítulo 4	
Tabla 1. Secuencias de primers utilizados en este estudio.	186
Tabla-2. Valores promedio obtenidos para cada variable respuesta de acuerdo con el tratamiento hormonal <i>in vitro</i> aplicado a los explantes de gulupa.	188
Tabla 3. Evaluación de tres citoquininas diferentes en el cultivo <i>in vitro</i> de explantes de gulupa utilizando como base el medio de cultivo 6.	192
Capítulo 5	
Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados en este estudio para la síntesis de cDNA y RT-qPCR.	214

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de plantas de gulupa sometidas a termoterapia <i>ex vitro</i> después de 45 días de tratamiento.	220
Tabla 3. Porcentaje de disminución de carga viral y eliminación de PFYMV en plantas de gulupa después de tratamiento de termoterapia.	220
Tabla 4. Porcentaje de supervivencia de plantas de gulupa sometidas a tratamiento con quimioterapia <i>ex vitro</i> después de 45 días.	224
Tabla 5. Porcentaje de disminución de carga viral y eliminación de PFYMV en plantas de gulupa después de tratamiento de quimioterapia con ribavirina.	225

Introducción

El cultivo de pasifloras en Colombia ocupa un lugar importante en el sector agrícola, debido a su gran potencial comercial, medicinal y ornamental (Lobo y Medina, 2009; Asande et al., 2020). *Passiflora* es el género más importante dentro de la familia Passifloraceae, con un gran número de plantas llamadas como frutas de la pasión, entre las que se encuentran *Passiflora edulis* Sims. var. *flavicarpa* (maracuyá), *Passiflora ligularis* Juss. (granadilla), *Passiflora tarminiana* var. *mollissima* (curuba) y *Passiflora edulis* f. *edulis* (gulupa) (Miranda et al., 2009).

De todas las pasifloras de frutos comestibles, la gulupa es bastante apetecida en el exterior por sus características organolépticas y nutricionales, ocupando en Colombia el segundo lugar en la lista de las frutas exóticas más exportadas durante 2020, con ventas externas de US\$34,51 millones de acuerdo con la Asociación Nacional de Comercio Exterior (Analdex, 2020). Esta fruta exótica nativa de Sudamérica se adapta fácilmente a las regiones andinas de departamentos como Antioquia, Cundinamarca, Tolima y Boyacá, convirtiéndose en un frutal promisorio para los agricultores nacionales por su alto valor en el mercado internacional (Jiménez, 2006).

Aunque la producción frutícola en Colombia se ha tecnificado notablemente en los últimos años, el conocimiento sobre los problemas fitopatológicos del cultivo de gulupa es aún incipiente, por lo que la mayoría de las prácticas realizadas para el manejo son tomadas y adaptadas de otros cultivos de pasifloras como maracuyá y granadilla (Ocampo y Wyckhuys, 2012). No obstante, profundizar sobre la biología de los agentes causales y comprender las interacciones existentes entre el hospedante, los patógenos y las condiciones ambientales propias del cultivo, son aspectos determinantes para el diseño de programas efectivos de manejo integrado de enfermedades.

Según datos recolectados por Agronet, en 2018 se destinaron 1.472 ha para el cultivo de gulupa en Colombia, con un aumento en el área cultivada para el 2019 a 1.495 ha; sin embargo, los rendimientos disminuyeron de 17,86 t/ha a 16,32 t/ha durante el mismo periodo (Agronet, 2019). Esta reducción en la productividad se asocia entre otros factores con un aumento en la incidencia de plagas y enfermedades. La alta demanda en las exportaciones de esta fruta implica un crecimiento progresivo del área de siembra, que,

sumado a la implementación de prácticas sanitarias inapropiadas, incrementan la vulnerabilidad del cultivo a diferentes problemas fitosanitarios, lo que puede resultar en grandes pérdidas económicas (Rubio et al., 2020).

Entre las enfermedades que limitan la producción de la gulupa se encuentran principalmente las ocasionadas por bacterias, hongos y virus, patógenos responsables de pérdidas entre 15% y 60% (Hodson, 2005; Camelo, 2010). Las enfermedades de origen viral en plantas son uno de los factores más limitantes de la producción agrícola en el mundo; sin embargo, estos agentes causales son los menos estudiados hasta ahora, por lo que se mencionan de manera generalizada en los manuales locales de manejo integrado de enfermedades. Para el caso de los frutales, algunos de los efectos más evidentes inducidos por los virus incluyen la disminución en los rendimientos de los cultivos y de su longevidad, el deterioro en la calidad de las semillas disponibles para nuevas siembras y la pérdida de las características organolépticas de los frutos, incluyendo sabor, color, olor y textura, con la consecuente reducción de su valor comercial (Marín y Gutiérrez, 2016).

El manejo de enfermedades virales en los cultivos generalmente implica la siembra de semilla certificada por su sanidad viral, la erradicación temprana de las plantas infectadas, el control de los posibles vectores transmisores y la disminución de arvenses como posibles focos de infección. Comúnmente, la sintomatología en las plantas se manifiesta cuando la carga viral ha aumentado significativamente, minimizando las estrategias de control debido a la ausencia de productos antivirales de uso agrícola para su tratamiento (Marín y Gutiérrez, 2016). Es por esto, que el manejo de enfermedades de origen viral se basa inicialmente en la realización de prácticas preventivas que eviten el ingreso de los virus a las plantas, retrasen la llegada de posibles vectores, además de la utilización de material de siembra no infectado. Lamentablemente, en Colombia aún no existen programas de certificación de la sanidad del material vegetal de gulupa, lo que dificulta los planes de expansión y la tecnificación de este frutal en el país.

El objetivo de este trabajo fue identificar los virus que afectan los cultivos de gulupa en Antioquia, implementando pruebas moleculares como RT-qPCR y RT-PCR convencional, apoyados por el uso de técnicas de secuenciación Sanger y de nueva generación (NGS)

además de la utilización de herramientas bioinformáticas para caracterizar los genomas de los virus más prevalentes para el apoyo de los programas de manejo fitosanitario y certificación de semilla de este frutal en el departamento de Antioquia. Adicionalmente, se estableció un protocolo de propagación *in vitro* de gulupa y se evaluaron técnicas de limpieza viral como termoterapia y quimioterapia directamente sobre plántulas, como alternativa para generar material vegetal libre de virus. Se espera que los hallazgos de esta investigación apoyen los programas de manejo integrado de enfermedades en los cultivos de gulupa y brinden las bases para obtener material vegetal certificado por su sanidad viral que pueda ser propagado masivamente por parte del sector fruticultor del país.

Objetivos

Objetivo General

Identificar y caracterizar los genomas de los virus que infectan los cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) utilizando técnicas serológicas y moleculares para el apoyo de los programas de manejo fitosanitario y certificación de semilla de este frutal en el departamento de Antioquia.

Objetivos específicos

- Detectar los virus que afectan los cultivos de gulupa en tejido foliar y material de siembra en dos subregiones del departamento de Antioquia, utilizando metodologías moleculares.
- Secuenciar parcial o totalmente los genomas de los virus detectados en cultivos de gulupa del departamento de Antioquia, utilizando herramientas bioinformáticas para su caracterización molecular.
- Evaluar técnicas de limpieza *in vitro* de virus en plantas de gulupa, determinando su efectividad mediante técnicas moleculares de detección viral.

Marco teórico

Cultivo de gulupa

La gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) también conocida como curuba redonda, maracuyá purpura, parchita, pasionaria, cholupa morada, cocorilla o *purple passion fruit* (Ocampo et al., 2007; 2010) pertenece a la familia Passifloraceae y al género *Passiflora*, uno de los más diversos con cerca de 530 especies, la mayoría de ellas nativas de los trópicos y subtropicos de América (Ulmer y MacDougal, 2004). Este género es también el más importante a nivel económico debido a que muchas de las especies son cultivadas por sus frutos comestibles, propiedades medicinales o por la morfología de su flor (Dhawan et al., 2004; Yockteng et al., 2011). En Colombia, este género es el más representativo de la familia con 167 especies de un total de 187 reportadas, de las cuales 165 son nativas y 58 son endémicas del país (Bernal et al., 2015; Caleño y Morales, 2019).

De la gran diversidad de especies que alberga este género, la forma botánica *P. edulis* f. *edulis* es la más cultivada y económicamente importante, ocupando uno de los primeros lugares en la lista de frutales exportados en Colombia. La gulupa es una planta semileñosa, perenne, trepadora, con hojas alternas, nectarios extra florales y usualmente propagada a través de semilla (Angulo, 2009; Gutiérrez et al., 2011). Este frutal es originario del sur de Brasil, Paraguay y del norte de Argentina (Morton, 1987), crece vigorosamente como enredadera en las regiones tropicales cálidas y frías con latitudes entre 0° a 35°. Actualmente las plantaciones comerciales de esta fruta se concentran en la India, Nueva Zelanda, Indonesia, Australia, Israel, África, Estados Unidos, Perú, Ecuador, Brasil y Colombia (Ruggiero et al., 1996; Deshmukh et al., 2017); sin embargo, por las condiciones que favorecen su crecimiento y fructificación, esta especie se ha adaptado muy bien a las montañas de los Andes tropicales, donde puede crecer por encima de los 1.400 msnm (Ocampo et al., 2010).

Económicamente, los frutos de gulupa representan el producto más importante en este cultivo y son utilizados para el consumo en fresco o para la elaboración de jugos, postres y conservas por su intenso sabor y aroma (Sierra et al., 2013). Además del valor comercial de sus frutos exóticos, algunas investigaciones realizadas en gulupa han demostrado un gran potencial fitofarmacéutico debido a los alcaloides, fenoles,

flavonoides y compuestos cianogénicos que contiene en hojas, flores o frutos; atribuyéndole propiedades sedativas, vermífugas, ansiolíticas, antiespasmódicas, diuréticas y eméticas (Dhawan et al., 2004; Yockteng et al., 2011; Caleño y Morales, 2019). Gracias a su apariencia, valor nutricional, propiedades medicinales y cualidades exóticas, la gulupa es bastante apetecida en otros países y aunque en su apariencia física es muy similar al maracuyá (*P. edulis* f. *flavicarpa*) existen diferencias morfológicas y moleculares que indican que corresponden a dos variedades botánicas diferentes (Ocampo et al., 2007).

Características botánicas del cultivo

La gulupa o fruta de la pasión purpura es una enredadera, perenne y semileñosa, con un tiempo de vida que puede durar entre 5 y 7 años en condiciones fitosanitarias adecuadas (Deshmukh et al., 2017). El sistema radicular es fasciculado, ramificado y tanto la raíz principal como las raíces secundarias tienen crecimiento reducido y superficial, ya que el 90% de ellas están ubicadas en los primeros 45 cm de profundidad (Angulo et al., 2009). Esta planta trepadora se adhiere a las superficies a través de zarcillos dispuestos en forma de espiral con longitudes entre 30 a 40 cm que surgen de la base de la hoja donde hay estípulas de diferentes formas. La estructura de la planta está definida por el tallo principal del cual se despliegan múltiples ramas laterales. Los tallos son angulares, a medida que aumenta la edad de la planta se vuelven redondos y huecos en el centro (Angulo et al., 2009; Deshmukh et al., 2017). Las hojas son alternas, glabras y trilobuladas simples, dentadas en los bordes; en etapas jóvenes las hojas son simples, con un solo lóbulo y bordes lisos. Las hojas son de color verde oscuro, brillante en la parte superior y más pálidas y sin brillo en el envés (Figura 1A). Además, esta provista de dos nectarios en la base foliar (Ocampo y Posada, 2012).

Las flores son hermafroditas, solitarias y se ubican en la zona axilar de las hojas, su tamaño varía entre 5 a 7,5 cm. Cada flor está conformada por cinco sépalos y cinco pétalos, dispuestos alternadamente, dando la impresión de tener 10 pétalos (Morton, 1957). Los sépalos son verdes y blancos en su interior, mientras que los pétalos son blancos y delgados con los bordes curvos. La corona está formada por largos filamentos, de color violeta en la base y blancos en la mitad superior (Figura 1D), que irradian desde el centro y sostiene el órgano masculino (androceo) (Deshmukh et al., 2017). En su base

hay cinco estambres extendidos con anteras amarillas oblongas y sueltas y un pequeño ovario verde que luego se desarrollará y formará el fruto. En la parte superior del ovario hay tres estilos, cada uno de los cuales termina en una superficie estigmatizada hendida, pegajosa receptora de polen (Angel et al., 2011). Estas flores presentan protandria, fenómeno que ocurre cuando los granos de polen son visibles antes de que el estigma sea receptivo (Cox, 1957). Algunos estudios de polinización en esta especie indican que, aunque la planta es autocompatible, solo el 33% de los frutos se desarrollan por autopolinización, lo que indica que esta especie depende de abejas polinizadoras de los géneros *Epicharis*, *Apis* (*Apis mellifera*) y *Xylocopa*, que permiten aumentar el porcentaje de fecundación y lograr una buena producción (Angel et al., 2011).

El fruto es redondo u ovalado, de 4 a 8 cm de diámetro y comienza a formarse 15 días después de la floración (Lüdders, 2003); en sus etapas iniciales de desarrollo es de un color verde pálido (Figura 1B) y cuando alcanza la madurez se torna morado oscuro (Figura 1C). Este fruto contiene numerosas semillas de color negro, constituidas por aceites, proteína y fibra (Nyanzi et al., 2005), las cuales están rodeadas del arilo, es decir de la pulpa naranja aromatizada de la cual se extrae el jugo (Morton, 1987).

Figura 1: Características morfológicas de la gulupa. (A) Disposición de las hojas. (B) Frutos inmaduros. (C) Fruto maduro. (D) Flor y estructura prefloral. (E) Estructura del cultivo.



Fuente: Cardona, D.

Cultivo en Colombia

Colombia cuenta con el mayor número de especies del género *Passiflora*, las cuales se encuentran distribuidas principalmente en la región Andina y son en su mayoría nativas y endémicas (Gutiérrez et al., 2011). Esta diversidad se debe en gran medida a su privilegiada ubicación en la zona tropical, condición que favorece la producción agrícola durante la mayor parte del año. Las pasifloras representan un mercado creciente de gran importancia en el país, donde se cultivan principalmente cuatro especies con potencial de exportación: gulupa, maracuyá, granadilla y curuba, priorizadas en el plan frutícola nacional. De las anteriores, la gulupa ocupa un importante lugar, al ser la tercera fruta más exportada en Colombia, después del banano y la uchuva (Jiménez et al., 2009).

Las primeras áreas cultivadas de gulupa en el país, se establecieron en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, pero poco a poco se extendieron por

Antioquia, Valle del Cauca y Santander en zonas con altitudes entre 1.400 a 2.200 msnm (Ocampo y Wyckhuys, 2012). No obstante, se ha reportado que las condiciones óptimas para el cultivo de este frutal son temperaturas entre los 15° a 20°C y rangos altitudinales entre 1.800 y 2.200 msnm (Angulo, 2009; Guerrero et al., 2011). A esta altura el cultivo empieza su etapa productiva a los 8 meses, contrario a lo que ocurre en alturas mayores en donde la producción puede empezar de manera tardía disminuyendo su producción (Jiménez et al., 2009), o altitudes menores, donde la etapa productiva inicia tempranamente disminuyendo la longevidad del cultivo, siendo más propenso a ataques por plagas y patógenos (Jaramillo, 2017).

De acuerdo con datos obtenidos por Agronet, el área total sembrada con gulupa en 2019 en Colombia correspondió a 1.495 ha con una producción total de 24.407 t. Los principales departamentos productores de esta fruta son Antioquia con 54,7% de la producción nacional, Tolima con 13,35%, Cundinamarca con 10,57%, Boyacá con 6,39% y Caldas con 3,86%, Sin embargo, las variaciones entre el área cosechada, la producción del cultivo y los rendimientos obtenidos en estos departamentos cambian cada año de acuerdo con las prácticas de manejo implementadas en los cultivos (Tabla 1).

Tabla 1. Área, producción y rendimiento del cultivo de gulupa en Colombia en los departamentos con mayor producción de 2017 a 2019.

Departamento	Área (Ha)			Producción (t)			Rendimiento (t/Ha)		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019
Antioquia	517,2	645,5	600,4	12.228	15.796	13.357	23,6	24,5	22,3
Cundinamarca	136,0	147,9	203,5	2.024	2.051	2.579	14,9	13,9	12,7
Tolima	281,0	342,0	326,0	1.152	1.970	2.560	4,1	5,8	10,0
Boyacá	113,9	85,3	90,8	1.673	1.621	1.559	14,7	19,0	17,2
Caldas	17,9	50,0	45,9	317	1.264	941	17,7	25,3	20,5
Otros	50,9	201,3	228,4	2.669	3.601	3.411	52,4	17,9	14,9
Total	1.257	1.472	1.495	20.063	26.303	24.407	15,96	17,86	16,32

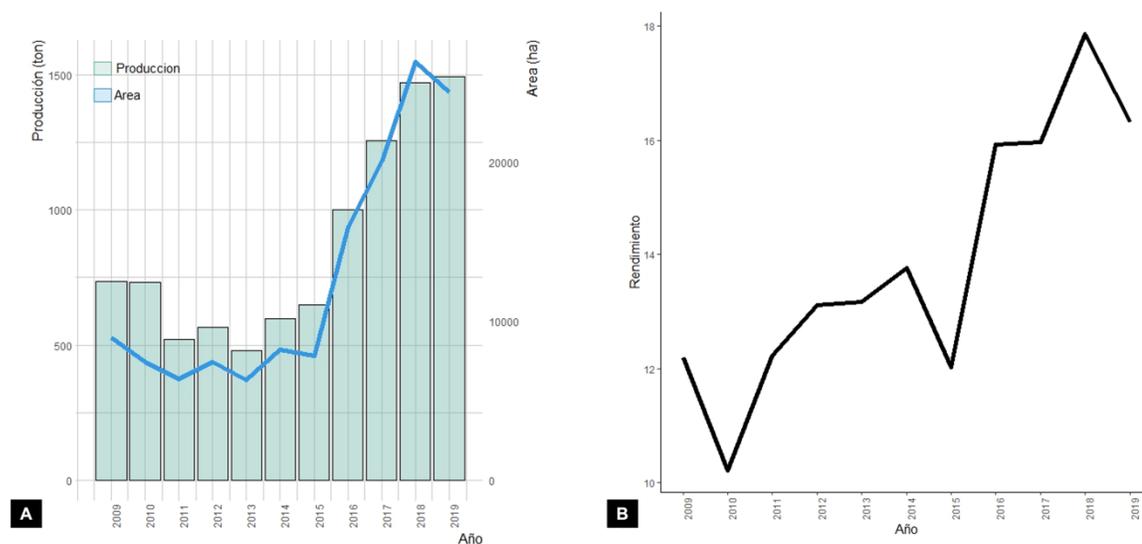
Fuente: Agronet, 2019.

Aunque en los últimos años el departamento de Antioquia ha liderado la producción de gulupa en el país, se observó una disminución en el área sembrada de 2018 a 2019, con reducciones en la producción de 2.439 t (Agronet, 2019). Generalmente esto ocurre por

la llegada de problemas fitosanitarios causados por bacterias, hongos y virus; ya que una vez son detectados en campo, su manejo y control implica altos costos por lo que terminan abandonando el cultivo enfermo o cambiando la especie vegetal cultivada (Guerrero et al., 2011, Jaramillo, 2017).

El consumo local de gulupa es muy reducido, aproximadamente el 20% de la fruta producida es vendida en los mercados nacionales, el 10% corresponde a pérdidas en postcosecha y el 70% restante se comercializa a través de exportadoras hacia el mercado de Europa y Norteamérica, siendo los principales países de destino: Países Bajos, Bélgica, Alemania, Reino Unido, Francia, Italia, Canadá y Suiza (Castilla, 2019). La alta demanda de este fruto en el exterior ha generado un aumento notorio en la producción de gulupa en el país en los últimos 10 años (Figura 2), con una producción anual de 8.980 t para 2009, mientras que en 2019 el cultivo ascendió a 24.407 t, lo que demuestra que el cultivo de esta fruta es una alternativa promisorio para la agroindustria nacional (Agronet, 2019).

Figura 2: Estimativos del área, producción y rendimientos del cultivo de gulupa en Colombia durante 2009 a 2019 (A) Área cultivada (ha) y producción (t) de gulupa por año (B) Rendimientos totales obtenidos de gulupa a nivel nacional dado en (t/ha).



Fuente: Modificado de Agronet, 2019.

A pesar de la importancia económica que representa este cultivo para el país por ser un fruto altamente exportado, los conocimientos que se tienen sobre las prácticas agrícolas para el control de plagas y enfermedades son aún incipientes. Siendo un tema muy relevante debido al gran porcentaje de pérdidas ocasionadas por problemas fitosanitarios con reducciones en la producción de hasta un 80% (Jiménez, 2009).

El cultivo de gulupa presenta diversos tipos de insectos plagas que pueden afectar diferentes partes de la planta, el sistema radicular, por ejemplo, puede ser atacado por trozadores (*Agrotis ipsilon*) y chizas (*Ancognatha scarabeoides*) cortando las raíces de la planta y afectando los tejidos jóvenes; por otro lado, las larvas del gusano trozador (*Dione juno*) y gusano cosechero (*Agraulis* sp.) se alimentan del tejido foliar de las plantas hasta causar defoliación total. Otros artrópodos como la araña roja (*Tetranychus* sp.) y los trips (*Frankliniella* sp.) se ubican en el envés de las hojas, los primeros causan puntos plateados y raspados en las nervaduras, mientras que los trips succionan la savia de las hojas ocasionando daños en la epidermis que facilitan la penetración de otros patógenos (Arevalo et al., 2011; Rodríguez et al., 2016)

El desarrollo de enfermedades en muchas ocasiones se ve favorecido por factores bióticos, produciendo alteraciones fisiológicas o anomalías estructurales deletéreas que reducen considerablemente las producciones (Stakman y Harrat, 1957). Las principales enfermedades que afectan el cultivo de gulupa son originadas por nemátodos, bacterias, hongos y virus. Los nemátodos registrados afectando este cultivo corresponden a los géneros *Meloidogyne* y *Helicotylenchus* y causan adelgazamiento, necrosis o agallas en las raíces (Fischer y Rezende, 2008; Galindo y Gómez, 2010). Entre las enfermedades bacterianas más importantes se encuentra la mancha de aceite causada por *Xanthomonas axonopodis* (Figura 3B), la marchitez bacteriana por *Ralstonia solanacearum*, la mancha de grasa bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* y tumores de cuello por *Agrobacterium tumefaciens* (Miranda et al., 2009; Liberato y Zerbini, 2016, Jaramillo, 2017).

En el caso de las enfermedades causadas por hongos, se destaca el marchitamiento vascular causado por *Fusarium solani* y la pudrición del cuello por *Fusarium oxysporum* (Figura 3C) (Ortiz y Hoyos, 2012), la roña o chancros en frutos causada por

Cladosporium cladosporioides (Figura 3A), la antracnosis por *Colletotrichum gloeosporioides* y la pudrición de raíces causada por *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora nicotianae* (Jiménez et al., 2009; Sanabria, 2010, Cámara de comercio de Bogotá, 2015). En general, estas enfermedades pueden afectar la planta en diferentes estados de desarrollo y causar daños severos en el fruto, impidiendo su exportación.

Figura 3: Síntomas de algunas enfermedades causadas por hongos y bacterias en cultivos de gulupa (A) Roña causada por *Cladosporium cladosporioides* (B) Mancha de aceite por *Xanthomonas axonopodis* (C) Marchitamiento vascular por *Fusarium* spp.



Fuente: Posada, J y Rodríguez, L.

Adicionalmente, en los cultivos de pasifloras se han reportado diferentes enfermedades virales, cuyos agentes causales pertenecen principalmente a los géneros *Potyvirus*, *Tymovirus*, *Cucumovirus*, *Carlavirus* y *Begomovirus*. Entre los que se destaca a nivel mundial la enfermedad de la fibrosidad del fruto causada por *Passion fruit woodiness virus* (PWV) que deforma las hojas y frutos, y causa endurecimiento de la epidermis (Morton, 1987); y el *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) que causa mosaicos y endurecimiento interno de los frutos (Singh, 2004).

Viroma

Las enfermedades virales tienen un gran impacto en la agricultura mundial como resultado de los múltiples efectos que inducen sobre las plantas que infectan (Marín y Gutiérrez, 2016). En Colombia el cultivo de pasifloras también se ve afectado por este

tipo de problemas fitosanitarios causando grandes reducciones en la producción y, en ocasiones, la pérdida de los sitios de siembra (Jaramillo, 2017). Las enfermedades en plantas causadas por virus no siempre son fáciles de diagnosticar debido a que pueden ser asintomáticas o los síntomas solo se manifiestan en estados avanzados de infección, por lo que no hay tratamientos curativos efectivos de control (Marín y Gutiérrez, 2016). Otra situación que dificulta la identificación de estas enfermedades es que frecuentemente los síntomas que producen son confundidos con deficiencias nutricionales o con otros problemas bióticos y abióticos.

Los efectos causados por virus en las plantas pueden ser variables dependiendo de la especie viral y su relación con el hospedante, pero en general producen disminución en los rendimientos, reducen el vigor de las plantas y la longevidad de los cultivos (especialmente en plantas perennes y semiperennes como la gulupa), y modifican las características organolépticas de los frutos, generando plantas más susceptibles al ataque de otros patógenos o a diversas situaciones de estrés ambiental (Marín y Gutiérrez, 2016).

Generalmente, los virus vegetales utilizan dos rutas para la transmisión: vertical y horizontal. La primera incluye la transmisión de virus a través de los órganos propagativos de las plantas, comúnmente se transfieren en aquellas plantas que son propagadas por estacas, esquejes o injertos. Esta transmisión también incluye los virus que son transmitidos a través de semilla sexual, sin embargo, estas son más limitadas (Del 10%-15%) debido a las defensas naturales que ha creado la planta para proteger a la progenie (Marín y Gutiérrez, 2016). La transmisión horizontal involucra dos mecanismos como vía de transmisión, uno de ellos son los insectos vectores generalmente del orden *Hemiptera* (áfidos, moscas blancas, cicadélidos, delfácidos y cochinillas), algunos coleópteros y trips. El segundo mecanismo de transmisión horizontal ocurre por daños mecánicos; en campo, las herramientas empleadas para podas o trasplantes son las formas más comunes de dispersión viral entre plantas enfermas a plantas sanas, debido a la ausencia de técnicas de desinfección (Bandte et al., 2016). De acuerdo con Rodríguez et al. (2016) es necesario considerar que algunos hongos y nematodos también pueden ser transmisores de virus, además, algunos virus más estables pueden hacerlo a través del suelo o el agua (Hong et al., 2014). En la mayoría

de los casos, una vez infectada la planta, permanece con la enfermedad durante toda su vida.

Virus de Pasifloras

Entre las familias virales más representativas que afectan plantas del género *Passiflora* en el mundo se encuentran: *Potyviridae*, *Cucumoviridae*, *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Tymoviridae* y *Geminiviridae* (Fischer y Rezende, 2008).

Los agentes causales de virosis generan serias reducciones en las producciones en todas las especies de pasifloras, especialmente si las plantas son infectadas en estados juveniles de desarrollo. Además de las implicaciones sobre las producciones, la vida útil del cultivo también disminuye considerablemente, pudiendo pasar de cinco años a un año de productividad (Fischer y Rezende, 2008; Camelo, 2010).

En pasifloras, algunos síntomas asociados a enfermedades virales se manifiestan en el tejido foliar como mosaicos, manchas cloróticas, enrollamientos foliares, verdeamiento de venas y deformaciones (Figura 4) (Liberato et al., 2003) y en frutos se presentan manchas cloróticas, deformaciones y endurecimiento (“*woodiness*”). El principal método de transmisión viral en pasifloras se da por insectos vectores como áfidos, coleópteros y moscas blancas; por lesiones mecánicas generadas en las plantas y a través de semillas utilizadas como material de siembra (Manicom et al., 2003; Jaramillo et al., 2018).

Figura 4: Síntomas asociados a enfermedades virales en hojas de gulupa (*P. edulis* f. *edulis*). (A) Mosaicos. (B) Enrollamientos foliares. (C) Verdeamiento de nervaduras. (D) Rugosidades. (E) Deformaciones foliares.



A nivel mundial las enfermedades virales más importantes en pasifloras son causadas por virus del género *Potyvirus* entre los que se destaca el *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (Morton, 1987) y *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Singh, 2004), ambos virus inducen síntomas muy similares como mosaicos, deformaciones y endurecimiento de frutos. En Colombia, investigaciones realizadas en virus que afectan cultivos de pasifloras, han detectado cuatro virus de RNA entre los que se encuentran *Soybean mosaic virus* (SMV) (Morales et al., 2001; Camelo, 2010; Jaramillo et al., 2018, Sepúlveda et al., 2021), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Camelo, 2010), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Camelo, 2010) y el tymovirus *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) (Jaramillo et al., 2019). Adicionalmente, existen dos reportes en el país de infecciones causadas por virus de DNA pertenecientes a los géneros *Begomovirus* y *Badnavirus*, este último ha sido recientemente encontrado en Antioquia afectando cultivos de gulupa (Sepúlveda et al., 2021).

Algunos de los virus que afectan económicamente las pasifloras a nivel mundial se encuentran en Colombia; sin embargo, existen muchos otros virus no reportados hasta el momento en nuestro país. La tabla 2 resume algunos de los virus más relevantes para este género de plantas.

Tabla 2. Virus reportados infectando especies del género *Passiflora* en el mundo.

Género	Virus	País de reporte	Reporte
<i>Begomovirus</i> Candidato <i>Begomovirus</i>	<i>Passion flower little leaf mosaic virus</i> (PLLMV)	Brasil Uganda	Ochwo-Ssemakula et al., 2012 Novaes et al., 2003 Ferreira et al., 2010
	<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i> (PSLDV)	Brasil	Fontenele et al., 2018
	<i>Passion fruit chlorotic mottle virus</i> (PCMoV)	Brasil	Spadotti et al., 2019
	<i>Melochia yellow mosaic virus</i> (MeLYMV)	Brasil	Vaca-Vaca et al., 2017
	<i>Passionfruit leaf distortion virus</i> (PLDV) <i>Giant grenadilla malformation virus</i>	Colombia Colombia	Morales et al., 2000
No asignado	<i>Papaya leaf curl Guangdong virus</i> (PaLCuGDV) <i>Euphorbia leaf curl virus</i> (EuLCV)	China	Huang et al., 2021
<i>Carlavirus</i>	<i>Passiflora latent virus</i> (PLV)	Alemania	Tang et al., 2008
<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Australia Italia Colombia	Dragich et al., 2014 Parrella y Sorrentino, 2009 Camelo, 2010
		Brasil	Vidal et al., 2018
<i>Polerovirus</i>	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV)	China	Zhang et al., 2020
		Brasil	Novaes y Rezende, 2003 Nascimento et al., 2006 Gonçalves et al., 2021 Camelo, 2010 Morales et al., 2001 Gordillo, 2011 Jaramillo et al., 2018
<i>Potyvirus</i>	<i>Passionfruit woodiness virus</i> (PWV)	Brasil	Novaes y Rezende, 2003
	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV)	Brasil	Nascimento et al., 2006 Gonçalves et al., 2021 Camelo, 2010 Morales et al., 2001 Gordillo, 2011 Jaramillo et al., 2018
	<i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)	Colombia Colombia	Morales et al., 2001 Gordillo, 2011 Jaramillo et al., 2018
	<i>East Asian passiflora virus</i> (EAPV)	Taiwan	Chong et al., 2018
	<i>Uraria mosaic virus</i> (UMV)	Japón	Nakasato et al., 2020
	<i>Passiflora foetida virus Y</i> (PfVY) <i>Telosma mosaic virus</i> (TeMV)	Japón China	Nakasato et al., 2020 Chen et al., 2018
Candidato <i>Potyvirus</i>	<i>Passion fruit mottle virus</i> (PFMoV)	Florida (USA)	Baker y Jones, 2007
<i>Roymovirus</i>	<i>Passiflora edulis symptomless virus</i> (PeSV)	Israel	Jover-Gil et al., 2018
<i>Tymovirus</i>	<i>Passion fruit yellow mosaic virus</i> (PFYMV)	Colombia	Morales et al., 2001 Jaramillo et al., 2019
Candidato <i>Rhabdoviridae</i>	<i>Passion fruit green spot virus</i> (PGSV)	Brasil	Fischer y Rezende, 2008
	<i>Passion fruit vein clearing virus</i> (PVCV)	Brasil	Gioria, 2003
<i>Cilevirus</i>	<i>Passion fruit green spot virus</i> (PfGSV)	Brasil	Ramos et al., 2020
<i>Tobamovirus</i>	<i>Maracuja Mosaic virus</i> (MrMV)	Perú	Fribourg et al., 1987

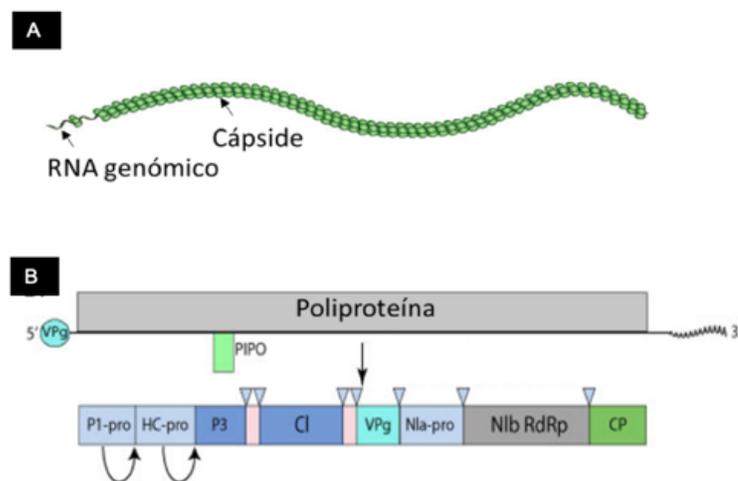
Fuente: Modificado de Rodríguez et al. (2016)

A continuación, se detallan las características de algunos de los principales virus que afectan los cultivos de pasifloras en el mundo.

Potyvirus

El género *Potyvirus* perteneciente a la familia *Potyviridae* contiene 190 virus, siendo el más numeroso de los siete géneros de esta familia (Marín y Gutiérrez, 2016; ICTV, 2020). Los miembros del género se caracterizan por tener partículas virales largas y flexuosas con una longitud de 680 a 900 nm y un diámetro de 11 a 15 nm. Su genoma es monopartita de ssRNA con sentido positivo, de aproximadamente 9.700 nt y codifica para una poliproteína de 340-370 kDa (Fischer y Rezende, 2008; Marín y Gutiérrez, 2016). La poliproteína codificada por genoma es procesada autocatalíticamente en diez proteínas maduras, algunas de las cuales, según Matthews y Hull (2002), inducen la formación de cuerpos de inclusión nucleares y citoplásmicos en las células del hospedero. El procesamiento y función de cada una de estas proteínas maduras no se conoce con precisión, sin embargo, se cree que muchas de ellas son multifuncionales (Marín y Gutiérrez, 2016).

Figura 5 : Estructura y genoma de virus pertenecientes al género *Potyvirus*. (A) Estructura del virión de *Potyvirus*. (B) Genoma de *Potyvirus* codificando para una poliproteína.



Fuente: Modificado de https://viralzone.expasy.org/50?outline=all_by_species; SIB Swiss Institute of Bioinformatics.

El genoma contiene un único marco abierto de lectura (ORF), que codifica para la poliproteína. Se caracteriza por tener una región 5' no traducida (5' NTR), una proteína ligada al genoma (VPg), un ORF y una región 3' no traducida (3' NTR), terminando en una cola poliadenilada (poli-A) (Figura 5). Las diez proteínas funcionales son: primera proteína (P1-pro), componente asistente de proteasa (HC-Pro), tercera proteína (P3), proteína de inclusión cilíndrica (CI), proteína de inclusión nuclear a (NIa), proteína de inclusión nuclear b (NIb; replicasa), proteína de cápside (CP), dos proteínas putativas llamadas 6K1 y 6K2, y la proteína VPg (Camelo, 2010; Marín y Gutiérrez, 2016).

Se han descrito varias enfermedades asociadas con virus de pasifloras en diferentes partes del mundo, reportándose por primera vez el *Passion fruit woodiness virus* (PWV) en cultivos de maracuyá y granadilla en Australia. Posteriormente, se hallaron otros reportes en Nigeria (Martini, 1962), Taiwán (Chang, 1992) y Japón (Iwai et al., 1996). Para 1986, a través de pruebas biológicas y serológicas Kitajima et al. identificaron el PWV como agente causal de la enfermedad "woodiness" en cultivos de maracuyá en Brasil; sin embargo, estudios moleculares realizados por Nascimento et al. (2006) identificaron que se trataba de una cepa de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).

Otros virus de este género que infectan pasifloras son: *Passiflora ringspot virus* (PFRSV) en Costa de Marfil, *Passion fruit crinkle virus* (PCV) en Taiwán, *Passionfruit mottle virus* (PaMV) en Australia, *East Asian passiflora virus* (EAPV) en Japón y *Sri Lankan passion fruit mottle virus* (SLPMoV) en Uganda (Brunt et al., 1990; Liberato y Zerbini, 2003). Además, se ha reportado el *Soybean mosaic virus* (SMV) y el CABMV en Colombia (Benschler et al., 1996; Camelo, 2010; Jaramillo et al., 2018).

Soybean mosaic virus (SMV) es un miembro del género *Potyvirus* que se ha reportado infectando 28 géneros de plantas, de los cuales 23 son de *Fabaceae* (Brunt et al., 1990). El virus del mosaico de la soya tiene un rango de hospedantes muy estrecho y, aparte de la soya, la infección natural se ha documentado solo en *Passiflora* spp. (Hajimorad et al., 2018). SMV se transmite naturalmente por al menos 33 especies de áfidos (Edwarson y Christie, 1986) de manera no persistente y a través de semillas infectadas (Jaramillo et al., 2018). Un estudio realizado en Antioquia reportó el primer genoma completo de SMV en un hospedante diferente a la soya, apoyados en secuenciación de nueva generación;

aportando a la caracterización del viroma que hasta ahora se conoce en *P. edulis* f. *edulis* (Jaramillo et al., 2018). Por otro lado, el *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), también perteneciente al género *Potyvirus*, es capaz de infectar muchas especies de la familia *Fabaceae*, además de cepas que infectan a miembros de la familia *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Laminaceae*, *Passifloraceae* y *Solanaceae*. Sus principales hospedantes son el caupí y el maracuyá. El CABMV se ha reportado en todo el mundo, pero es particularmente importante en África. La naturaleza y la gravedad de los síntomas inducidos por este virus son extremadamente variables y cambian con el huésped, la cepa del virus y el momento en que ocurre la infección (Shoyinka et al., 1997).

Los síntomas producidos por estos potyvirus son variables, PWV y CABMV causan mosaicos, enrollamiento, moteado, clorosis intervenal y deformación en las hojas, reducción del desarrollo vegetativo de las plantas, y endurecimiento y deformación de los frutos (Fischer y Rezende, 2008). Por otra parte, la infección por SMV ha sido asociada a un moteado de hojas de moderado a severo, distorsión de las hojas, necrosis, manchas anulares en los frutos y enanismo general y, ocasionalmente, la muerte de las plantas infectadas (Benschler et al., 1996; Hajimorad et al., 2018). *Passion fruit green spot virus* (PGSV) produce puntos verdes y amarillos en los frutos, parches verdes en hojas senescentes y lesiones necróticas en los tallos (Kitajima et al., 2003; Morales et al., 2006). Por último, PaMV causa manchas leves en las hojas y en el fruto (Fischer y Rezende, 2008).

Los miembros del género *Potyvirus* son transmitidos por varias especies de áfidos, como *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola*, *Toxoptera citricidus* (Halbert et al., 1981). Pueden también ser transmitidos a través de injertos o mecánicamente (Shukla et al., 1998; Nascimento et al., 2006; Fischer y Rezende, 2008; Ha et al., 2008).

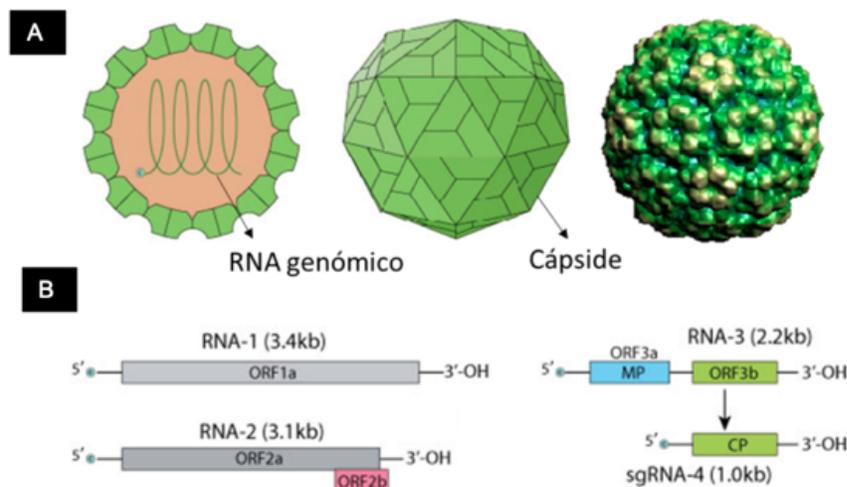
Cucumovirus

El género *Cucumovirus* perteneciente a la familia *Bromoviridae*, se caracterizan porque sus viriones presentan morfología icosaédrica y son transmitidos por 80 especies de áfidos de más de 30 géneros diferentes, de manera no persistente (King et al., 2012;

Gallo, 2020). El genoma de los virus pertenecientes a este género es RNA de cadena sencilla positiva, compuesto por tres segmentos separados en partículas con la misma morfología (icosaédrica), sin envoltura y un tamaño de 25 a 35 nm (Marín y Gutiérrez, 2016).

Cucumber mosaic virus (CMV), la especie tipo de este género, presenta un amplio rango de hospedantes infectando 85 familias diferentes de plantas y cerca de 1.241 especies, causando graves pérdidas económicas en cultivos de ornamentales, hortalizas y frutales. Sin embargo, otras especies virales pertenecientes a este género afectan familias específicas de plantas, con rangos de hospederos más estrechos (King et al., 2012).

Figura 6: Estructura y genoma del virus del género *Cucumovirus*. (A). Estructura del virión de *cucumovirus* (B). Genoma de *cucumovirus* ssRNA (+) lineal tripartito segmentado compuesto por RNA1, RNA2, RNA3.



Fuente: Modificado de https://viralzone.expasy.org/135?outline=complete_by_species; SIB Swiss Institute of Bioinformatics.

El genoma de CMV es de +ssRNA y está dividido en tres segmentos (RNA 1, 2 y 3) (Figura 6). Cada partícula es encapsidada de forma independiente, pero usando los mismos protómeros. Los RNA1 y RNA2 codifican las proteínas necesarias para la replicación de RNA viral, mientras que el RNA3 codifica para la proteína de movimiento y para la cápside (CP) (Gioria et al., 2002; Fischer y Rezende, 2008, Camelo, 2010).

Además de la transmisión por áfidos de manera no persistente, el virus CMV también se transmite mecánicamente a plántulas y por semilla sexual, aunque con grandes niveles de variación; su eficiencia puede ser del 1% al 50% (Gioria et al., 2002; Fischer y Rezende, 2008; Marín y Gutiérrez, 2016).

El virus del CMV es uno de los patógenos más importantes en la agricultura, causando enfermedades severas y grandes pérdidas en cultivos frutales. Recientemente, Lan et al. (2020) detectaron que la infección por CMV en *P. edulis* var. *flavicarpa*, genera efectos sobre el contenido fitoquímico y el desarrollo de la planta, que debido al estrés causado por la infección viral genera mayor producción de metabolitos secundarios.

Los primeros reportes de CMV infectando plantas de maracuyá fueron en Taiwán en 1981, luego en Brasil en 1986, donde no ha sido de gran importancia debido al movimiento sistémico limitado en la planta (Gioria et al., 2002); en la provincia China de Guangdong también se reportó este virus en 1987, así como en Hainan en 1995.

Los síntomas causados en pasifloras por CMV están restringidos a pequeñas porciones de las ramas; las hojas infectadas presentan puntos o manchas anulares amarillo-brillante, la intensidad de los síntomas disminuye hacia la punta de la rama y algunas hojas a medida que crecen pueden volver a tornarse asintomáticas (Gioria et al., 2002; Rigden y Newett, 2005; Fischer y Rezende, 2008; Camelo, 2010). En Suramérica, este virus en pasifloras se ha reportado en Colombia (Carmelo et al., 2010) y Brasil (Kitajima et al., 1986; Gioria et al., 2002).

Carlavirus

Carlavirus es un género de virus de la familia *Betaflexiviridae*. De las especies del género *Carlavirus* en pasifloras se ha reportado el *Passiflora latent virus* (PLV), que tiene morfología de varilla filamentosa flexuosa de 600 a 700 nm de longitud y 12 a 13 nm de diámetro; su genoma es monopartito de ssRNA con sentido positivo de aproximadamente 8.386 nt, excluyendo la cola poliadenilada (Pares et al., 1997; Spiegel et al., 2007). La primera infección en pasifloras con PLV fue reportada para *Passiflora caerulea* y *Passiflora suberosa* en Alemania en 1960 (Brandes y Wetter, 1963). En Estados Unidos,

PLV fue descrito infectando un híbrido de *Passiflora incarnata* y *Passiflora cincinnata* (St Hill et al., 1992), mientras que en el Reino Unido y los Países Bajos fue encontrado en colecciones de germoplasma (Hicks et al., 1996); en Australia se reportó infectando a *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. suberosa* y *Passiflora subpeltata* (Pares et al., 1997).

Los virus de este género se caracterizan por poseer partículas flexuosas de 470 a 1.000 nm de longitud y de 12 a 15 nm de diámetro con simetría helicoidal (Khan y Dijkstra, 2006). Poseen genomas de tamaños que oscilan entre 5.800 a 9.000 nt de RNA de sentido positivo, cuyo extremo 5' posee una caperuza y su extremo 3' tiene una cola poli-A (Figura 7). Poseen seis ORF, El ORF1 representa alrededor del 70% del genoma y tiene tres dominios: hacia el N-terminal de metiltransferasa, helicasa en la parte central, y RdRp (polimerasa) hacia el extremo C-terminal. Los ORF 2, 3 y 4 forman el TGB involucrado en el movimiento de la partícula viral entre células (Marín y Gutiérrez, 2016), el ORF 5 codifica para la proteína de la cápside (~32 KDa) y el ORF 6 codifica una proteína de 12-15 KDa.

Figura 7: Estructura y genoma de un carlavirus (A) Estructura del virión de carlavirus. (B) Genoma de carlavirus lineal de ssRNA (+).



Fuente: Modificado de <https://viralzone.expasy.org/268>; Swiss Institute of Bioinformatics.

De acuerdo con Spiegel et al. (2007), el rango de hospederos de PLV está limitado a especies del género *Passiflora*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium amaranticolor* y *Chenopodium quinoa*. El PLV al parecer afecta con mayor frecuencia a las plantas ornamentales propagadas vegetativamente; en Australia se encontró infectando plantas de *P. edulis* propagadas por injertos (Manicom et al., 2003).

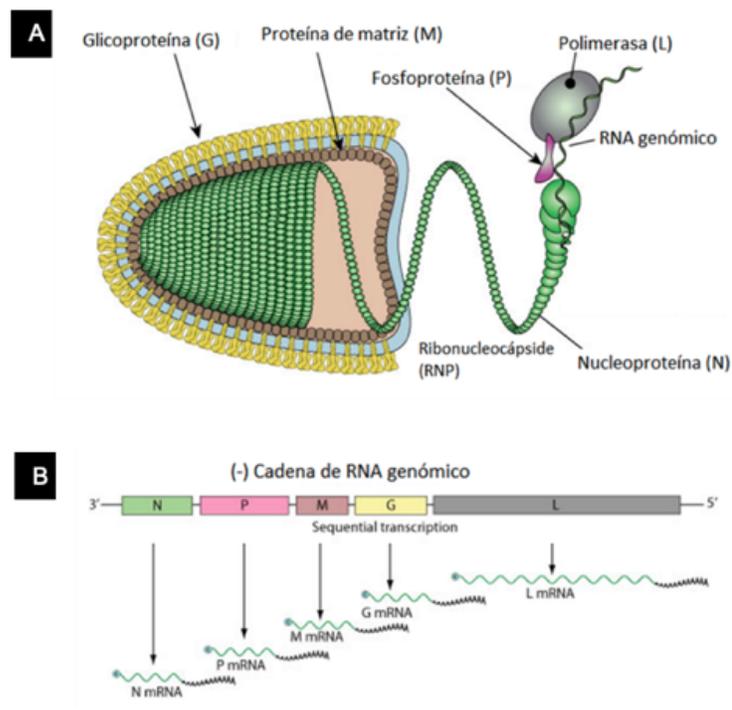
El virus es transmitido por áfidos de manera no persistente y no circulativa; por semilla sexual y rara vez por polen (Fischer et al., 2008; Marín y Gutiérrez, 2016; ICTV, 2020). El síntoma viral en plantas de pasifloras es un mosaico foliar leve y sistémico; sin embargo,

el efecto que causa PLV en la producción de especies de este género se desconoce (Fischer y Rezende, 2008). Infectando otras especies vegetales puede causar necrosis (Marín y Gutiérrez, 2016). En climas más fríos, las hojas más viejas presentan un moteado moderado (Pares et al., 1997; Spiegel et al., 2007; Fischer y Rezende, 2008).

Rhabdoviridae

Los virus de la familia *Rhabdoviridae* tienen una morfología bacilar, miden 100-430 nm de longitud y son los virus de plantas de mayor diámetro (45-100 nm). Su genoma está conformado por una cadena sencilla de RNA negativo de 11.000 a 13.000 nt que codifica para entre cinco y seis proteínas (Figura 8) (Jaramillo, 2017). Posee envoltura externa originada de las células hospedantes; esta estructura conforma del 15% al 25% del virión (Marín y Gutiérrez, 2016).

Figura 8: Estructura y genoma de un virus de la familia *Rhabdoviridae*. (A) Estructura de virión de *Rhabdoviridae*. (B) Genoma de *Rhabdoviridae* lineal de RNA de cadena negativa.



Fuente: Modificado de https://viralzone.expasy.org/2?outline=all_by_species; Swiss Institute of Bioinformatics.

Su genoma esta unido a nucleoproteínas N, la RdRp y a una fosfoproteína (P), formando un complejo de RNP. En su extremo 5' tiene un trifosfato, mientras que el 3' se presenta libre y contiene secuencias complementarias con señales de inicio de transcripción y replicación (Marín y Gutiérrez, 2016). Los genomas de estos virus codifican para cinco proteínas estructurales organizadas en igual número de ORF con el mismo sentido del virión. Además, una o dos proteínas no estructurales son encargadas del movimiento entre células de los virus (Marín y Gutiérrez, 2016).

La enfermedad causada por *Passion fruit vein clearing virus* (PVCV) se encontró en Brasil, causando grandes pérdidas de rendimiento. Otro síntoma que puede inducir es la disminución del tamaño de las hojas y frutos; además de la deformación de las venas en las hojas (Kitajima et al., 1986).

Este virus es probablemente transmitido por injertos a *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa* y *Passiflora maliformis* (Chagas et al., 1983). Hasta ahora el rango de hospedantes y de vectores no se conoce (Fischer y Rezende, 2008). La forma más común de transmisión es por áfidos de manera persistente, que además transmiten el virus a la progenie, pero no se han reportado su transmisión por semillas; solo algunos miembros de esta familia pueden ser transmitidos mecánicamente (Manicom et al., 2003; Singh et al., 2004).

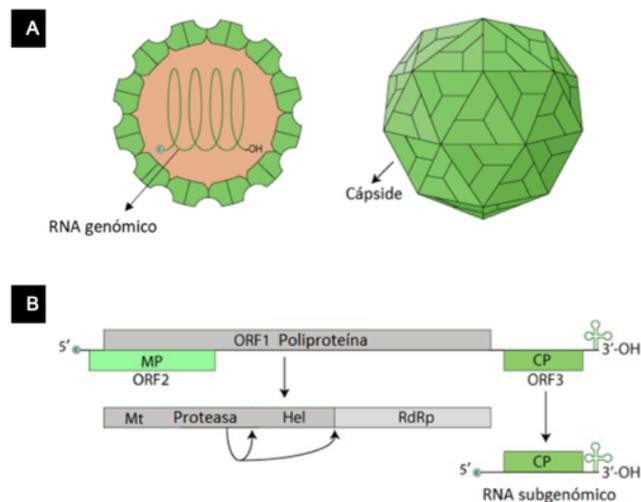
Otro virus de la familia *Rhabdoviridae* encontrado en Brasil infectando cultivos de pasifloras es *Passion fruit green spot virus* (PGSV) (Kitajima et al., 1997; Morales et al., 2006). Es transmitido por el ácaro *Brevipalpus phoenecis* y causa manchas verdes en frutos maduros con centros necróticos (Morales et al., 2006; Kitajima et al., 2003). Los síntomas más comunes que induce son manchas cloróticas en el tejido foliar y manchas necróticas en tallos; incluso puede llegar a causar la muerte de las plantas y eventualmente la destrucción de todo un cultivo. A pesar del gran impacto que tiene PSGV, aún no se han reportado estudios con una caracterización detallada del virus ni de sus mecanismos de infección (Fischer y Rezende, 2008; Kitajima et al., 2003; Jaramillo, 2017).

Tymovirus

Pertenece a la familia *Tymoviridae*, siendo uno de los tres géneros que la conforman, las partículas virales del género *Tymovirus* se caracterizan por ser isométricas sin envoltura, de aproximadamente 30 nm de diámetro. El genoma es de RNA de cadena sencilla positiva (ssRNA) de 6,3 kb (Marín y Gutiérrez, 2016).

Los tymovirus tienen un genoma de entre 6,0 y 6,7 kb de tamaño que codifica para tres ORF y termina con una estructura característica de tipo tRNA^{Val} en el extremo 3' (Dreher, 2009). El ORF1 codifica para una poliproteína que tiene motivos para RdRP, helicasa, proteasa y metiltransferasa y el ORF2 codifica para la proteína de movimiento (MP). La proteína de la cápside se traduce desde un RNA subgenómico en el ORF3 (Figura 9).

Figura 9 : Estructura y genoma de un virus del género *Tymovirus* (A) Estructura del virión de *Tymovirus*. (B) Genoma lineal de RNA de cadena positiva.



Fuente: Modificado de <https://viralzone.expasy.org/57>; Swiss Institute of Bioinformatics.

En Colombia Morales et al. (2001) detectaron una especie del género *Tymovirus* en los departamentos del Valle, Antioquia y Santander con alta similitud (60-76%) respecto al virus del mosaico amarillo del maracuyá descrito en Brasil (Crestani et al., 1986). Por la estrecha relación a nivel serológico entre ambos aislados, se sugiere que se traten de la misma especie (PFYMV); sin embargo, esta información no se puede confirmar hasta que no se caracterice el aislamiento brasileño a nivel molecular.

Por otro lado, Jaramillo et al. (2019) sugirieron la presencia de un nuevo tymovirus infectando cultivos de gulupa en Antioquia, detectado por secuenciación de nueva generación (NGS) y apoyados en técnicas moleculares como RT-qPCR y RT-PCR. Este aislado presentó una alta similitud con PFYMV (85%) y 73% con *Turnip yellow mosaic virus*, indicando que pertenece al género *Tymovirus*.

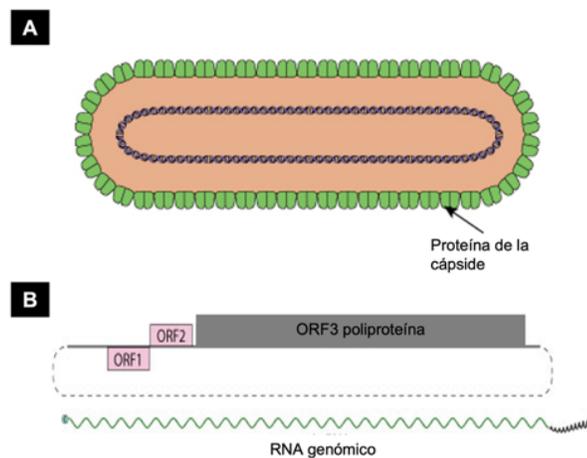
Los síntomas causados por PFYMV son mosaicos, amarillamiento de nervaduras, enanismos, enrollamiento foliar y deformaciones (Morales et al., 2001; Jaramillo et al., 2019). Comúnmente las plantas infectadas por PFYMV exhiben un mosaico característico amarillo brillante. Algunas investigaciones en aislamientos de Brasil han confirmado la transmisión de PFYMV mecánicamente solo entre especies de *Passiflora* (Crestani et al., 1986), mientras que aislamientos colombianos se han transmitido además a tres especies de *Physalis* (Morales et al., 2002). Crestani et al. (1986) observaron que experimentalmente el coleóptero *Diabrotica speciosa* pudo transmitir con baja eficiencia el aislamiento brasileño de PFYMV, pero en Colombia este mecanismo de transmisión no ha sido confirmado. Después del reporte de Crestani no se han encontrado otras infecciones para este cultivo en Brasil (Camelo, 2010). Aparentemente este virus no es transmitido por semilla y los efectos que causa la infección viral en cultivos de pasifloras son aún desconocidos (Fischer y Rezende, 2008).

Badnavirus

Es un género de virus de la familia *Caulimoviridae*, que se caracteriza porque las partículas virales son baciliformes con lados paralelos y extremos redondeados de 30 nm de ancho y longitudes que pueden ir desde los 60 a los 900 nm. Su genoma es de DNA de doble cadena (7.2 a 9.2 Kbp) circular pero no covalentemente cerrado, dada la

presencia de discontinuidad en cada cadena (ICTV, 2021). Los badnavirus se replican por transcripción reversa de un intermediario de RNA, codifican para tres ORF, el ORF1 produce la proteína PI de la cual se desconoce su función, el ORF2 produce una proteína asociada al virión P2 y el ORF3 lo hace para una proteína P3 con dominios de proteína de movimiento, CP, proteasa aspártica y RT/RNasa HI (Figura 10). Algunos Badnavirus pueden tener un ORF4 de función desconocida (Marín y Gutiérrez, 2016).

Figura 10: Estructura y genoma de un virus del género *Badnavirus* (A) Estructura del virión de *Badnavirus* (B) Genoma de DNA de doble cadena circular.



Fuente: Modificado de <https://viralzone.expasy.org/57>; Swiss Institute of Bioinformatics.

Los badnavirus se encuentran distribuidos comúnmente en el trópico y los síntomas que inducen en los hospedantes son clorosis, rayados, mosaicos, moteados, aclaramiento de venas y necrosis. La transmisión de los badnavirus ocurre principalmente por *Pseudococcidae* (cochinillas harinosas), sin embargo, algunas especies son transmitidas por áfidos o chinches. Estos virus no se multiplican en sus vectores, pero pueden ser adquiridos y transmitidos por los insectos en todos sus estados biológicos (Marín y Gutiérrez, 2016).

Algunos badnavirus de importancia económica son: *Banana streak virus* (BSV), *Cacao swollen shoot virus* (CSSV) y *Sugarcane bacilliform IM virus* (SCBIMV). El primer reporte de badnavirus infectando *P. edulis* en Colombia se realizó por Sepúlveda et al. (2021)

sugiriendo la existencia de una nueva especie de badnavirus, nombrada tentativamente como *Gulupa bacilliform virus A* (GBVA); la detección se realizó por PCR convencional empleando cebadores genéricos y específicos, obteniendo los amplicones esperados en cada caso.

Los pararetrovirus pueden integrarse en el genoma del huésped a través de un mecanismo que probablemente implique una recombinación no homóloga que puede conducir a productos de traducción no funcionales (Chabannes et al., 2020).

Métodos serológicos de detección viral

Los sistemas de detección serológica en general utilizan anticuerpos específicos para detectar los antígenos (proteína viral) presentes en las muestras a evaluar, dichos anticuerpos consisten en proteínas de inmunoglobulina (Ig) producidas en el cuerpo de un animal como respuesta a la presencia de antígenos, que generalmente son proteínas, polinucleótidos, carbohidratos complejos o lipopolisacáridos (Goulter y Randles, 1997). Las técnicas serológicas usadas para la identificación de virus se basan en las propiedades proteicas de la cubierta del virus, cada anticuerpo es específico de un antígeno particular (Lima et al., 2012). Existen diferentes métodos serológicos para la detección viral, entre los que se encuentran el inmunoensayo directo en tejido (TBIA), inmunosensores de cristal de cuarzo (QCMI) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Abd El-Aziz, 2019). Este último ha sido empleado para la identificación de virus vegetales desde 1977 (Clark y Adams, 1977). Esta técnica es capaz de detectar partículas de virus en concentraciones bajas y se puede usar en virus con morfologías variables (Lima et al., 2012). Algunos de los virus de plantas que se han detectado por esta técnica son *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Citrus tristeza virus* (CTV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), entre otros (El-Araby et al., 2009). Debido a la adaptabilidad, alta sensibilidad y economía en los reactivos utilizados, ELISA es un método usado para evaluar una gran cantidad de muestras en tiempos relativamente cortos (Vemulapati et al., 2014). El procedimiento se realiza generalmente en placas de poliestireno en las cuales los antígenos del virus son reconocidos por su anticuerpo específico (IgG); las reacciones positivas se detectan cuando un sustrato incoloro sufre una alteración química resultando en un cambio

colorimétrico, como respuesta a la exposición de la enzima unida al anticuerpo. La concentración de antígeno presente en la muestra se determinará por lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Goulter y Randles, 1997). Existen algunas variaciones de esta técnica serológica de detección en placa de acuerdo con el orden de adición de antígeno, anticuerpo y conjugado con enzima al pozo. Una de ellas es la ELISA directa, llamada así porque solo requiere un anticuerpo para la detección. Inicialmente se adiciona el antígeno, seguido de la adición del anticuerpo primario marcado directamente con la enzima conjugada, por lo que el tiempo para completar el ensayo es menor. Sin embargo, debido a que los anticuerpos primarios deben marcarse con la enzima conjugada el costo del ensayo puede aumentar; además, al unir una enzima al anticuerpo, el sitio de unión entre éste y el antígeno puede ser interferido, disminuyendo así la reactividad del anticuerpo (Bio-Rad, 2020).

Por otro lado, el ELISA indirecto utiliza dos anticuerpos durante la detección, lo que implica que la reacción se realiza en dos pasos. Inicialmente el antígeno de interés se une a la placa y luego el anticuerpo primario se adiciona al pozo, generando la primera unión; posteriormente se agrega el anticuerpo secundario marcado con la enzima que se unirá al anticuerpo primario. Este método puede implicar mayor sensibilidad y flexibilidad, ya que más de un anticuerpo marcado puede unirse al anticuerpo primario. Otra ventaja es que el anticuerpo primario tiene más sitios de unión para los anticuerpos secundarios que el antígeno para un anticuerpo, sin ocasionar disminución en la reactividad. Sin embargo, el paso adicional implica mayor tiempo en la realización del ensayo y la reactividad cruzada que puede ocurrir por el anticuerpo secundario aumenta (Covadonga, 2019).

En el sistema DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA) se requiere el uso de pares de anticuerpos coincidentes (anticuerpos de captura y detección), por lo tanto, cada anticuerpo es específico para una región o epítipo diferente y no superpuesto del antígeno. El anticuerpo de captura se une al antígeno, al cual se unirá el anticuerpo de detección que puede estar marcado con la enzima conjugada (DAS-ELISA directo) o requerirá de un anticuerpo adicional que este marcado por la enzima (DAS-ELISA indirecta o TAS-ELISA) (González, 2017). Esta variante se caracteriza por su alta sensibilidad, siendo de 2 a 5 veces mayor a la que ofrece el ELISA directo o indirecto;

adicionalmente al emplear dos anticuerpos para detectar el antígeno aumenta su especificidad, pero también la reactividad cruzada entre los anticuerpos de captura y detección (Bio-Rad, 2020).

Aunque la técnica de ELISA es ampliamente usada para el diagnóstico, la detección viral en plantas y los programas de certificación, presenta algunas desventajas con respecto a los métodos moleculares, debido a que son basadas en las propiedades antigénicas de la cubierta proteica de los virus, la cual según Gould y Symons (1983) representa solo el 10% del genoma total del virus y no se tiene en cuenta el resto del genoma viral. Adicionalmente, aunque la sensibilidad de ELISA ha aumentado en los últimos años, algunas cepas de virus muy relacionadas pueden no diferenciarse correctamente mediante esta técnica (Boonham et al., 2014) o pueden no funcionar correctamente en la detección de viroides, RNAs satélites o en virus que carecen de cápside como el Groundnut rosette virus (GRV) del género *Umbravirus* (González, 2017).

Métodos moleculares de detección viral

Una de las estrategias más importantes para controlar las enfermedades virales en plantas es realizar detecciones precisas y tempranas del agente causal, por lo que se requieren métodos de detección rápidos, altamente sensibles y precisos. Aunque los métodos serológicos han contribuido en los últimos 30 años significativamente en la detección de virus y siguen siendo muy utilizados para esquemas de certificación de material vegetal, los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos han resuelto varias limitaciones que presenta la detección de virus por serología, reduciendo tiempos en la realización de las pruebas y aumentando su eficiencia (Boonham et al., 2014). Una ventaja importante es que pueden ser dirigidos a cualquier región del genoma viral para ser usado como técnica de diagnóstico (González, 2017). Las técnicas moleculares utilizan procesos mediados por enzimas, en los cuales se sintetizan varias copias del ácido nucleico diana. Los productos de amplificación son detectados por dos *primers* que se unen a secuencias complementarias, resultando en la producción de millones de copias de la secuencia objetivo (Cobo, 2012). La técnica de la biología molecular más utilizada fue desarrollada por Kary Mullis en 1983, conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es actualmente utilizada para la detección de cualquier secuencia

de nucleótidos del genoma viral (Zumla et al., 2014). Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de la DNA polimerasa para replicar cadenas de DNA, pasando por tres etapas fundamentales, desnaturalización a alta temperatura; unión de los dos *primers* a su secuencia complementaria en sus dos hebras de DNA y la extensión del *primer* para formar la cadena complementaria por la DNA polimerasa; al finalizar los ciclos (usualmente 30-40) se puede realizar una última extensión durante 5 ó 10 min (Naidu y Hughes, 2001). En cada ciclo las nuevas hebras de DNA sirven de molde para el siguiente ciclo, obteniendo millones de copias del sitio amplificado que pueden ser visualizadas en un gel de agarosa o poliacrilamida (González, 2017).

Debido a la velocidad, versatilidad y especificidad que ofrece esta técnica, es la más utilizada para el diagnóstico de las infecciones virales en vegetales (Rodríguez y Barrera, 2004). El éxito de la PCR depende de su capacidad para amplificar secuencias que diferencien un patógeno de otros, por lo que la elección de los *primers* es de suma importancia. Para llevar a cabo la amplificación de regiones específicas en virus con genoma de RNA, y lograr que la DNA polimerasa realice la extensión, es necesario realizar la RT-PCR, en la cual el RNA debe transcribirse inversamente en cDNA mediante *primers* y una enzima RT, que luego será amplificado por PCR (Cobo, 2012). Otro método utilizado en la detección viral ha sido la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), en la cual la amplificación y la detección ocurren simultáneamente. Este método se basa en la detección de fluorescencia producida por una molécula reportera que aumenta a medida que avanza la reacción. Generalmente las moléculas indicadoras fluorescentes son colorantes como SYBRGreen que se intercalan en el DNA bicatenario o por sondas marcadas con fluorescencia específicas de secuencia como TaqMan (Badali y Nabili, 2012; Garrido et al., 2012). Algunas ventajas de este método es que los resultados se obtienen en tiempo real, además no requiere mucho procesamiento después de la PCR. Debido a que comúnmente los fragmentos amplificados son cortos (70 a 100 pb), la eficiencia y sensibilidad aumentan; además las mediciones obtenidas son cuantitativas lo que las hace útiles en la detección de patógenos (Garrido et al., 2009). Las señales generadas son medidas por el termociclador de tiempo real, registrando el aumento de fluorescencia después de cada ciclo, representado en una gráfica de amplificación que es muy útil para la interpretación de los datos.

El SYBRGreen es un colorante fluorogénico de unión al surco menor del DNA, que se une únicamente al DNA de doble cadena, mas no en el monocatenario (Arya et al., 2005). Las mediciones fluorescentes se realizan al final del paso de extensión de cada ciclo, para medir la cantidad de DNA amplificado. Una ventaja de esta técnica es que es relativamente económica, debido a que se puede usar con cualquier par de *primers* para cualquier segmento objetivo. Sin embargo, la especificidad disminuye cuando se forman dsDNA que corresponden a productos amplificados no específicos o a dímeros de *primers* que también marcan fluorescencia, conduciendo a falsos positivos en la cuantificación (Giulietti et al., 2001). El uso de sondas fluorogénicas surgió como respuesta a estos limitantes. Entre las más conocidas están las sondas TaqMan, que tienen dos tipos de colorantes fluorescentes, uno es el indicador que se adhiere al extremo 5' (reportero) y otro es un desactivador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3' (Aslam et al., 2017). La proximidad cercana del reportero y el *quencher* evitan la emisión de fluorescencia. Debido a la actividad de exonucleasa de la *Taq* polimerasa, el colorante indicador se separa del colorante desactivador y permite la fluorescencia (Dasmahapatra y Mallet 2006). De esta forma, la fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y por lo tanto, a la cantidad de DNA de interés presente en el producto de PCR. Una ventaja de la sonda TaqMan sobre SYBRGreen es la hibridación específica de la sonda, además el ensayo de PCR con TaqMan puede ser multiplexado, permitiendo la amplificación y detección de varias secuencias distintas en una sola reacción de PCR; sin embargo, esta ventaja hace que el método sea mucho más costoso (Schena et al., 2004).

Otras sondas de hibridación de oligonucleótidos monocatenarios son los *molecular beacons* (MB), que son sondas fluorescentes de ácido nucleico que tienen una estructura de horquilla. Esta estructura evita la fluorescencia porque el interruptor está físicamente cerrado al fluoróforo (Mirmajlessi et al., 2015). Dicha estructura está conformada por tres partes fundamentales: la horquilla contiene la secuencia complementaria a la secuencia objetivo y los dos extremos de la horquilla están marcados por un fluoróforo y un *quencher*. A baja temperatura, los MB y las secuencias diana coincidentes forman un híbrido estable, que tiene una fuerte señal de fluorescencia, con el aumento gradual de la temperatura, los MB y los objetivos se separan y los MB forman la estructura de horquilla, debilitándose la señal de fluorescencia (Liu et al., 2017). En comparación con los

métodos convencionales, mediante estas técnicas se elimina la contaminación cruzada del DNA; adicionalmente, los resultados obtenidos son en tiempo real, cuantitativos, altamente sensibles y específicos (Li et al., 2008).

Métodos de Secuenciación

Como se ha mencionado, los patógenos de plantas tienen impacto en la agricultura mundial debido a las reducciones y el deterioro que causan en los cultivos. Diferentes metodologías han sido utilizadas para detectar virus en plantas, incluyendo pruebas serológicas y moleculares; sin embargo, las técnicas de secuenciación han apoyado por mucho tiempo el diagnóstico de enfermedades virales por su precisión y especificidad.

La secuenciación Sanger es uno de los métodos de primera generación, basado en la utilización de una cadena sencilla de DNA, *primers*, una DNA polimerasa y una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) y didesoxinucleótido trifosfato (ddNTP), que hacen que la síntesis termine cuando un ddNTP se incorpora aleatoriamente en cada secuencia, generándose así fragmentos de diferentes longitudes. Cada ddNTP incluye un marcador fluorescente que al unirse emitirá fluorescencia en función del nucleótido asociado. Las lecturas de estas fluorescencias serán entregadas en un electroferograma, indicando cuando ocurre una variante heterocigótica dentro de la secuencia (Gomes y Korf, 2018). Esta técnica se considera como la secuenciación base en biología molecular ya que permite la caracterización molecular de un organismo a partir de un fragmento amplificado por PCR o RT-PCR (Covadonga, 2019). Este tipo de secuenciación requiere para la identificación del patógeno un conocimiento previo del género o la especie del organismo secuenciado, es decir; las pruebas se realizan sobre patógenos específicos, dejando de lado aquellos virus de los cuales no se sospeche su presencia o incluso nuevas especies que no se han caracterizado.

La secuenciación de alto rendimiento (*High throughput sequencing*, HTS) surgió como respuesta a esta situación utilizando métodos de secuenciación más eficientes para la metagenómica viral (Clark et al., 2019), al permitir la identificación de variantes virales y el descubrimiento de nuevos virus vegetales sobre los cuales no se tiene ningún

conocimiento *a priori*. La secuenciación de segunda generación, también conocida como secuenciación de próxima generación (*Next generation sequencing*, NGS) se basa en la preparación de bibliotecas aleatorias de fragmentos de DNA cuando se usa DNA como material de partida, o de cDNA obtenido por retrotranscripción del RNA con *primers* aleatorios u oligo-dT. Estas bibliotecas se amplifican clonalmente, se unen a adaptadores de DNA sintéticos y se secuencian en paralelo (Rubio et al., 2020). Esto produce una gran cantidad de lecturas de secuencia corta (100-500 nt) que se ensamblan conectando lecturas de secuencia superpuestas de acuerdo con la identidad de nucleótidos mediante análisis bioinformáticos. Las plataformas más utilizadas para secuenciación de segunda generación son la tecnología 454 o pirosecuenciación comercializada por la compañía Roche, Illumina, SOLiD e Ion Torrent (Applied Biosystems) (Rubio et al., 2020).

Aunque la secuenciación 454 se utilizó ampliamente para identificar varios virus nuevos y perfiles de viromas, esta plataforma es poco usada en la actualidad, ya que el resto de las tecnologías disponibles ofrecen resultados de mejor calidad y a un mejor precio. Actualmente, Illumina es la plataforma de segunda generación más utilizada, fue lanzada en 2005 por Solexa (ahora Illumina) y utiliza la amplificación clonal *in vitro*. Los fragmentos para secuenciar son preparados con adaptadores en los extremos, para permitir que sus cadenas desnaturalizadas puedan unirse a una superficie sólida y así poder ser enriquecidas por medio de una amplificación tipo puente, generando *clusters* de cadenas del mismo fragmento, con el fin de amplificar la señal generada por los nucleótidos fluorescentes incorporados a la cadena en crecimiento. De esta forma pueden ser detectados por una cámara de alta sensibilidad. Este proceso ocurre de manera cíclica, lo que permite lecturas de más de 100 pb, dependiendo de la plataforma seleccionada (LANGEBIO, 2016). Además, las bases se identifican una a la vez a través de un ciclo de incorporación de bases. El sistema NovaSeq 6000, por ejemplo, es un secuenciador efectivo que logra entregar hasta 20 mil millones de lecturas por ejecución con un máximo de longitud de lectura de 150 nt (Bentley et al., 2008). Si bien hay varias plataformas de secuenciación disponibles, Illumina se ha convertido en la herramienta principal en la mayoría de los estudios debido al bajo costo por base, alto rendimiento y bajas tasas de error (por debajo del 1%) (Wang y Navin, 2015).

El uso de esta tecnología de secuenciación ha permitido obtener las secuencias completas del genoma de dos aislados virales distintos en pasifloras: Hardenbergia mosaic virus (HarMV) y Passion fruit woodiness virus en *Passiflora cearulea* (Wylie y Jones, 2011) y permitió el ensamblaje completo del *Soybean mosaic virus* (SMV) y *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) que infectan a *P. edulis* f. *edulis* en Colombia (Jaramillo et al., 2018, 2019).

Los avances recientes en la secuenciación de alto rendimiento han revolucionado el proceso de secuenciación de ácidos nucleicos y el campo de la genómica viral. En 2009 se emplearon por primera vez para la detección de virus vegetales (Adams et al., 2009; Kreuze et al., 2009) y desde entonces han reemplazado las anteriores tecnologías de secuenciación por los resultados rápidos, confiables y de buena calidad que se obtienen (Prabha et al., 2013). La principal ventaja en estos métodos de secuenciación se debe al hecho que no se requiere conocimientos *a priori* para la identificación viral en una muestra vegetal, pues a través de sondas y *primers* genéricos que se unen con adaptadores de secuencias conocidas, se obtienen las librerías de DNA o cDNA, incluyendo todos los ácidos nucleicos que pueden estar presentes en las muestras (Marín y Gutiérrez, 2016) logrando la identificación de infecciones virales a nivel de especie (Adams y Fox, 2016). Además, es posible detectar e identificar varios virus de manera simultánea, por medio de análisis masivos paralelos, permitiendo el ensamblaje de genomas completos (Kreuze, 2014).

Las nuevas plataformas que se encuentran en desarrollo, conocidos como secuenciadores de tercera generación, permiten la secuenciación de una única molécula de DNA (*single-molecule sequencing*) evitando la amplificación de los fragmentos de DNA mediante PCR. De esta forma, se evitarían las desviaciones generadas durante el proceso de amplificación y, al mismo tiempo, se reduciría el tiempo de trabajo y el precio global de secuenciación. La secuenciación por nanoporos, hace parte de esta tecnología única y escalable permitiendo el análisis directo en tiempo real de fragmentos largos de DNA o RNA. Funciona monitoreando los cambios en una corriente eléctrica generados por el paso de los ácidos nucleicos a través de un nanoporo proteico (Bharagava et al., 2019), la señal resultante se decodifica para proporcionar la secuencia específica de DNA o RNA. Esta técnica permite estudiar la metilación directamente, ya que la señal de

corriente iónica debe ser diferente para los nucleótidos metilados y no metilados (Makałowski y Shabardina, 2020).

A diferencia de las plataformas de secuenciación de DNA tradicionales, que entregan datos en masa al final de la secuenciación, los datos de secuenciación de DNA de nanoporos se transmiten en tiempo real, lo que proporciona acceso inmediato a los resultados. Las ventajas de la transmisión de datos en tiempo real incluyen un acceso rápido a información importante, por ejemplo, la identificación de patógenos, la generación de información temprana de la muestra y la posibilidad de detener la secuencia una vez que se ha logrado un resultado (Oxford Nanopore technologies). Otra aplicación prometedora de la secuenciación de nanoporos se encuentra dentro de los estudios metagenómicos, las lecturas cortas a menudo no pueden distinguir entre especies estrechamente relacionadas, ya que el rRNA utilizado para la codificación es una molécula muy conservada; sin embargo, varios estudios muestran que las lecturas largas podrían ser una solución a ese problema (Makałowski y Shabardina, 2020).

La tecnología de secuenciación Nanopore fue desarrollada por Oxford Nanopore Technologies y es el método más poderoso para la generación rápida de secuencias de lectura larga. Mediante la secuenciación de nanoporos, se puede secuenciar una sola molécula de DNA o RNA sin necesidad de amplificación por PCR o etiquetado químico de la muestra. Las lecturas largas de secuenciación de DNA (hasta 2 Mb) permiten un ensamblaje del genoma mejorado con una caracterización completa de regiones genómicas complejas, incluidas variantes estructurales, transposones e inserciones de transgenes, que brindan nuevos conocimientos sobre la biología del organismo, la evolución y las estrategias de reproducción. La tecnología nanopore se puede aplicar en todas las técnicas de secuenciación de DNA, como secuenciación del genoma completo, secuenciación dirigida, secuenciación metagenómica y epigenética (Oxford Nanopore technologies). Recientemente se ha utilizado con éxito para secuenciar el virus de la gripe (Wang y Navin, 2015) y varios virus vegetales. Bronzato y colaboradores (2018) utilizaron tecnologías de secuenciación de nanoporos combinada con la amplificación completa del transcrito (WTA) para detectar patógenos emergentes de plantas muy rápidamente.

El desarrollo de tecnologías de secuenciación de lectura larga ha sido el principal impulsor de los genomas de muchas plantas. Si bien los métodos de ensamblaje también han mejorado, y se han desarrollado nuevas tecnologías de mapeo físico, la longitud de lectura sigue siendo un factor limitante para ensamblajes genómicos de alta calidad. Los genomas de plantas demuestran ser los más difíciles de ensamblar debido a los altos niveles de heterocigosidad, poliploidía y contenido repetido (Michael y VanBuren, 2020).

Single cell sequencing (SCS)

La secuenciación de células individuales (SCS) ha surgido como un nuevo y poderoso conjunto de tecnologías para estudiar células extrañas y delinear poblaciones complejas. En los últimos cinco años, los métodos de SCS para DNA y RNA han tenido un amplio impacto en muchos campos diversos de la biología, incluida la microbiología, la neurobiología, la inmunología y en la investigación del cáncer (Macaulay *et al.*, 2016).

La secuenciación de una sola célula permite mediciones de alta resolución de la variación de célula a célula que está enmascarada en la secuenciación masiva convencional, en la que cada biblioteca de secuenciación consiste en una población de células en lugar de una sola célula. La importancia del análisis de células individuales se reconoció cuando se evidenció que distintos tipos de células en un organismo se someten a procesos fisiológicos específicos y contienen mutaciones únicas (Shapiro *et al.*, 2006). El análisis unicelular se puede utilizar para mapear la etapa inicial celular hasta la etapa diferenciada, por lo tanto, estudiar las células individuales en plantas podría ofrecer información sobre los mecanismos de regeneración con la identificación de genes críticos, que luego pueden ser usados como marcadores para futuros estudios (Yuan *et al.*, 2018).

En humanos y animales, la evolución somática de las células genera huellas genómicas indicativas de etapas de desarrollo temporal. Del mismo modo, la defensa de la planta al estrés biótico es específica del tejido. Por ejemplo, el estado transcripcional de los tejidos de la raíz del arroz difiere de los tejidos de las hojas después de sufrir la invasión de un hongo (Marcel *et al.*, 2010). Los avances en la secuenciación unicelular pueden ofrecer

nuevas ideas sobre la adaptación al estrés en plantas, particularmente para modelar redes reguladoras de genes (Yuan et al., 2018).

El análisis genómico de células individuales generalmente comprende cuatro pasos: preparación de células individuales, amplificación de DNA, secuenciación de próxima generación y análisis bioinformático (Gawad et al., 2016). El estudio de células individuales en plantas todavía está en sus primeras etapas, una de las razones es que el aislamiento de las células individuales no es sencillo de realizar, ya sea por el porcentaje de error en el procedimiento o porque demandan un alto costo para llevarse a cabo.

Análisis de datos de secuenciación HTS

La aplicación de la secuenciación masiva, además de reducir los costos y el tiempo de análisis, genera una gran cantidad de información, al secuenciar millones de nucleótidos con una alta profundidad de secuenciación que puede resultar en archivos difíciles de analizar y manejar. Para el análisis de datos es importante la implementación de herramientas computacionales que permitan manipular adecuadamente los archivos, además de conocimientos en biología molecular que orienten la correcta interpretación de la información.

Los archivos provenientes de la secuenciación HTS generalmente almacenados en formato FASTQ contienen la secuencia de nucleótidos y las bases por calidad para millones de lecturas, por lo cual inicialmente se debe analizar la calidad de las secuencias obtenidas, con el fin de eliminar secuencias de baja calidad. FastQC es una de las herramientas más usada para este propósito, cuya función es dar una descripción rápida y general sobre la calidad de los datos, indicando que áreas tienen algún problema que se deba tener en cuenta antes de realizar análisis posteriores (Babraham bioinformatics). Valores de calidad mayores a 30 en la escala Phred indican buena calidad en la secuenciación para continuar con su procesamiento, sin embargo, en aquellos casos en los cuales es necesario la eliminación de extremos de baja calidad se utilizan herramientas de depuración como Trimmomatic, Sickle o Seqtk que facilitan el corte en los extremos de los *reads* (Bolger et al., 2014).

Después la depuración inicial, se continua con la alineación de las lecturas, utilizando métodos de mapeo, en los cuales a partir de secuencias de referencia se genera un alineamiento de cada *read* de la secuencia a analizar, generando zonas de solapamiento, por lo cual un factor importante es la elección de secuencias de referencia de alta calidad que permitan acercarnos a nuestra pregunta de investigación. Algunas herramientas de alineación son Bowtie y MagicBlast.

MagicBlast es una herramienta para mapear grandes cantidades de secuencias de RNA o DNA contra un genoma completo o transcriptoma. Cada alineación optimiza una puntuación compuesta, teniendo en cuenta simultáneamente las dos lecturas de un par y, en el caso de RNAseq, ubicando los intrones candidatos y sumando la puntuación de todos los exones. Esto es muy diferente de otras versiones de BLAST, donde cada exón se califica como un hit separado y se ignora el emparejamiento de lectura (NCBI Magic-BLAST). De acuerdo con Boratyn y colaboradores (2019), Magic-BLAST logra mapear con precisión secuencias cortas o largas y descubrir intrones en conjuntos de datos de RNA-seq, a pesar de que es de un solo paso y está alineando el RNA al genoma sin el conocimiento de un transcriptoma. Puede manejar las diferentes tecnologías de secuenciación, tasas de error y sesgos de composición sin ajustes especiales, y esto permite, mapear un RNA-seq al genoma de una especie relacionada cuando no se dispone de un genoma de referencia de buena calidad.

A diferencia de la mayoría de las herramientas de mapeo, Magic-BLAST no construye un índice de un genoma y en su lugar construye un índice de un lote de lecturas y escanea una base de datos BLAST para verificar posibles coincidencias. La base de datos de BLAST se puede crear a partir de un archivo FASTA en poco tiempo con las secuencias reales recuperadas automáticamente del NCBI. También permite mapear o buscar colecciones grandes de secuencias (NCBI Magic-BLAST).

BWA es un paquete de software utilizado para mapear secuencias de baja divergencia contra un genoma de referencia grande, como el genoma humano. Se compone de tres algoritmos: BWA-backtrack, BWA-SW y BWA-MEM. El primer algoritmo está diseñado para lecturas de secuencia Illumina de hasta 100 pb, los otros dos para secuencias más

largas. BWA-MEM también tiene un mejor rendimiento que BWA-backtrack para lecturas de 70-100 pb (Burrows-Wheeler Aligner, 2010). Aunque la herramienta Burrows-Wheeler Aligner (BWA) es una de las herramientas de software de código abierto más utilizadas para alinear secuencias de lectura, todavía es limitada porque no admite completamente mecanismos de subprocesos múltiples durante los pasos de alineamiento (Jo y Koh, 2015).

En aquellos casos en los cuales no se cuenta con genomas de referencia, el ensamblaje debe realizarse *de novo*, con el fin de reconstruir el genoma de nuevas secuencias virales. Las lecturas secuenciadas se ensamblan como *contigs*; una vez que el genoma ha sido completamente secuenciado, ensamblado y anotado, se genera una secuencia de referencia (Prieto et al., 2021). Algunos ensambladores *de novo* ampliamente utilizados son Trinity, Velvet, SOAP *de novo* y SPAdes.

Trinity, representa un método novedoso para la reconstrucción eficiente y robusta *de novo* de transcriptomas a partir de datos de RNA-seq. Este método combina tres módulos de software independientes: Inchworm, Chrysalis y Butterfly, aplicados secuencialmente para procesar grandes volúmenes de lecturas de RNA-seq. Divide los datos de la secuencia en muchos gráficos individuales de Bruijn, cada uno de los cuales representa la complejidad de la transcripción en un gen o locus dado, y luego procesa cada gráfico de forma independiente para extraer, empalmar y separar las transcripciones derivadas de genes parálogos. El proceso funciona así: Inchworm reúne los datos de secuencia de RNA en secuencias únicas de transcripciones, a menudo generando *contigs*. Chrysalis agrupa los *contigs* de Inchworm en grupos y construye gráficos completos de Bruijn para cada grupo. Cada grupo representa la complejidad transcripcional completa para un gen dado (o conjuntos de genes que comparten secuencias en común). Butterfly procesa los gráficos individuales, generando ensamblajes completos (Grabherr et al., 2011).

El ensamblador Velvet *de novo* (Zerbino et al., 2008) se puede usar para construir rápidamente secuencias largas o *contigs*, a partir de conjuntos de datos de lectura corta producidos por NGS. Esta función es principalmente útil cuando se estudian datos de un nuevo organismo para el cual aún no se ha ensamblado un genoma de referencia, o

cuando se trata de determinar el origen de las lecturas no asignadas (Zerbino, 2010). Velvet se centra en dos programas, Velvet y Velvetg, que siempre se usan juntos. Generalmente requieren algunos ajustes de parámetros para cada nuevo conjunto de datos. Sin embargo, dependiendo de los requisitos de búsqueda, puede ser necesario revisar algunos de los parámetros de compilación.

SOAP de novo es un novedoso método de ensamblaje de lectura corta, este programa está especialmente diseñado para ensamblar lecturas cortas de Illumina. Generalmente se utiliza en genomas grandes de plantas y animales, aunque también funciona bien en genomas de bacterias y hongos. Se ejecuta en un sistema Linux con un mínimo de 5G de memoria (*SOAP de novo*: short-read assembly).

SPAdes es un ensamblador de genomas recientemente utilizado para lecturas obtenidas de sistemas Illumina o Ion Torrent. Este ensamblador originalmente tenía como objetivo la secuenciación unicelular, sin embargo, debido a las similitudes entre RNA-Seq y ensamblajes de genoma unicelular, ha funcionado para el ensamblaje de transcriptomas de última generación (Bankevich et al., 2012). SPAdes emplea un gráfico de Bruijn de varios tamaños que detecta y elimina protuberancias / burbujas y lecturas quiméricas, posteriormente se estiman las distancias exactas entre *k-mers* en el genoma, con el fin de construir el gráfico de ensamblaje emparejado y finalmente genera *contigs* que permiten construir y mapear las lecturas de nuevo a sus posiciones en el gráfico (Bushmanova et al., 2019).

Entre las plataformas en línea disponibles para la detección de virus en plantas esta VirFind, esta herramienta bioinformática es capaz de mapear y filtrar las lecturas del hospedante, entregar archivos de lecturas de virus con información taxonómica y los informes Blastn y Blastx correspondientes, y realizar búsquedas de dominios conservados para lecturas de origen desconocido, que le permiten al usuario tomar decisiones sobre si el virus está presente en la muestra, al igual que puede determinar si el virus detectado hace parte de una especie conocida o es una especie nueva (Ho y Tzanetakis, 2014). Virfind acepta diferentes formatos de archivo de entrada (fasta, fastq), mapeando las lecturas a genomas de referencia. Otra ventaja en el uso de esta herramienta es que permite filtrar secuencias que no correspondan a virus, disminuyendo el ruido en los datos de secuenciación (Ho y Tzanetakis, 2014).

Recientemente, Gutiérrez et al (2021) diseñaron la plataforma PVDP (*Plant virus detection pipeline*) para la detección rápida de virus que afectan diferentes plantas, además es una herramienta que permite realizar análisis exploratorios de los resultados obtenidos por HTS. PVDP solo requiere la instalación de Python, megablast y Rstudio e incluye bases de datos curadas de virus vegetales, utilizadas como secuencias de referencia para lograr los alineamientos en cada búsqueda. Finalmente, los resultados obtenidos se entregan a partir de un script de RStudio como un informe html, facilitando su manejo e interpretación. Esta plataforma presenta diversas ventajas respecto a otras plataformas en línea, una de ella es que los scripts están disponibles gratuitamente, además se pueden ejecutar localmente en LINUX, macOS o Windows, y no requiere el envío de datos a terceros ni el acceso a centros informáticos de alto rendimiento. Adicionalmente, PVDP elimina las secuencias redundantes y las secuencias de la planta hospedante antes de realizar la detección viral, mejorando la eficiencia de la búsqueda y permitiendo un mejor uso de los recursos computacionales, ya que es posible el análisis de datos de RNAseq en computadores de mesa estándar con 4/8 GB de RAM.

Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo de tejidos comprende un grupo de técnicas mediante las cuales un explante o propágulo se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición definida, que le aporta los recursos necesarios para su desarrollo, bajo condiciones ambientales controladas donde la célula logra su potencial intrínseco (Aguirre et al., 2010). Los explantes utilizados para la propagación son segmentos pequeños provenientes de cualquier órgano o tejido de la planta, incluyendo raíces, tallos, hojas, yemas, meristemas, protoplastos, células aisladas y granos de polen (Roca y Mroginski, 1991). En los últimos años las técnicas de cultivo *in vitro* han adquirido gran importancia en el establecimiento y propagación de diversas plantas; facilitando la obtención de plántulas libre de patógenos, la búsqueda de homocigosis en las poblaciones y la conservación e intercambio de germoplasma (Aguirre et al., 2010).

El cultivo *in vitro* en pasifloras ha sido poco estudiado hasta ahora, y los reportes existentes se han realizado principalmente en *P. edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá) y en algunas especies silvestres. Sin embargo, debido a la alta variabilidad genética que se

presenta entre especies de pasifloras, sus respuestas bajo cultivo *in vitro* pueden ser muy variable, por lo cual se hace necesario conocer los requerimientos particulares para cada cultivar. Adicional al poco conocimiento que se tiene sobre el cultivo *in vitro* de gulupa, la carencia de material de siembra certificado en el país plantea la necesidad de implementar técnicas de cultivo *in vitro* en esta especie promisoría, para obtener bancos de plantas madre de buena calidad que puedan ser propagadas y distribuidas a nivel nacional.

Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos que actúan sobre el desarrollo de las plantas y cumplen un papel importante en la regulación de diferentes procesos bioquímicos a nivel celular en los organismos vegetales garantizando la homeostasis intra y extracelular (Alcántara et al., 2019). Las principales fitohormonas utilizadas como reguladores de crecimiento vegetal son las auxinas, giberelinas, citoquininas, el etileno y el ácido abscísico.

Las auxinas son sintetizadas en los ápices meristemáticos y en menor cantidad en las raíces. Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (Garay et al., 2014). A nivel vegetal, su principal efecto es que inducen la formación y elongación de tallos manteniendo la dominancia apical, promueven la división celular en cultivos de callos y favorecen la rizogénesis sobre los tejidos de tallos recién cortados (George et al., 2008). La principal auxina producida de manera natural es el ácido 3-indolacético (AIA), aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indolbutírico (IBA), el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (NAA) (Alcantara et al., 2019).

Las giberelinas juegan un rol importante en el alargamiento de los segmentos nodales ya que permite estimular la elongación celular en respuesta a las condiciones de luz y oscuridad. Además, favorecen la germinación de las semillas y tiene alta capacidad estimulante en el crecimiento embrionario, luego de que se da el rompimiento de la

dormancia en las semillas, por lo que es importante en el desarrollo temprano de los embriones vegetales (Alcantara et al., 2019).

Las citoquininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces y pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal; además tienen un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal (Yong et al., 2009). Se sabe que estas fitohormonas suelen producirse de manera abundante en la raíz y se transportan principalmente por el xilema vegetal hacia las partes aéreas de la planta (Bottini et al., 2004) y detienen la dominancia apical y estimulan el crecimiento de las yemas laterales. En proporciones adecuadas, suelen utilizarse en conjunto con las auxinas para promover el desarrollo radicular y estimular el crecimiento de los brotes. Las citoquininas más utilizadas en cultivo *in vitro* son: Kinetina (KIN); bencilaminopurina (BAP) y la zeatina (ZEA) (Córdoba et al., 2010).

Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, en la cual a partir de un explante de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Para llevar a cabo este método de propagación en especies de pasifloras se pueden utilizar como explantes meristemos apicales, segmentos de hojas, segmentos nodales o internodales, semillas, protoplastos o embriones cigóticos (Ozarowski y Thiem, 2013). La micropropagación *in vitro* de esta especie juega un papel importante en la generación de material de siembra libre de patógenos, lo que comúnmente se realiza a través de la selección de brotes apicales y segmentos nodales como fuente de explantes para una rápida multiplicación y con el fin de evitar variación somaclonal, que puede ocurrir al emplear otras fuentes iniciales de explantes. Las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y un agente gelificante. La composición del

medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Castillo, 2004).

La micropropagación es útil para desarrollar rápidamente genotipos de alto rendimiento e injertos resistentes a enfermedades, especialmente en especies vegetales autocompatibles, como es el caso de *P. edulis* var. *flavicarpa*. La mayoría de los cruzamientos realizados entre pasifloras genera variedades altamente resistentes a enfermedades y con valiosas cualidades importantes para la producción (Drew, 1997).

Los dos principales problemas que presenta la micropropagación *in vitro* son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Para evitar la contaminación se puede realizar la desinfección superficial con el lavado de los explantes con ayuda de etanol al 70% por un minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio. Posteriormente, deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril. Por otra parte, la oxidación ocurre por la presencia de compuestos fenólicos, lo cual está asociado con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés como el daño mecánico producido por el aislamiento del explante de la planta madre. Dichos compuestos fenólicos liberados al medio pueden inhibir el crecimiento e incluso causar la muerte del explante. Por ello, para minimizar el daño se emplean agentes absorbentes de fenoles en el medio de cultivo como el carbón activado o antioxidantes como el ácido ascórbico, o bien, cultivando en condiciones de oscuridad (Olmos et al., 2010).

Técnicas de limpieza viral

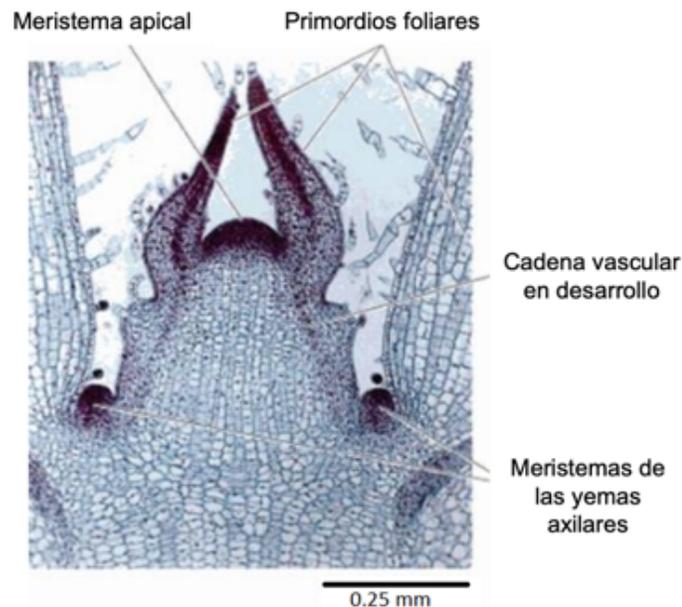
Para muchas especies propagadas vegetativamente, como por ejemplo papa, ajo, yuca y algunos frutales, es frecuente la transmisión de diferentes virus por esta vía de reproducción. En estas especies las plantas madre con infección viral producen descendencia infectada, lo que disminuye los rendimientos de los cultivos. (Moroni y Cordes, 2010). Por esta razón, en muchas ocasiones es necesario aplicar diferentes técnicas de limpieza viral como el cultivo de meristemos, termoterapia, quimioterapia, crioterapia o combinaciones entre estos, para asegurar la eliminación completa de uno o varios virus del material vegetal. Una vez obtenida la plántula libre de virus, es necesario

mantener una línea madre, que será fuente de propagación y multiplicación de material sano.

Cultivo de meristemas

Los meristemas son grupos de células en estado juvenil con capacidad para dividirse constantemente dando origen a una célula hija que sigue siendo meristemática y otra diferenciada (Gilbert, 2005; Azcón-Bieto y Talón, 2008). El cultivo de meristemas es utilizado esencialmente para la producción de plantas libres de patógenos. La carencia de vías de conducción para virus y viroides en estos tejidos permite lograr en algunos casos, la sanidad de las plántulas obtenidas a partir de estos. La técnica del cultivo de meristemas consiste en la disección e incubación del meristemo apical de una planta en condiciones de asepsia (Perea, 2009). En un sentido estricto, el meristemo requerido es el domo meristemático del ápice, pero debido a su pequeño tamaño (0.05 mm – 0.2 mm) es permitido utilizar el domo y uno o dos primordios foliares (Molina y Melgar, 2014) (Figura 11).

Figura 11: Principales estructuras en las zonas de transición derivadas del meristemo apical.



Fuente: Modificado de Bolaños, 2017.

La idea que sugiere la ausencia de virus en la región meristemática y la forma diferencial en la cual estos se distribuyen en la planta está apoyada en el hecho de que estos patógenos sistémicos se mueven a través del sistema vascular de la planta y debido a que este tejido carece de haces vasculares, las partículas virales no siempre logran llegar a esta zona. Incluso si los virus logran moverse de célula a célula la velocidad de avance de los virus sería inferior al desarrollo de las células que conforman el meristemo (Perea, 2009; Conci, 2010). Otra razón por la cual se cree que los meristemas pueden estar libres de virus es la elevada actividad metabólica y las altas concentraciones de auxinas endógenas existentes en los ápices meristemáticos, lo cual inhibe la multiplicación de los virus e impide la invasión de estos tejidos.

El tamaño del meristemo es quizás el factor más crítico de esta técnica, ya que al extraerlo de la planta puede ser fácilmente dañado; entre más pequeño sea el explante aislado más altos son los porcentajes de éxito para obtener material vegetal libre de virus; sin embargo, el cultivo y crecimiento pueden requerir más tiempo para su posterior regeneración (López y Cazorla, 2020). La eliminación de virus mediante el cultivo de meristemas depende del grado de complejidad del patógeno y de la porción de tejido vegetal incluido en el aislamiento del meristemo, por lo que se recomienda utilizar el

cultivo de meristemas en combinación con otros tratamientos como termoterapia, quimioterapia o crioterapia (Perea, 2009).

Termoterapia

Los métodos de eliminación de virus en plantas a través de termoterapia consisten en someter los cultivos *in vitro* infectados a un tratamiento con altas temperaturas durante un tiempo determinado, cuanta mayor exposición reciba el explante a estas condiciones mayor puede ser el efecto de erradicación del virus, siempre y cuando la planta logre sobrevivir sin afectar significativamente su crecimiento (Quak, 1977). Generalmente las temperaturas empleadas para este tratamiento varían de 35° a 45°C durante 4 a 6 semanas; sin embargo, estos rangos pueden variar dependiendo de la especie vegetal y del tipo de virus que se desea eliminar (Zhao et al., 2018).

El tratamiento térmico para eliminar virus ha sido usado exitosamente en diferentes especies de frutales y plantas leñosas, sin embargo algunos reportes indican que someter la plantas a altas temperaturas por periodos prolongados puede causar daños en los tejidos vegetales, por lo que es recomendable alternar las temperaturas entre el día y la noche (Knapp et al, 1997) o incrementar paulatinamente la temperatura hasta alcanzar la temperatura del tratamiento (Zhao et al., 2018), disminuyendo los efectos negativos en las plantas, aumentando la supervivencia del explante y permitiendo la generación de nuevos brotes, sin perder la efectividad en la eliminación del patógeno.

Al parecer, la termoterapia impide el movimiento del virus hacia las células meristemáticas de los brotes, por lo que estas zonas estarán libres del virus (Wang et al., 2008). Además, es posible que las altas temperaturas inhiban la replicación viral o causen la degradación del RNA viral (Chalak et al., 2015). Finalmente, según Villalobos (1982) la síntesis del virus ocurre simultáneamente a su degradación, la eventual erradicación ocurre debido a que la síntesis se detiene ya que el virus compite desventajosamente con el mRNA del hospedante por una cantidad limitada de ribosomas disponibles para la síntesis de sus respectivas proteínas. Las altas temperaturas generan la descomposición de la proteína viral y los daños sufridos en la planta causan la liberación de fenoles que interfieren en la síntesis de los virus. El último postulado para

sustentar porque la termoterapia disminuye la carga viral en las plantas tratadas, es el silenciamiento del RNA viral observado en esta zona meristemática de diferentes plantas (Chellappan et al., 2005; Zhao et al., 2018). Wang y otros (2018) mencionan que la efectividad del tratamiento de termoterapia en la eliminación de virus en plantas aumenta si se utiliza en combinación con otras técnicas como cultivo de meristemas, quimioterapia o crioterapia. Adicionalmente, si la planta tratada está infectada con diferentes tipos de virus, unos serán más estables que otros, por lo que requerirán tratamientos térmicos variables, causando posibles problemas en la erradicación total del virus.

Quimioterapia

La quimioterapia se basa en la utilización de sustancias químicas, para eliminar los virus presentes en los tejidos de las plantas. Muchos procesos tanto del virus como de la planta están relacionados, ya que los virus utilizan el metabolismo del hospedante para la multiplicación y el ensamblaje de componentes preformados, por lo cual la utilización de sustancias químicas específicas puede alterar el mecanismo de síntesis del virus (Perea, 2009). Durante muchos años, se han utilizado compuestos antivirales para eliminar virus de plantas (Hansen y Stace-Smith, 1989; Verma et al., 2005) siendo la ribavirina (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamida), comúnmente conocido como virazole, el más ampliamente empleado con resultados exitosos. La ribavirina es un análogo a la purina con actividad antiviral de amplio espectro tanto en virus de DNA como de RNA, actúa formando complejos de ribavirina-ácido nucleico, en donde el cromóforo 1,2,4-triazol-3-carboxamida se intercala entre las bases, generando un grupo carboxamídico fuera de la hélice (Vijan y Topală, 2016). Cameron y Castro (2001) mencionan que la actividad antiviral se debe a la disminución de las reservas intracelulares de trifosfato de guanosina, inhibiendo las transcripciones virales. Adicionalmente, el mismo autor propone que cuando la ribavirina se convierte en trifosfato, es utilizada por la RNA polimerasa dependiente del RNA viral y causa una mutagénesis letal del genoma viral.

En general muchos estudios realizados sobre el control químico de virus en plantas indican que las aplicaciones exógenas de estos antivirales inhiben la síntesis de RNA

viral, disminuyendo el número de partículas infectivas liberadas en cada etapa de replicación (Simpkins et al., 1981), lo que causa áreas libres de virus en las células recientemente divididas o disminución en los títulos virales presentes en la planta (Singh, 2015).

En ensayos realizados utilizando ribavirina en el medio de cultivo de meristemas *in vitro* se ha conseguido mejorar significativamente la obtención de plantas libres de virus. Sin embargo, bajo el tratamiento con ribavirina es posible que la concentración viral disminuya y los síntomas presentados en la planta empiecen a desaparecer, pero una vez suspendido el tratamiento químico el título viral vuelva a aumentar (Dawson, 1984; Conci, 2004); razón por la cual, el tratamiento químico suele realizarse antecedido por termoterapia o seguido del cultivo de meristemo.

Las cantidades suministradas de ribavirina a la planta son variables, pues dependen del virus y del título viral, por lo que deben probarse valores desde los 10 mg/L a 50 mg/L, o en ocasiones hasta 100 mg/L, no obstante; elevadas concentraciones de ribavirina en el medio de cultivo pueden afectar negativamente al crecimiento de plantas *in vitro* debido a su fitotoxicidad (Hansen y Lane 1985; Cieślińska 2007). Hasta ahora no hay reportes sobre la implementación de esta técnica en especies de *Passiflora* como herramienta de eliminación viral, sin embargo; se ha reportado tasas de eliminación viral de 74,4% y 75% en ASPV, respectivamente utilizando 15 y 25 ug/ml de ribavirina directamente en el medio de cultivo durante 60 días en manzana; además se evaluó la eliminación viral en la misma especie al combinar tratamientos de termoterapia y quimioterapia presentando mayor eliminación viral (95%) pero menores tasas de supervivencia (Hu et al., 2015).

Crioterapia

A las técnicas de limpieza viral clásicas, se suma una más reciente llamada crioterapia, mediante la cual ciertos patógenos vegetales, como los virus, los fitoplasmas y las bacterias, pueden ser erradicados de los meristemos apicales exponiéndolos brevemente al nitrógeno líquido (

y Valkonen, 2009). Hasta la fecha, patógenos del banano (*Musa* spp.), naranja dulce (*Citrus* spp.), vid (*Vitis vinifera*), *Prunus* spp., frambuesa (*Rubus idaeus*), papa (*Solanum*

tuberosum) y batata (*Ipomoea batatas*) se han erradicado con crioterapia. Algunos de estos patógenos incluyen el Banana streak virus (BSV), Cucumber mosaic virus (CMV), Grapevine virus A (GVA), Plum pox virus (PPV), Potato leafroll virus (PLRV), Potato virus Y (PVY), Raspberry bushy dwarf virus (RBDV), Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) y Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) (Sastry y Zitter, 2014).

De acuerdo a Wang y Valkonen (2009) para llevar a cabo el protocolo de crioterapia se deben tener en cuenta los siguientes pasos, primero la introducción del material vegetal infectado en cultivo *in vitro*, sobre el cual se realizará la escisión del meristemo, posteriormente la encapsulación y la inducción de tolerancia del explante a la deshidratación, luego el explante es expuesto a nitrógeno líquido, seguido por un corto periodo de calentamiento del explante en baño María; después el material vegetal encapsulado se siembra en un medio de cultivo para su regeneración. Por último, las plantas se establecen en condiciones de invernadero para su posterior análisis viral.

Los virus se distribuyen de manera desigual dentro de las plantas (White, 1934), por lo tanto, la carga viral disminuye a medida que aumenta la distancia entre el domo apical y los primordios foliares, lo que resulta en un título viral muy bajo o incluso un área libre de virus. Cuando los meristemos apicales se tratan con nitrógeno líquido, solo las células que se ubican en las capas superiores del domo apical pueden sobrevivir, es decir, las células menos diferenciadas, más jóvenes, con poco citoplasma y, a su vez, menor contenido de agua; mientras que las células que se ubican en las partes bajas mueren (Helliot et al., 2002; Wang y Valkonen, 2008; Wang et al., 2008). Por lo tanto, las plantas regeneradas a partir de meristemos apicales tratados con crioterapia pueden estar libres de infecciones virales (Wang et al., 2018).

En comparación con el cultivo tradicional de meristemos para la eliminación del virus, la crioterapia tiene una alta eficiencia en la erradicación de patógenos; el tamaño del explante puede ser mayor al utilizado en el cultivo de meristemos sin disminuir la eficiencia de eliminación del virus, además evita las dificultades que implican la escisión de pequeños meristemos. El periodo de tiempo para la producción de plantas libres de virus es muy similar o incluso más corto que el requerido en el cultivo de meristemos. La principal diferencia entre estos dos métodos radica en el número de plantas capaces de

regenerarse, siendo menor en la utilización de crioterapia; sin embargo, los valores son aceptables, más aún al obtener altos porcentajes de erradicación del patógeno en aquellos explantes que sobreviven. La crioterapia ha sido exitosa en frutales y hortalizas, con resultados de eliminación viral del 30% y 90 % para virus como CMV y BSV, respectivamente, presentes en plantas de banano (Wang y Valkonen, 2008). Sin embargo, no existen reportes hasta ahora del uso de esta técnica en especies de pasifloras.

Experiencias efectivas de limpieza viral

El cultivo de meristemas apicales se aplica principalmente para producir plantas libres de patógenos. Morel y Martín, en 1952 utilizaron por primera vez esta técnica para obtener plantas libres de virus en dalias infectadas. Un trabajo reciente sobre la distribución de diferentes especies de virus: Carnation mottle virus (CarMV), Carnation vein mottle virus (CVMV), Carnation latent virus (CLV) y Carnation etched ringspot virus (CERV), que infectan clavel demuestra que el meristema apical, los meristemas laterales y los primordios foliares están libres de virus después de su cultivo (Gosalvez et al., 2006). En 2009, Kumar y colaboradores, comprobaron que al cultivar meristemas de crisantemo fue posible eliminar el CMV y Tomato aspermy virus (TAV) en un 65,6%. La tendencia de la distribución desigual de los virus a lo largo de los órganos de las plantas fue verificada por Gioria et al. (2002), trabajando con CMV en *P. edulis* f. *flavicarpa* constataron que existe limitaciones en la diseminación del virus en las partes jóvenes de la planta. Los autores confirmaron la presencia del virus en hojas basales sintomáticas y la ausencia en hojas apicales asintomáticas, por esta razón el cultivo de meristemas apicales caulinares se convierte en una técnica prometedora para la eliminación de este virus en maracuyá (Drew, 1991).

En Brasil, Andrade et al. (2010) aplicaron tratamientos de termoterapia *ex vitro* con temperaturas entre 35° a 45°C durante 40 días en plantas de maracuyá de 5 genotipos diferentes con presencia del CABMV, logrando limpieza viral en los nuevos tejidos formados para 2 genotipos y una disminución significativa del virus en los genotipos restantes, lo que conlleva a pensar que es una técnica promisoriosa para el tratamiento térmico *ex vitro* para este virus. La termoterapia seguida por el cultivo de meristemas fue,

según reportes de Wang, y otros (2018), el método más utilizado para la erradicación de virus de plantas en cultivos herbáceos y en especies leñosas. Una especie de lirio infectada con CMV fue tratada a una temperatura de 35°C durante 5 semanas, obteniendo resultados de erradicación del virus del 100% (Gallard et al., 2011).

Para el tratamiento de quimioterapia, Verma et al. (2005) emplearon ribavirina en begonias para la producción de plantas libres de PNRSV con una efectividad del 20% y en crisantemo el uso de 2-tiouracil arrojó un porcentaje del 26,7% para CVB (*Chrysanthemum B carlavirus*) (Ram et al., 2005). Empleando esta misma técnica Lim et al. (1993), eliminaron con éxito el virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano (ACLSV). Por otro lado, O'Herlihy et al. (2003) determinaron la eficiencia de la ribavirina en la eliminación de ACLSV y el virus de los anillos necróticos del duraznero (PNRSV) en árboles frutales.

Wang y colaboradores (2008) afirman que, al combinar la termoterapia con crioterapia, fue posible erradicar el virus RBDV que afecta la frambuesa, usando temperaturas alternantes entre 38° C / 26° C (día/noche) con fotoperiodo de 16 h, durante 35 días, y posteriormente se tomó el meristemo con dos primordios foliares para su tratamiento en crioterapia. Los porcentajes de supervivencia variaron entre 20 y 40% para los dos tratamientos y el 35% de las plantas estuvieron libres del virus. El uso de termoterapia seguida del cultivo de meristemas ha permitido obtener material libre de virus en clavel, crisantemo, fresa y ajo con una eliminación del 90%, favoreciendo el proceso de saneamiento de enfermedades sistémicas (Litardo et al., 2015). Otros reportes han confirmado la eficiencia de esta combinación en papa (*Solanum tuberosum*), manzano (*Malus domestica*), uvas (*Vitis vinifera*), árboles frutales (*Rosaceae*), ciruelo (*Prunus salicina*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Villalobos, 1979; Pierik, 1990, Knapp et al., 1997).

En pasifloras, el cultivo de meristemas es la técnica más implementada con fines de sanidad vegetal. En Brasil, Gioria et al. (2002) reportaron el cultivo de meristemas como método promisorio para eliminar el CMV en maracuyá. Por otra parte, Andrade et al. (2010) reportaron en Brasil el uso de termoterapia *ex vitro* empleando temperaturas entre 35° a 45°C por 40 días para erradicar el CABMV, logrando limpieza viral total y/o parcial según los genotipos vegetales. Hasta ahora, no se encuentran reportes de tratamientos

con quimioterapia, crioterapia, ni combinaciones entre ellas para gúlpula como herramienta empleada para limpieza viral.

Bibliografía

Abd El-Aziz, M. H. (2019). Three modern serological methods to detect plant viruses. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 3, 101-106.

Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M. y Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537-545.

Adams, I. y Fox, A. (2016). Diagnosis of plant viruses using next-generation sequencing and metagenomic analysis. In *Current research topics in plant virology* (pp. 323-335). Springer, Cham.

Agronet. (2019). Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano. Recuperado el 22 de agosto de 2021 de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>

Aguirre, G., Baudoin, J. y Leigue, L. (Ed). (2010). Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos filogenéticos. Cochabamba, Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias.

Alcántara, J. S., Acero, J., Alcántara, J. D. y Sánchez, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.

AnalDEX. (2020). Asociación Nacional de Comercio Exterior. Recuperado el 10 de agosto de 2021 de <https://www.analdex.org/2021/02/25/exportacion-de-gulupa-en-2020/>

Andrade, S., Fonseca, L., Silvia, M., Faleiro, F. y Junqueira N. (2010). Estudos preliminares para o uso de termoterapia ex vitro em maracujazeiro-azedo visando a eliminacao de virus-do-endurecimento-dos-frutos- Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Embrapa Cerrados), 267, 1-18.

Angel, C., Nates, G., Ospina, R., Melo, C. D. y Amaya, M. (2011). Biología floral y reproductiva de la gulupa. *Caldasia*, 33(2), 433-451.

Angulo, R. (2009). Gulupa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.). Bayer Crop Science.

Arevalo, E., Díaz, A. L., Galindo, J. R. y Rivero M.R. (2011). Manejo de problemas fitosanitarios del cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.): manejo para la temporada invernal. Instituto Colombiano Agropecuario. Produmedios.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. y Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert review of molecular diagnostics, 5(2), 209-219.

Asande, L. K., Omwoyo, R. O., Oduor, R. O. y Nyaboga, E. N. (2020). A simple and fast *Agrobacterium*-mediated transformation system for passion fruit KPF4 (*Passiflora edulis* f. *edulis* × *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Plant methods*, 16 (141). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00684-4>

Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A. y Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi– A mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493-504.

Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª Edición. Madrid: McGRAW-HILL.

Babraham bioinformatics. Recuperado el 14 de septiembre de 2021 de <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>

Badali, H. y Nabili, M. (2012). Molecular tools in medical mycology. *Journal of Microbiology*, 6(1), 1-3.

Bandte, M., Rodríguez, M. H., Schuch, I., Schmidt, U. y Buettner, C. (2016). Plant viruses in irrigation water: reduced dispersal of viruses using sensor-based disinfection. *Irrigation Science*, 34(3), 221-229.

Baker, C. A. y Jones, L. (2007). A new potyvirus found in *Passiflora incense* in Florida. *Plant Disease*, 91(2), 227.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, M., Nikolenko, I., Pham, S., Prjibelski, D., Pyshkin, V., Sirotkin, V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, A. y Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.

Bernal, R., Gradstein, S.R. y Celis, M. (2015). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de ciencias naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Recuperado el 20 de marzo de 2020 de <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/>

Benschler, D., Pappu, S., Niblett, C., Varón de Agudelo, F., Morales, F., Hodson, E., Alvarez, E., Acosta, O. y Lee, R.F. (1996). A strain of *Soybean mosaic virus* infecting *Passiflora* spp. in Colombia. *Plant Disease*, 80, 258-262.

Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Boutell, J. M. y et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>

Bharagava, R. N., Purchase, D., Saxena, G. y Mulla, S. I. (2019). Chapter 26 - Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants: From Genomics

to Environmental Cleanup. Microbial Diversity in the Genomic Era, (pp. 459-477). Oxford, Elsevier.

Bio-Rad Laboratories Inc. (2020) Recuperado el 20 de Febrero de 2020 de <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>

Bolaños, M. (2017). Micropropagación *in vitro* de meristemas para control del virus del amarillamiento foliar (SCYLV) en variedades de caña de azúcar. Tesis de licenciatura en ciencias agrícolas. Universidad Rafael Landívar. Guatemala de la Asunción.

Bolger, A. M., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics. Recuperado el 14 de septiembre de 2021 de <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>

Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., Van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. y Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. Virus Research, 186, 20-31.

Boratyn, G. M., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Busby, B. y Madden, T. L. (2019). Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads. BMC bioinformatics, 20(1), 1-19.

Bottini, R., Cassán, F. y Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. Applied Microbiology and Biotechnology, 65(5), 497-503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>

Brandes, J. y Wetter, C. (1963). Untersuchungen über Eigenschaften und Verwandtschaftsbeziehungen des Latenten Passiflora-Virus (*Passiflora latent virus*). Journal of Phytopathology, 49(1), 61-70.

Bronzato Badial, A., Sherman, D., Stone, A., Gopakumar, A., Wilson, V., Schneider, W. y King, J. (2018). Nanopore sequencing as a surveillance tool for plant pathogens in plant and insect tissues. *Plant Disease*, 102(8), 1648-1652.

Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J. y Gibbs, A. J. (Ed). (1990). *Viruses of tropical plants*. Oxon, CAB International Press.

Burrows-Wheeler Aligner. Recuperado el 28 de febrero de 2020 de <http://bio-bwa.sourceforge.net/>.

Bushmanova, E., Antipov, D., Lapidus, A. y Prjibelski, A. D. (2019). rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data, *GigaScience*, 8(9), giz100. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz100>

Caleño, B.L. y Morales, G. (2019). Propagación asexual de especies endémicas y amenazadas del género *Passiflora* en los Andes colombianos. *Colombia Forestal*, 22 (2), 67-82.

Cámara de comercio de Bogotá. (2015). Manual Gulupa. <http://hdl.handle.net/11520/14314>

Camelo, V. (2010). Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región de Sumapaz (Cundinamarca). Trabajo de grado de maestría en Fitopatología. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/6860>

Cameron, C. E. y Castro, C. (2001). The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Current opinion in infectious diseases*, 14(6), 757-764.

Castilla, J. (2019). Agronegocios. Recuperado el 5 de Julio de 2019 de <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-exportacion-de-gulupa-supero-las-8109-toneladas-2881324>

Cox, J.E. (1957). Flowering and pollination of passion fruit. The agricultural gazette of New South Wales. 68, 573-576

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA. Recuperado el 21 de enero de 2020 de <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>

Chabannes, M., Gabriel, M., Aksa, A., Galzi, S., Dufayard, J., Iskra-Caruana, M., Muller, E. (2020). Badnaviruses and banana genomes: a long association sheds light on *Musa* phylogeny and origin. Molecular Plant Pathology, 22, 216-230.

Chagas, C. M., Colariccio, A. y Kitajima, E. W. (1983) Estudos de transmissibilidade do enfezamento do maracujazeiro. Fitopatologia Brasileira, 8, 620.

Chalak, L., Elbeaino, T., Elbitar, A., Fattal, T. y Choueiri, E. (2015). Removal of viruses from Lebanese fig varieties using tissue culture and thermotherapy. Phytopathologia Mediterranea, 531-535.

Chang, C. A. (1992). Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. Phytopathology, 82(11), 1358-1363.

Chellappan, P., Vanitharani, R., Ogbe, F. y Fauquet, C. M. (2005). Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. Plant Physiology, 138(4), 1828-1841.

Chen, S., Yu, N., Yang, S., Zhong, B. y Lan, H. (2018). Identification of *Telosma mosaic virus* infection in *Passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents. Virology Journal, 15, 168 <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1084-6>

Chong, Y. H., Cheng, Y. H., Cheng, H. W., Huang, Y. C. y Yeh, S. D. (2018). The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as *East asian passiflora virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 84, 208–220.

Cieślińska, M. (2007). Application of thermo- and chemotherapy in vitro for eliminating someviruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 15, 117-124.

Clark, M.F. y Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34(3), 475-483.

Clark, D.P, Pazdernik, N. y McGehee, M. (2019) Chapter 8 - DNA Sequencing. *Molecular Biology (Third Edition)*, (pp. 240-269). Academic Cell.

Cobo, F. (2012). Application of molecular diagnostic techniques for viral testing. *The Open Virology Journal*, 6, 104-114.

Conci, V. (2004). Obtención de plantas libres de virus. Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (Ed.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* 8(5):303-312. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.

Conci, V. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina, INTA.

Córdoba, S., Guzmán, J. R., Pérez, B. A., Zúñiga, P. A. y Pacheco, R. (2010). Propagación de especies nativas de la región andina, Bogotá, Jardín botánico de Bogotá José Celestino Mutis.

Covadonga, G. T. (2019). Detección y caracterización de virus epidemiológicamente relevantes en cultivos de tomate y cucurbitáceas. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

Crestani, O. A., Kitajima, E. W., Lin, M. T. y Marinho, V. L. A. (1986). *Passion fruit yellow mosaic virus*, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathology*, 76(9), 951-955.

Dasmahapatra, K. K. y Mallet, J. (2006). DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity*, 97(4), 254-255.

Dawson, W. (1984). Effects of animal antiviral chemicals on plant viruses. *Phytopathology* 74(2), 211-213.

Dhawan, K., Dhawan, S. y Sharma, K. (2004). Passiflora: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23.

Deshmukh, N. A., Patel, R. K., Okram, S., Rymbai, H., Roy, S. S. y Jha, A. K. (2017). Passion fruit (*Passiflora* spp.). Ghosh, S. N., Singh, A. y Thakur, A. (Ed). Underutilized fruit crops: importance and cultivation. (pp. 979-1005). New Delhi, Jaya Publishing House.

Dreher, T. W. (2009). Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Research*, 139(2), 217-229.

Dragich, M., Melzer, M. y Nelson, S. (2014). *Cucumber mosaic virus* in Hawaii. Plant Disease PD-101. <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-101.pdf>

Drew, R. (1991). *In vitro* culture of adult and juvenile bud explant of *Passiflora* species. *Plant cell, tissue and organ culture*, 26, 23-27.

Drew, R. A. (1997). Micropropagation of *Passiflora* species (passionfruit). In *High-tech and micropropagation* (pp. 135-149). Berlin, Springer.

Edwardson, J.R. y Christie, G. (1986). Viruses infecting forage legumes. Vol. 1 Monograph (14). Agricultural Experiment Stations. Institute of Food and Agricultural Sciences. Gainesville, Florida. 246 p.

El-Araby, W. S., Ibrahim, I. A., Hemeida, A. A., Mahmoud, A., Soliman, A. M., El-Attar, A. K. y Mazyad, H. M. (2009). Biological, serological and molecular diagnosis of three major potato viruses in Egypt. *International Journal of Virology*, 5(2), 77-88.

Ferreira, S. S., Barros, D. R., De Almeida, M. R. y Zerbini, F. M. (2010). Characterization of passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant Pathology*, 59(2), 221-230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02205.x>

Fontenele, R., Abreu, R., Lamas, N., Alves-Freitas, D., Vidal, A., Poppiel, R., Melo, F., Lacorte, C., Martin, D., Campos, M., Varsani, A. y Ribeiro, S. (2018). Passion fruit chlorotic mottle virus: molecular characterization of a new divergent geminivirus in Brazil. *Viruses* 10(4), 169. <https://doi.org/10.3390/v10040169>

Fischer, I. y Rezende, J. (2008). Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technology*, 2(1), 1–19

Fribourg, C. E., Koenig, R. y Lesemann, D. E. (1987). A new Tobamovirus from *Passiflora edulis* in Peru. *Phytopathology*, 77, 486-491.

Galindo, J. R. y Gómez, S. (2010). Gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) producción y manejo poscosecha. Colombia. Corredor Tecnológico Agroindustrial. Cámara de Comercio de Bogotá.

Gallard, A., Mallet, R., Chevalier, M. y Grapin, A. (2011). Limited elimination of two viruses by cryotherapy of pelargonium apices related to virus distribution. *CryoLetters*, 32(2), 111-122.

Gallo, Y. (2020). Caracterización molecular del viroma de plantas solanáceas de importancia económica en Antioquia. Tesis doctoral en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Garay-Arroyo, A., Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R. Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.

Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F. J., Boonham, N., Colyer, A., Cantoral, J. M. y Budge, G. (2009). Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology*, 58(1), 43-51.

Garrido, C., Acero, F. G. F., Carbú, M., Rodríguez, V. E. G., Liniero, E. y Cantoral, J. M. (2012). Molecular microbiology applied to the study of phytopathogenic fungi. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. Rijeka, 139-156.

Gawad, C., Koh, W. y Quake, S. R. (2016). Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature Reviews Genetics*, 17(3), 175.

George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. J. D. (2008). Plant Growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D. (Ed). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht, Springer.

Gilbert, S. (2005). *Biología del Desarrollo*. (Séptima edición). Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Gioria, R., Espinha, L., Rezende, J., Gaspar, J. y Kitajima, E. (2002). Limited movement of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in yellow passion flower in Brazil. *Plant Pathology*, 51, 127-133.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. y Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4), 386-401.

Gomes, A. y Korf, B., (2018) Genetic testing techniques. Robin, N. y Farmer, M. (Ed). *Pediatric Cancer Genetics*. (pp. 350). Alabama, Elsevier.

González, R. (2017). Evolution of diagnostic technics for plant viruses. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 591-610.

Gordillo, L. A. (2001). Incidencia del *Soybean mosaic virus* en cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia. Tesis M.Sc. en microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Gosalvez, B., García, S., Pallas, V. y Sanchez, M. A. (2006). Distribution of carnation viruses in the shoot tip: exclusion from the shoot apical meristem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1-3), 43-51.

Gould, A. R. y Symons, R. H. (1983). A molecular biological approach to relationships among viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 21(1), 179-200.

Goulter, K. C. y Randles, J. W. (1997). Serological and molecular techniques to detect and identify plant pathogens, (pp. 172-188).

Guerrero, E., Potosí, C., Melgarejo, L.M. y Hoyos, L. (2011). Manejo agronómico de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en el marco de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Melgarejo, L.M. (Ed). *Ecofisiología del cultivo de la gulupa (Passiflora edulis Sims)* (pp. 123). Bogotá, Produmedios.

Gutiérrez, P., Rivillas, A., Tejada, D., Giraldo, S., Restrepo, A., Ospina, Cadavid, S., Gallo, Y. y Marín, M. (2021). PVDP: A portable open source pipeline for detection of plant viruses in RNAseq data. A case study on potato viruses in Antioquia (Colombia). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113, 101604.

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Palma, F., Birren, B., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. y Regev, A., (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>

Gutiérrez, M. I., Miranda, D. y Cárdenas-Hernández, J. F. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.),

granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 5(2), 209-219.

Ha, J. H., Hong, J. S., Kim, T. S. y Ryu, K. H. (2008). Complete genome sequence of an isolate of Pepper veinal mottle virus and phylogenetic relationship with other potyviruses. Archives of virology, 153(12), 2315-2318.

Hajimorad, M. R., Domier, L. L., Tolin, S. A., Whitham, S. A. y Saghai Maroof, M. A. (2018). Soybean mosaic virus: a successful potyvirus with a wide distribution but restricted natural host range. Molecular Plant Pathology, 19(7), 1563–1579.

Halbert, S. E., Irwin, M. E. y Goodman, R. M. (1981). Alate aphid (Homoptera: Aphididae) species and their relative importance as field vectors of soybean mosaic virus. Annals of Applied Biology, 97(1), 1-9.

Hansen, A. J. y Lane, W. D. (1985). Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. Plant Disease, 69(2), 134-135.

Hansen, A. J. y Stace-Smith, R. (1989). Antiviral chemicals for plant disease control. Critical Reviews in Plant Sciences, 8(1), 45–88.

Hicks, R. G. T., Mohamed, M. E. y Blakesley, D. (1996). Passiflora latent carlavirus in European collections of ornamental *Passiflora*. Journal of Phytopathology, 144, 203–205.

Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P. y Frison, E. (2002). Cryopreservation for the elimination of Cucumber mosaic and Banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). Plant Cell Report, 20, 1117-1122.

Ho, T. y Tzanetakis, I. E. (2014). Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing. Virology, 471, 54-60.

Hodson, E. (2005). Transformación genética de plantas para resistencia a virus. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 29(110), 5-24.

Hong, C., Moorman, G.W., Wohanka, W. y Büttner, C. (Ed). (2014). Biology, detection, and management of plant pathogens in irrigation water. The American Phytopathological Society.

Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F. y Zhou, J. (2015). Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121, 435–443.

Huang, A., Gu, P., Ding, M. y Wang, Y. (2021). First report of Euphorbia leaf curl virus and papaya leaf curl Guangdong virus on passion fruit in mainland China. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00932-z>

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. (2020). Recuperado el 20 de abril de 2020 de <https://talk.ictvonline.org/>

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. (2021). Recuperado el 12 de noviembre de 2021 de <https://talk.ictvonline.org/>

Iwai, H., Ohmori, T., Kurokawa, Y., Muta, T. y Arai, K. (1996) New report of *Passionfruit woodiness virus* in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 62, 459-465.

Jaramillo, H. (2017). Análisis del transcriptoma y viroma de *Passiflora edulis* f. *edulis* en cultivos de Antioquia utilizando métodos de secuenciación de nueva generación. Tesis de Maestría en Ciencias-Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Jaramillo, H., Marín, M. y Gutiérrez, P. A. (2018). Molecular characterization of *Soybean mosaic virus* (SMV) infecting Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia, Colombia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(11-12), 617-636.

Jaramillo, H., Marín, M. y Gutiérrez, P. A. (2019). Complete genome sequence of a *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(1), 8643-8654.

Jiménez, Y. (2006). El cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) (Trabajo final especialización en Horticultura). Universidad Nacional de Colombia.

Jiménez, Y.; Carranza, C. y Rodríguez, M. (2009). Manejo integrado del cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra-Posada, F., Piedrahíta, W. y Flórez, L.E. (Ed). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. (pp. 159-187). Bogotá, Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Jo, H. y Koh, G. (2015). Faster single-end alignment generation utilizing multi-thread for BWA. *Biomedical materials and engineering*, 26(1), 1791-1796.

Jover-Gil, S., Beeri, A., Fresnillo, P., Samach, A. y Candela, H. (2018). Complete genome sequence of a novel virus, classifiable within the *Potyviridae* family, which infects passion fruit (*Passiflora edulis*). *Archives Virology*, 163, 3191–3194.

Khan, J. y Dijkstra, J. (2006). *Handbook of plant virology*. Food Product Press Oxford, 452.

Knapp, E., Hanzer, V., Mendonca, D., da Câmara Machado, A., Katinger, H. y da Câmara Machado, M. L. (1997). Improved virus detection in rosaceous fruit trees *in vitro*. *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation* (pp. 23-29). Dordrecht, Springer.

King, A., Adams, M., Cartens, E. y Lefkowitz, E. (2012). Viral taxonomy. *Virology journal* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-254>

Kitajima, E., Chagas, C. y Crestani, O. (1986) Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 11, 409-432.

Kitajima, E. W., Rezende, J. A. M., Rodrigues, J. C. V., Chiavegato, L. G., Piza Júnior, C. T. y Morozini, W. (1997). Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. *Fitopatologia Brasileira*, 22(4), 555-559.

Kitajima, E., Rezende, J. y Rodrigues, J. (2003). Passion fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on passion fruit in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 30, 225-31.
<https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000006551.74604.84>

Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I. y Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1-7.

Kreuze, J. (2014). siRNA deep sequencing and assembly: piecing together viral infections. In *Detection and diagnostics of plant pathogens* (pp. 21-38). Springer, Dordrecht.

Kumar, S., Khan, M., Raj, S. K. y Sharma, A. (2009). Elimination of mixed infection of Cucumber mosaic and Tomato aspermy virus from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture. *Scientia Horticulturae*, 119, 108-112.

Lan, H., Lai, B., Zhao, P., Dong, X., Wei, W., Ye, Y. y Wu, Z. (2020). Cucumber mosaic virus infection modulated the phytochemical contents of *Passiflora edulis*. *Microbial Pathogenesis*, 138, 103828.

LANGEBIO (Laboratorio de servicios genómicos). (2016). Recuperado el 18 de Marzo de 2020 de <http://labsergen.langebio.cinvestav.mx/genomics/?services=sbssequencing>

Li, Y., Zhou, X. y Ye, D. (2008). Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(4), 457-461.

Liberato, J.R. y Zerbini, F.M. (2003). Proposed list of common names of diseases of passionfruit (*Passiflora* spp.). *Phytopathology News*, 37(8), 117.

Liberato, J. R. y Zerbini, F. M. (2016). Diseases of passionfruit (*Passiflora* spp.). The American Phytopathological Society. <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Passionfruit.aspx>

Lim, S., Wong, S. y Goh, C. (1993). Elimination of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. *Annals of Applied Biology*, 122(2),289-297.

Lima, J. A. A., Nascimento, A. K. Q., Radaelli, P. y Purcifull, D. E. (2012). Serology applied to plant virology. Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. *Rijeka*, 71-94.

Litardo, A. C., Korneva, S. B., Fischer, F. C., Tola, N. A., Leal, M. R. y Flores, A. P. (2015). Obtención de semilla biotecnológica de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de alta calidad genética y fitosanitaria en el Ecuador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 101-110.

Liu, W., Huang, S., Liu, N., Dong, D., Yang, Z., Tang, Y., Ma, W., He, X., Ao, D., Xu, Y. y Zou, D. (2017). Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in Loop-mediated isothermal amplification assay. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

Lobo, M. y Medina, C. I. (2009). Recursos genéticos de pasifloráceas en Colombia. Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitski, S., Casierra-Posada, F., Piedrahíta, W. y Flórez, L. E. (Ed). *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa* (pp. 7-15). Bogotá, Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

López, C. y Cazorla, J. (2020). Saneamiento del material vegetal: cultivo de meristemas. Recuperado el 21 de enero de 2020 de <http://www.encuentros.uma.es/encuentros41/meristemas>

Lüdders, P. (2003). Granadilla (*Passiflora edulis* Sims.) a multiple useful tropical fruit. *Erwerbs Obstbau*, 45(6), 186-191.

Macaulay, I. C., Teng, M. J., Haerty, W., Kumar, P., Ponting, C. P. y Voet, T. (2016). Separation and parallel sequencing of the genomes and transcriptomes of single cells using G&T-seq. *Nature protocols*, 11(11), 2081.

Makałowski, W. y Shabardina, V. (2020). Bioinformatics of nanopore sequencing. *Journal of Human Genetics*, 65, 61–67.

Manicom, B., Ruggiero, C., Ploetz, R. y Goes, A. (2003). Diseases of passion fruit. Ploetz, R. C. (Ed). *Diseases of tropical fruit crops* (pp. 413-441). Wallingford, CAB international.

Marcel, S., Sawers, R., Oakeley, E., Angliker, H. y Paszkowski, U. (2010). Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, 22(9), 3177-3187.

Marín, M., y Gutiérrez, P. (2016). *Principios de virología molecular de plantas tropicales*. Corpoica, Mosquera, Colombia.

Martini, C. K. H. (1962). Some properties of the virus causing 'woodiness' of passion fruit in Western Nigeria. *Annals of Applied Biology*, 50(1), 163-168.

Matthews, R. E. F. y Hull, R. (2002). *Matthews' plant virology*. San Diego: Gulf Professional Publishing.

Michael, T. P. y VanBuren, R. (2020). Building near-complete plant genomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 54, 26-33.

Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W. y Flórez, L. E. (2009). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en

Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Mirmajlessi, S. M., Loit, E., Maend, M. y Mansouripour, S. M. (2015). Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis-a review. *Plant Protection Science*, 51(4), 177-190.

Molina, L. y Melgar, M. (2014). Biotecnología aplicada al cultivo de la caña de Azúcar. Melgar, M., Meneses, A., Orozco, H., Perez, O. y Espinosa, R. (Ed). *El cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala* (pp. 512.). Guatemala, Librerías Artemis Edinter.

Morales, F. J., Muñoz, C., Castaño, M. y Velasco, C.A. (2000). Geminiviruses transmitted by whitefly in Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 24, 95-98.

Morales, F., Lozano, I., Munoz, C., Castano, M., Arroyave, J., Varon, F., Chavez, B. y Castillo, G. (2001). Caracterización molecular de los virus que afectan al maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) y otras pasifloras en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 25(2), 99-102.

Morales, F. J., Lozano, I., Castaño, M., Arroyave, J. A., Velasco A.C. y Varon F. (2002). Partial characterization of a tymovirus infecting passion fruit in Colombia, South America. *Journal of Phytopathology* 150(4-5), 292-296.

Morales, F., Belo, W., Morales, G. y Kitajima, E. (2006). Occurrence of passion fruit green spot virus in the passion fruit crop in the State of Maranhão, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 31,100.

Morel, G. y Martin, C. (1952). Cure of dahlias attacked by a virus disease. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 235(21), 1324-1325.

Moroni, A. y Cordes, G. (2010). Producción de material libre de virus. Universidad Nacional de Córdoba-Argentina. Recuperado el 23 de enero de 2020 de <http://agro.unc.edu.ar/~fito/teoricos/viruslibrevirus.pdf>

Morton, J. (1987). Passionfruit. Morton, J. (Ed). Fruits of warm climates. (pp. 320–328). Miami, Echo Point Books & Media.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61,64-5.

Naidu, R. A. y Hughes, J. D. A. (2001). Methods for the detection of plant virus diseases. In *Plant Virology in Sub-Saharan Africa: Proceedings of a Conference Organized by IITA: 4-8 June 2001*, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria (p. 233). IITA

Nascimento, A., Santana, E., Braz, A., Alfenas, P., Pio-Ribeiro, G., Andrade, G., de Carvalho, M. y Zerbini, F. (2006). *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Archives of Virology*, 151(9), 1797-1809.

Nakasato, K., Fujioka, S., Sugawara, Y., Ono, T., Nishio, T. y Tsuda, S. (2020). First detection of two potyviruses, *Uraria mosaic virus* and *Passiflora mosaic virus Y*, from passionfruit in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 86, 401-404.

NCBI Magic-BLAST. Recuperado el 27 de enero de 2020 de <https://ncbi.github.io/magicblast/>

Novaes, Q. S., Freitas-Astua, J., Yuki, V.A., Kitajima, E.W., Camargo, L.E.A. y Rezende, J.A.M. (2003). Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. *Plant Pathology*. 52(5), 648-654.

Novaes, Q. S. y Rezende, J. (2003). Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. *Scientia Agricola*, 60(4), 699-708.

Nyanzi, S. A., Carstensen, B. y Schwack, W. (2005). A comparative study of fatty acid profiles of *Passiflora* seed oils from Uganda. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(1), 41-44.

Ocampo, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Restrepo, M., Salazar, M., Jarvis, A., y Caetano, C. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, 8(1), 1-45.

Ocampo, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., y Jarvis, A. (2010). Distribution of the genus *Passiflora* L. diversity in Colombia and its potential as an indicator for diversity management in the coffee growing zone. *Diversity*, 2, 1158-1180. <https://doi.org/10.3390/d2111158>

Ocampo, J. y Wyckhuys, K. (2012). Tecnología para el cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) en Colombia. Centro de Bio-sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, República de Colombia. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13557>

Ocampo, J. y Posada, P. (2012). Ecología del cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims). Ocampo, J. y Wyckhuys, K. (Ed). Tecnología para el cultivo de la gulupa en Colombia (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims). (pp. 29-32). Bogotá, Centro de Bio-sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Ochwo-Ssemakula, M., Sengooba, T., Hakiza, J. J., Adipala, E., Edema, R., Redinbaugh, M. G., Aritua, V. y Winter, S. (2012). Characterization and distribution of a Potyvirus associated with passion fruit woodiness disease in Uganda. *Plant Disease*, 96(5), 659-665.

Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2010). Micropropagación. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mrogniski, E. (Ed). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (pp. 353-362)

O'Herlihy, E., Croke, J. y Cassells, A. (2003). Influence of in vitro factors on titre and elimination of model fruit tree viruses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), 33-42.

Ortiz, E. y Hoyos, L. (2012). Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 6(1), 110–116. <https://doi.org/10.17584/rcch.2012v6i1.1277>

Oxford Nanopore technologies. Recuperado el 26 de enero de 2020 de <https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing>

Ozarowski, M. y Thiem, B. (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a Mini-review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(6), 937-947.

Pares, R., Gunn, L., Keskula, E., Martin, A. y Teakle, D. (1997). Occurrence of *Passiflora* latent carlavirus in cultivated and wild *Passiflora* species in Australia. *Plant Disease*, 81, 248–350.

Parrella, G y Sorrentino, D. (2009). Identification of a Cucumber mosaic virus isolate from *Passiflora edulis* in Southern Italy and validation of subgroup identification by in silico restriction fragment length polymorphism. *Journal of Phytopathology*, 157(11-12), 762 - 767

Perea, M. (2009). Cultivo de tejidos vegetales in vitro. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Proeditor.

Pierik, L. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa.

Prabha, K., Baranwal, V. K. y Jain, R. K. (2013). Applications of next generation high throughput sequencing technologies in characterization, discovery and molecular interaction of plant viruses. *Indian Journal of Virology*, 24(2), 157-165.

Prieto, C; Barrios, D. y Pastor, S. (2021). Servicio de bioinformática. Secuenciación De Novo. Recuperado el 22 de Noviembre de https://bioinfo.usal.es/secuenciacion_de_novo

Quak, F. (1977). Meristem culture and virus free plants. Applied and fundamental aspects of plant cell and organ culture (pp. 598-615, 1977). New York, Springer.

Ram, R., Verma, N., Singh, A. K., Singh, L., Hallan, V. y Zaidi, A. A. (2005). Indexing and production of virus-free chrysanthemums. *Biologia Plantarum*, 49(1), 149-152.

Ramos-González, P. L., Dos Santos, G. F., Chabi-Jesus, C., Harakava, R., Kitajima, E. W. y Freitas-Astúa, J. (2020). *Passion fruit green spot virus* genome harbors a new orphan ORF and Highlights the flexibility of the 5'-end of the RNA2 segment across Cileviruses. *Frontiers in Microbiology*. 11, 206.

Rigden, P. y Newett, S. (2005). Passionfruit problem solver field guide. Queensland, Natural library of Australia. (pp. 132).

Roca, W. M. y Mroginski, I. A. (Ed). (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT.

Rodríguez, I. P. y Barrera, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).

Rodríguez, M. H., Niño, N., Cutler, J., Langer, J., Casierra-Posada, F., Miranda, D., Bandte, M. y Büttner, C. (2016). Certificación de material vegetal sano en Colombia: un análisis crítico de oportunidades y retos para controlar enfermedades ocasionadas por virus. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 10(1), 164-175.

Rubio, L., Galipienso, L., y Ferriol, I. (2020). Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Frontiers in Plant Science*, 11(1092).

Ruggiero, C., São José, A.R., Volpe, C.A., Oliveira, J.C., Duringan, J.F., Baumgartner, J.G., Silva, J.R., Nakamura, K., Ferreira, M.E., Kavati, R. y Pereira, V.P. (1996). Maracujá para exportação: Aspectos técnicos da Produção. (pp. 64). Brasília-DF: Embrapa-SPI.

Sanabria, N. M. (2010). Reconocimiento de enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en el departamento de Boyacá. Tesis de maestría en fitopatología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8664/tesis617.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sastry, K. S. y Zitter, T. A. (2014). Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics. Plant virus and viroid diseases in the tropics, (pp. 149-480).

Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. y Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. European Journal of Plant Pathology, 110(9), 893-908.

Sepúlveda, M., Cardona, D., Gallo, Y., Higuera, M., Gutiérrez, P. A. y Marín, M. (2021). Virome analysis for identification of viruses associated with asymptomatic infection of purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Colombia. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. <https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1973583>

Shapiro, E. M., Sharer, K., Skrtic, S. y Koretsky, A. P. (2006). In vivo detection of single cells by MRI. Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 55(2), 242-249.

Shukla, D. D., Ward, C. W., Brunt, A. A. y Berger, P. H. (1998) Potyviridae family. AAB Descriptions of Plant Viruses no. 366.

Sierra, J. C., Gómez, C., Sánchez E. E. y Pinilla, M. (2013). Viabilidad financiera para la producción y exportación de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) hacia el mercado español. Ciencia y tecnología Agropecuaria, 14(1), 17-26. https://doi.org/10.21930/rcta.vol14_num1_art:266

Simpkins, I., Walkey, D. G. A. y Neely, H. A. (1981). Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Annals of Applied Biology*, 99(2), 161-169.

Singh, S. J. (2004). Virus and phytoplasma diseases of passion fruit. Naqvi S.A.M.H. (Ed). *Diseases of Fruits and Vegetables*. (Vol. 2, pp. 269-300). Maharashtra, Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2_8

Singh, B. (2015). Effect of antiviral chemicals on in vitro regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 18(5), 341-348.

Shoyinka, S. A., Thottappilly, G., Adebayo, G. G. y Anno-Nyako, F. O. (1997). Survey on cowpea virus incidence and distribution in Nigeria. *International Journal of Pest Management*, 43(2), 127-132.

SOAP de novo: short-read assembly. Recuperado el 15 de marzo de 2020 de <https://www.animalgenome.org/bioinfo/resources/manuals/SOAP.html>

Spadotti, D. M. A., Bello, V. H., Favara, G. M., Stangarlin, O. S., Krause-Sakate, R. y Rezende, J. A. M. (2019). *Passiflora edulis*: new natural host of *Melochia yellow mosaic virus* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 14, 23.

Spiegel, S., Zeidan, M., Sobolev, I., Beckelman, Y., Holdengreber, V., Tam, Y., Bar Joseph, M., Lipsker, Z. y Gera, A. (2007). The complete nucleotide sequence of *Passiflora* latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. *Archives of Virology*, 152(1), 181-189.

St Hill, A. A., Zettler, F. W., Elliot, M. S., Petersen, M. A., Li, R. H. y Bird, J. (1992). Presence of *passiflora* latent virus and a serologically distinct strain of maracuja mosaic virus in *Passiflora* spp. in Florida. *Plant Disease*. 76, 843–847.

Stakman, E. C. y Harrar, J.G. (1957). *Principles of Plant Pathology*. Ronald Press.

Tang, J., Clover, G.R.G., Alexander, B.J.R. y Quinn, B.D. (2008). First report of *Passiflora* latent virus in banana passionfruit (*Passiflora tarminiana*) in New Zealand. *Plant Disease* 92(3), 486.

Ulmer, T., MacDougal, J.M. (2004). *Passiflora*: Passionflowers of the world. Timber Press,

Vaca-Vaca, J. C., Carrasco-Lozano, E. C. y López-López, K. (2017). Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. *Archives of Virology* 162(2), 573-576.

Vemulapati, B., Druffel, K. L., Husebye, D., Eigenbrode, S. D. y Pappu, H. R. (2014). Development and application of ELISA assays for the detection of two members of the family *Luteoviridae* infecting legumes: Pea enation mosaic virus (genus *Enamovirus*) and Bean leafroll virus (genus *Luteovirus*). *Annals of Applied Biology*, 165, 130-136.

Verma, N., Ram, R. y Zaidi, A. A. (2005). In vitro production of *Prunus* necrotic ringspot virus-free begonias through chemo-and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 239-247.

Vidal, A. H., Sanches, M. M., Alves-Freitas, D. M. T., Abreu, E. F. M., Lacorte, C., Pinheiro-Lima, B., Rosa, R. C. C., Jesus, O. N., Campos, M. A., Varsani, A. y Ribeiro, S. G. (2018). First world report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* infecting passionfruit. *Plant Disease*, 102(12): 2665.

Vijan, L. E. y Topală, C. M. (2016). Study of ribavirin–nucleic acids interaction. *Chemical Engineering Communications*, 203(12), 1562-1571.

Villalobos, V. (1979). Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) libres de virus por cultivo in vitro de meristemos y ápices vegetativos. México, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

Villalobos, V. (1982). Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) libres de virus por cultivo in vitro de meristemos y ápices vegetativos. *Agrociencia*, 48, 107-118.

Hulo, C., de Castro E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. y Le Mercier, P. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity, SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Recuperado el 21 de abril de 2020 de https://viralzone.expasy.org/50?outline=all_by_species

Wang, Q. y Valkonen, J. (2008). Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods*, 154(1-2), 135-145.

Wang, Q., Cuellar, W., Rajamäk, M., Hirata, Y. y Valkonen, J. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 237-250.

Wang, Q. y Valkonen, J. P. (2009). Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Technical and application. *Trends in Plant Science*, 14(3), 119-122.

Wang, Y. y Navin, N. E. (2015). Advances and applications of Single-Cell sequencing technologies. *Molecular Cell*, 58(4), 598-609.

Wang, M., Chen, L., Zhang, Z., Blystad, D. y Wang, Q. (2018). Cryotherapy: a novel method for virus eradication in economically important plant species. *Methods in molecular biology* 1815, 257–268.

White, P. (1934). Multiplication of the viruses of tobacco and Aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. *The Rockefeller Institute*, (pp. 581).

Wylie, S. J. y Jones, M. G. (2011). The complete genome sequence of a Passion fruit woodiness virus isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. *Archives of Virology*, 156(3), 479-482.

Yockteng, R., d'Eeckenbrugge, G. C., Souza-Chies, T. T. (2011). *Passiflora*. Kole, C. (Ed). *Parientes de cultivos silvestres: recursos genómicos y de reproducción*. Berlín, Springer.

Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F. y Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144–5164.

Yuan, Y., Lee, H., Hu, H., Scheben, A. y Edwards, D. (2018). Single-Cell genomic analysis in plants. *Genes*, 9(1), 50.

Zerbino, D. R. y Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821–829.

Zerbino, D. (2010). Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. Capítulo 11, Unidad 11.5.

Zhang, S., Zhao, T., Liu, J., Zi, L., Li, X., Wang, Y., Zhang, Z., Li, D., Yu, J. y Han, C. (2020). First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in passion fruit plants exhibiting mosaic and mottling in China. *Plant Disease*, 104(2): 601.

Zhao, L., Wang, M. R., Cui, Z. H., Chen, L., Volk, G. M. y Wang, Q. C. (2018). Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of *Apple stem grooving virus* from infected in-vitro-cultured apple shoots. *Plant Disease*, 102(8), 1574-1580.

Zumla, A., Al-Tawfiq, J. A., Enne, V. I., Kidd, M., Drosten, C., Breuer, J., Muller, M., Hui, D., Maeurer, M., Bates, M., Mwaba, P., Al-Hakeem, R., Gray, G., Gautret, P., Al-Rabeeah, A., Memish, Z. y Gant, V. (2014). Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections-needs, advances, and future prospects. *The Lancet infectious diseases*, 14(11), 1123-1135.

Capítulo 1.

Detección molecular de virus en cultivos, plántulas y semillas de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) en el oriente de Antioquia

Artículo sometido a publicación en Revista:

Bioagro. Número del manuscrito: ms_2176

Daniela Cardona

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: dcardonam@unal.edu.co

Yuliana Gallo García

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

Mónica Higuita

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: mmhiguit@unal.edu.co

Rodrigo Hoyos Sánchez

Laboratorio de Biotecnología vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: rhoyos@unal.edu.co

Pablo A. Gutiérrez Sánchez

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

Mauricio Marín Montoya

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)

RESUMEN

La gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) es uno de los frutales con mayor crecimiento en los últimos años y de gran influencia en la economía de Antioquia (Colombia); sin embargo, su cultivo es afectado por diferentes problemas fitosanitarios, especialmente la marchitez por *Fusarium oxysporum* y enfermedades de origen viral. En este estudio se evaluó la prevalencia de cuatro virus de ARN (Soybean mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus, Passion fruit yellow mosaic virus y Cucumber mosaic virus) mediante RT-qPCR y de dos virus de ADN (GBVA y begomovirus) por PCR, a partir de muestras sintomáticas (SI) y asintomáticas (AS) obtenidas en 15 lotes, 15 grupos de plántulas (PL) y 15 muestras de semilla sexual (SE) en el oriente de Antioquia. Los genomas de los virus fueron ensamblados utilizando secuenciación masiva (HTS) a partir de grupos de muestras (15x). Con excepción de CABMV y begomovirus, los otros virus fueron encontrados en las muestras sintomáticas y asintomáticas, siendo el PFYMV (SI=33,3% y AS=46,6%) y SMV (SI=33,3% y AS=20%) los de mayor prevalencia, mientras que GBVA y CMV se detectaron en niveles inferiores al 26,6%. De forma interesante, los cuatro virus detectados se encontraron directamente sobre brotes de semillas (SMV=40%, CMV=13,3%, PFYMV=86,6%, GBVA=53,3%), indicando que este material de siembra juega un papel importante en la transmisión de estos virus en gulupa, así como también las plántulas comercializadas en esta región (SMV=86,6%, CMV=0%, PFYMV=60%, GBVA=53,3%). Mediante HTS, fue posible el ensamblaje completo de los genomas de PFYMV, SMV y GBVA. Estos resultados enfatizan la necesidad de generar material certificado por su sanidad viral en gulupa.

Palabras clave adicionales: Passifloraceae, RT-qPCR, secuenciación, virus de plantas

ABSTRACT

Molecular detection of viruses infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) crops, plantlets and seeds from Eastern Antioquia (Colombia)

Gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) is among the crops with the largest expansion rates in Antioquia (Colombia). This rapid increase has been accompanied by a rise in prevalence of vascular wilt (*Fusarium oxysporum*) and viral diseases. In this work, we evaluated the

prevalence of four RNA viruses (SMV, CABMV, PFYMV and CMV), in addition to begomovirus and GBVA, a DNA virus of the genus *Badnavirus*. The presence of viruses was investigated in 15 samples of seedlings, plantlets, asymptomatic and symptomatic plants from crops from Eastern Antioquia. For RNA viruses, infection was determined by RT-qPCR; in the case of GBVA and begomovirus, detection was performed using PCR. The presence of these viruses was further confirmed by high-throughput sequence analysis of bulked samples (15x) which allowed the complete sequencing of PFYMV, SMV and GBVA. PFYMV and SMV were the most prevalent viruses in adult plants. PFYMV was detected in 33.3% of symptomatic and 46.6% of asymptomatic plants, while SMV was found in 33.3% of symptomatic, and 20% of asymptomatic plants. For GBVA and CMV, the prevalence was below 26.6%. Interestingly, these four viruses had a high prevalence in sprouting seeds (SMV: 40%, CMV: 13.3%, PFYMV: 86.6% and GBVA: 53.3%). Plantlets commercialized in the region showed significant levels of SMV (86.6%), PFYMV (60%), and GBVA (53.3%). CABMV and begomovirus were not detected in any sample. These results suggest that gulupa planting material has an important role in virus transmission and highlight the urgent need of implementing virus seed certification schemes for this crop.

Additional key words: Passifloraceae, plant viruses, RT-qPCR, sequencing

INTRODUCCIÓN

La gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) es una planta enredadera de la familia Passifloraceae cuyo centro de origen corresponde a la Amazonía brasileña y su principal centro de diversificación se localiza en la región Andina colombiana. La gulupa está botánicamente relacionada con el maracuyá (*P. edulis* f. *flavicarpa*), pero presenta un sabor más dulce gracias a su mayor cantidad de azúcares y a su menor concentración de ácido cítrico, por lo que sus frutos son muy apetecidos en los mercados internacionales (Manicom et al., 2003; Melgarejo, 2019). En Colombia, este cultivo se extiende a cerca de 1.500 ha y genera alrededor de 25.000 t de fruta al año, siendo la mayor parte exportada a Europa y Estados Unidos (Agronet, 2020). Antioquia es el principal productor de esta fruta en el país, al aportar cerca del 35% del área cultivada y 55% de la producción nacional. En esta región, gracias a sus mayores niveles de tecnificación, se obtienen rendimientos promedio de 24,7 t/ha, muy superiores al promedio nacional de

16,55 t/ha (Agronet, 2020). Sin embargo, el cultivo de gulupa presenta diferentes problemas fitosanitarios entre los que se destacan la marchitez vascular por *Fusarium oxysporum*, la mancha bacterial por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* y la roña por *Cladosporium cladoporioides* (Ortíz y Hoyos, 2012; Joy y Sherin, 2016). Adicionalmente, en los últimos años se han reportado diversas enfermedades de origen viral principalmente asociadas a la infección por el potyvirus: Soybean mosaic virus (SMV) (Cutler et al., 2018; Jaramillo et al., 2018), el tymovirus: Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) (Jaramillo et al., 2019); y una nueva especie tentativa de badnavirus denominada: Gulupa bacilliform virus A (GBVA) (Sepúlveda et al., 2020); aunque en la región de Cundinamarca también se han registrado el Cucumber mosaic virus (CMV) y el Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) (Camelo, 2010; Gordillo, 2011).

En el mundo se han reportado al menos 20 diferentes especies de virus infectando *P. edulis* que pertenecen a los géneros *Potyvirus* (Nascimento et al., 2006; Chong et al., 2018; Nakasato et al., 2020); *Roymovirus* (*Passiflora edulis* symptomless virus -PeSV) (Jover-Gil et al., 2018), *Geminivirus* (Vaca-Vaca et al., 2017; Spadotti et al., 2019); *Cucumovirus* (Parrella y Sorrentino, 2009), *Polerovirus* (Vidal et al., 2018; Zhang et al., 2020), *Tobamovirus* (Fribourg et al., 1987), *Rhabdovirus* (Liberato y Zerbini, 2020), *Cilevirus* (Ramos et al., 2020) y *Tymovirus* (Morales et al., 2002; Jaramillo et al., 2019). De estos virus, en los cultivos de gulupa de Antioquia, solo se ha detectado el SMV asociado a plantas presentando síntomas con mosaicos rugosos, islas verdes, deformación foliar, enación y moteado de venas; el PFYMV en plantas con síntomas de mosaicos suaves y moteados foliares (Jaramillo et al., 2018, 2019) y el GBVA, del cual se desconocen hasta el momento los síntomas específicos que causa en este hospedante (Sepúlveda et al., 2020). Aunque los métodos de transmisión de estos virus en los cultivos de gulupa del país no han sido bien caracterizados, en un trabajo reciente en el que se evaluó con RT-qPCR la prevalencia de SMV en cultivos comerciales, plántulas y semillas de gulupa del suroeste de Antioquia, se encontraron valores superiores al 60% en plantas adultas, y del 95% en semillas sexuales, lo que sugería la transmisión vertical de este virus (Jaramillo et al., 2018), un hecho que no resulta sorprendente por cuanto se ha demostrado que el SMV se transmite eficientemente por esta vía en soya (Domier et al., 2011).

Con el fin de continuar con la evaluación de los niveles de prevalencia de virus en cultivos de gulupa de Antioquia y en material de siembra, en este estudio se evaluó la infección de cuatro virus de ARN (SMV, CABMV, PFYMV y CMV) mediante RT-qPCR y de dos virus de ADN (GBVA) y begomovirus por PCR convencional, a partir de muestras foliares sintomáticas y asintomáticas obtenidas en plantas en producción, así como en plántulas y semilla sexual comercializadas en el oriente de Antioquia. Adicionalmente, los genomas de los virus detectados fueron ensamblados y anotados a partir de datos obtenidos por secuenciación masiva (High-Throughput Sequencing -HTS) y determinados sus niveles de variación con respecto a otros genomas reportados para dichas especies virales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Este estudio se realizó a partir de muestras foliares sintomáticas (SI) y asintomáticas (AS) obtenidas en 15 lotes de cultivo de gulupa, así como en 15 muestras de plántulas (PL) de 1-2 meses (3 plántulas por lote) y 15 muestras de semilla sexual (SE) (1 g por muestra) procedentes de los municipios de Marinilla (6°10'28"N 75°20'20"O), San Vicente Ferrer (6°16'55"N 75°19'56"W) y Sonsón (5°42'34"N 75°18'38"O) en la región del oriente de Antioquia. En cada lote de cultivo de gulupa en producción, se obtuvieron 20 hojas asintomáticas y 20 hojas con síntomas posiblemente asociados a enfermedades virales, tales como mosaicos rugosos, moteados cloróticos, verdeamiento de nervaduras y deformación de tejidos foliares (Figura 1). Para el caso de las semillas, 500 mg de cada muestra fueron sometidas a un proceso de fermentación durante 48 h, seguido por la eliminación del arilo. Posteriormente se realizó un tratamiento pregerminativo de estratificación en frío a 4°C por 15 días (Melgarejo, 2019), para finalmente ser sembradas en turba estéril a temperatura ambiente para inducir su germinación, colectándose los brotes de manera aséptica, para proceder a la extracción de sus ácidos nucleicos.

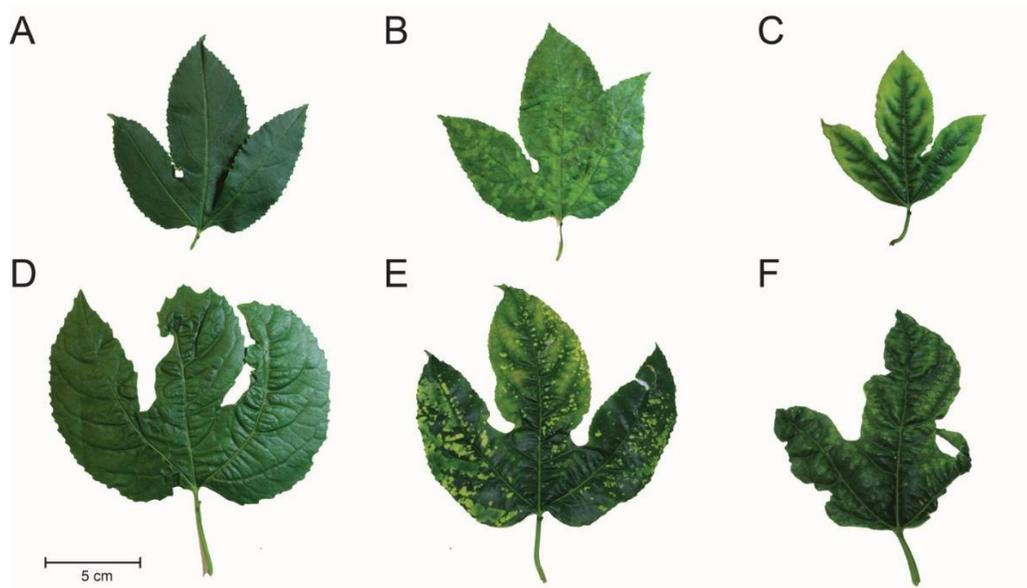


Figura 1. Síntomas asociados a enfermedades virales en plantas de gulupa en producción procedentes del oriente de Antioquia. A. Hoja asintomática. B. Mosaico. C. Verdeamiento de nervaduras. D. Deformación foliar. E. Moteados cloróticos. F. Mosaico rugoso y deformación foliar.

Extracción de ácidos nucleicos. Las muestras de los diferentes tejidos fueron maceradas con nitrógeno líquido para proceder a la extracción del ARN total a partir de 100 mg usando el método del Trizol (Chomczynski y Sacchi, 1987) para tejidos de plantas adultas y de plántulas, mientras que el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher Scientific) se utilizó para brotes de semillas. El ARN total fue eluido en 40 μ L de agua destilada estéril tratada con DEPC. Paralelamente, se procedió a la extracción del ADN utilizando el método del CTAB (Doyle, 1991) a partir de 60 mg de tejido y dilución final en 50 μ L de agua destilada estéril. La pureza y concentración del ARN y ADN fue determinada por lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific). Simultáneamente, se preparó un grupo de muestras foliares (*bulks*) (SI y AS) hasta alcanzar 5 g de tejido como base para la extracción de ARN de doble cadena (ARNdc) siguiendo el procedimiento descrito por Valverde et al. (1990), en el que se usan columnas de celulosa (C6288 Medium, Merck) equilibradas en buffer STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA a pH 8.0) con etanol al 16,5% y elución final en 200 μ L de agua destilada estéril tratada con DEPC. Dada la baja cantidad de tejido disponible para plántulas y brotes de semillas, para los grupos de dichas muestras se extrajo el ARN total usando el kit GeneJET Plant RNA

Purification (Thermo Fisher Scientific). Las tres extracciones realizadas para estos grupos de muestras fueron utilizadas para la secuenciación masiva (HTS), previa evaluación de su calidad y concentración en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). A partir de cada una de las extracciones de ARN obtenidas para las 15 muestras AS, SI, PL y SE de gulupa, se realizaron pruebas de detección de los virus de ARN previamente reportados en Colombia infectando este frutal (SMV, CABMV, PFYMV y CMV) (Jaramillo et al., 2018; 2019). La síntesis de ADNc se realizó en un volumen de 20 μ L utilizando 200 U de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de RiboLock, 50-100 ng de ARN total y 20 pmol de los primers Oligo-dT para los potyvirus SMV y CABMV; Tymo_R_CP para PFYMV (Jaramillo et al., 2019) y una mezcla equimolar de CMV-R (Cuspoca, 2007), CMVdo1244b (Xanthis et al., 2015) y CMV_qRT_R (Feng et al., 2006) para CMV (Cuadro 1). Las reacciones fueron incubadas a 65°C por 5 min seguido por 1 h a 42°C e inactivación de la enzima por 10 min a 70°C. El ADNc (50-100 ng) fue luego utilizado como molde para realizar las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) en un volumen de 14 μ L conteniendo 3 μ L de ADNc, 0,3 μ M de cada par de primers (Cuadro 1) y 6,25 μ L del kit Maxima SYBR Green/ROX (Thermo Fisher Scientific). El programa consistió en 10 min a 95°C para activar la Taq polimerasa, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s y 52°C por 60 s, en un equipo Rotor-Gene Q-5plex (Qiagen). Una vez finalizada la qPCR se determinaron los valores de ciclo umbral (Ct) y temperatura de fusión (Tm) en el rango 50-99°C. En todas las reacciones se incluyó un control positivo para cada virus a partir de tejido foliar en el que previamente se identificó el virus y un control negativo, donde se incluyeron todos los reactivos excepto el ADNc, el cual fue reemplazado por agua. Posteriormente, tres de los amplicones de la qPCR que resultaron positivos para cada virus fueron corridos en un gel de agarosa al 2% y purificados directamente del gel usando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) para su secuenciación Sanger en ambos sentidos en la compañía MacroGen (Corea del Sur).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). A partir del ADN de las muestras AS, SI, PL y SE de gulupa, se evaluó la presencia del badnavirus GBVA y de begomovirus mediante PCR. Las reacciones consistieron en un volumen total de 25 μ L, con 13 μ L de agua ultrapura estéril, 2,5 μ L de buffer de enzima (10X), 1,8 μ L de MgCl₂, 2,5 μ M de

dNTPs, 0,2 µL de Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de BSA, 20 ng de ADN y 0,5 µM de los primers específicos para cada virus (Cuadro 1). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador T3 (Biometra) con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos a 94°C (30 s), 52°C (45 s) y 72°C (1 min); y una extensión final por 5 min a 72°C. Los productos amplificados fueron verificados por electroforesis en un gel de agarosa (1,5%) suplementado con GelRed 1X (Biotium) y purificados directamente del gel usando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) para su secuenciación Sanger.

Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real y PCR convencional permitieron determinar el porcentaje de prevalencia para cada virus, expresada como la cantidad de muestras infectadas/el número total de muestras analizadas x 100.

Secuenciación masiva y análisis bioinformáticos. La extracción de ARNdc fue inicialmente desnaturalizada a 98°C por 5 min y utilizada junto a las dos muestras de ARN total para la generación de librerías de ADNc usando el kit TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep (Illumina) y eliminación previa del ARN ribosomal (ARNr) con el kit Ribo-Zero Plant kit (Illumina). La secuenciación masiva de nueva generación fue realizada en un equipo Illumina NovaSeq en la compañía Macrogen (Corea del Sur). Una vez obtenidas las secuencias, se realizó la remoción de las bases de baja calidad (Phred < 30) usando el programa Sickle (Joshi y Fass, 2011). Las secuencias virales fueron identificadas utilizando el programa Plant Virus Detection Pipeline (PVDP) (Gutiérrez et al., 2021) disponible en: <https://biotecnologiamicrobianaunalmed.github.io/Plant-Virus-Detection-Pipeline/>. Los genomas de los virus identificados fueron ensamblados utilizando el programa Magic-BLAST (Boratyn et al., 2019) y confirmados mediante ensamblaje *de novo* usando Spades (Bankevich et al., 2012). Los ensamblajes fueron verificados visualmente con el paquete Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2011) y las secuencias consenso fueron anotadas con ayuda de la herramienta ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) y BLASTX (Gish y States, 1993). Los análisis filogenéticos fueron realizados por el método Neighbor-Joining utilizando las secuencias de nucleótidos para cada genoma con mil réplicas de *bootstrap* utilizando el programa MEGAX (Kumar et al., 2018). El alineamiento de secuencias fue realizado con MUSCLE y las distancias calculadas con el método de Tamura-Nei con una distribución Gamma

(Edgar, 2004). Las secuencias obtenidas para los genomas completos de PFYMV y SMV fueron depositadas en GenBank con los números de accesión: MW655828 y MW655827, respectivamente. La secuencia del genoma del badnavirus GBVA fue obtenida previa amplificación por RCA (*Rolling Circle Amplification*) a partir del ADN procedente del grupo de muestras SI de gulupa, usando la enzima phi29 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) en un volumen total de 50 μ L conteniendo 0,5 μ L de phi29, 2,5 μ L de buffer 10X, 3,1 μ L de dNTPs 10 uM, 1,25 μ L de primers hexámeros 10 μ M y 1 μ L de ADN previamente desnaturalizado a 95°C por 3 min. La reacción de RCA fue incubada a 30°C por 18 h, seguida por una inactivación de la enzima a 65°C por 10 min. El producto purificado de RCA fue utilizado como molde para la amplificación por PCR con los primers específicos GBVA_RT_F/R para confirmar su naturaleza viral, seguido por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y tinción con GelRed 1X (Biotium). Finalmente, el producto de RCA también fue utilizado para su secuenciación HTS usando un equipo Novaseq con el kit Truseq DNA Library en la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas para los tres genomas completos de GBVA fueron depositadas en GenBank con los números de accesión: MW655829, MW655830 y MW655831.

RESULTADOS

RT-qPCR y PCR. En las evaluaciones realizadas mediante RT-qPCR y PCR en las muestras foliares obtenidas de plantas en producción sintomáticas (SI) se detectaron tres (SMV, CMV y PFYMV) de los cuatro virus de ARN evaluados, además del badnavirus GBVA, con valores de prevalencia de 33,3%, 13,3% y 33,3% y 26,6% para SMV, CMV, PFYMV y GBVA, respectivamente. De manera interesante, estos mismos virus se encontraron en las muestras de las plantas aparentemente asintomáticas (AS) y con excepción del PFYMV que se detectó en el 46,6% de estas muestras, los niveles de prevalencia fueron inferiores (SMV=20%, CMV=6,6% y GBVA=20%) a los encontrados en las muestras SI (Figura 2).

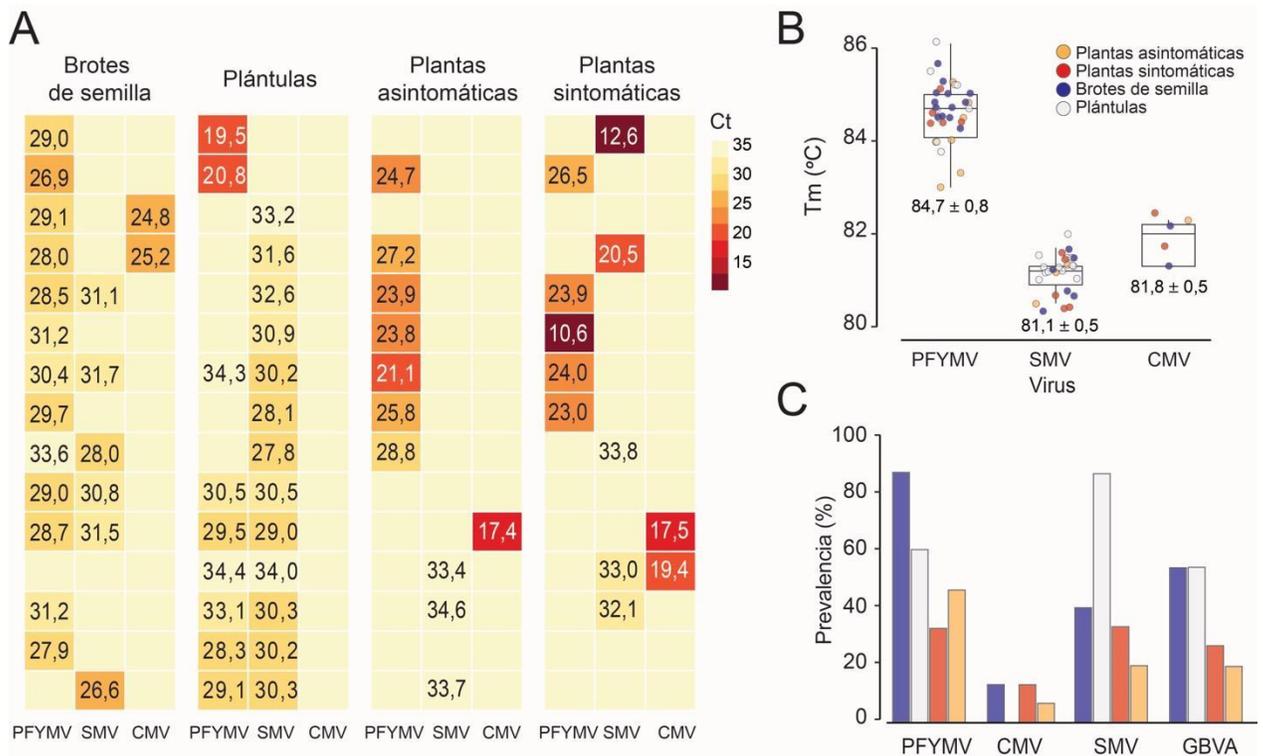


Figura 2. Resultados de la detección molecular de virus en muestras de gulupa utilizando RT-qPCR y PCR convencional. Valores de Ct (A) y Tm (B) para los tres virus de ARN detectados mediante RT-qPCR. (C) Porcentajes de prevalencia viral en cada tipo de muestra de gulupa evaluada.

Estos cuatro virus también fueron encontrados con mayor frecuencia en los brotes derivados de semillas de gulupa, alcanzándose valores de 40% para SMV, 13,3% para CMV, 86,6% para PFYMV y 53,3% para GBVA; mientras que, en plántulas, no se encontró infección por CMV, pero sí por SMV (86,6%), PFYMV (60%) y GBVA (53,3%). En ninguna de las muestras incluidas en el estudio se detectó el potyvirus CABMV.

La naturaleza de los amplicones obtenidos en las reacciones de RT-qPCR se evaluó inicialmente por comparación de los valores de Tm con los previamente reportados para dichos virus de ARN en Colombia por Jaramillo et al. (2018; 2019) y Sepúlveda et al. (2020), siendo el SMV, CMV y PFYMV detectados con valores promedio de Tm de 81,07°C (SD=0,49), 81,82°C (SD=0,48) y 84,7°C (SD=0,76), respectivamente (Figura 2). Los valores de Ct para las muestras que resultaron positivas para los tres virus en plántulas y semillas se ubicaron en su mayoría alrededor del ciclo 30, mientras que en las

muestras de plantas en producción estos valores generalmente se ubicaron entre los ciclos 20 y 30, con casos excepcionales como la detección en dos muestras SI del PFYMV y SMV en los ciclos 10,6 y 12,6, respectivamente (Figura 2). Adicionalmente, para los tres virus de ARN y para el badnavirus GBVA, se purificaron y secuenciaron por el método de Sanger tres amplicones, confirmándose su identidad por comparación con GenBank. Para el caso de SMV, las accesiones con mayores niveles de identidad correspondieron a KY249378, KY249377 y KY249373 (% identidad= 96,88%; Valor $e=2e^{-33}$, cobertura 100%) previamente depositadas por Jaramillo et al. (2018) a partir de aislamientos de SMV infectando gulupa en el suroeste de Antioquia (Colombia). Las secuencias del CMV presentaron un porcentaje de identidad del 100% con respecto a la accesión MG200270 (Valor $e= 8e^{-05}$) depositada en GenBank a partir de aislamientos de CMV infectando *Cymbidium* en Corea del Sur y del 96,55% (Valor $e= 0.004$) con la accesión MN422335 correspondiente a un aislamiento de CMV obtenido en *Capsicum annuum* en China. Las secuencias de PFYMV fueron 100% idénticas (valor $e= 9e^{-14}$) a las accesiones KY823435, KY823435 y KY823435 de este virus depositadas por Jaramillo et al. (2019) a partir de muestras foliares de gulupa obtenidas en el oriente de Antioquia.

Las secuencias obtenidas a partir de los amplicones de 979 pb obtenidos por PCR convencional para GBVA presentaron niveles de identidad del 72,21% (Valor $e=6e^{-98}$) con respecto a la accesión KJ413252 del badnavirus Blackberry virus F y del 71,43% (Valor $e=2e^{-85}$) con la accesión JF911400 del Banana streak UA virus. Al realizar un alineamiento directo con las secuencias de esta región de RT+RNAsa H del GBVA reportadas por Sepúlveda et al. (2020) en el reporte de esta nueva especie, el valor de identidad fue superior a 99,1%.

Secuenciación masiva y análisis bioinformáticos. La secuenciación de nueva generación de los grupos de muestras foliares obtenidas a partir de plantas SI y AS en producción, generó un total de 30.265.602 de reads pareados de 101 nt; mientras que para las plántulas y brotes de semillas estos valores alcanzaron 42.003.192 y 62.157.352 de reads pareados, respectivamente (Figura 3). Para facilitar los análisis bioinformáticos, los tres grupos de datos fueron analizados con respecto a la diversidad de secuencias determinadas por el conteo de secuencias únicas y sus abundancias respectivas. En el grupo de datos procedente de las muestras de plantas en producción, los datos correspondientes a secuencias únicas fueron 4.363.349 reads (85,6% de redundancia),

en plántulas éstas fueron de 8.576.952 reads (79,6% de redundancia) y en semillas de 10.852.210 (82,5% de redundancia). De estos reads, 13,25% (SI+AS), 1,95% (PL) y 1,81% (SE) compartieron niveles significativos de similaridad con respecto a secuencias de virus depositadas en las bases de datos moleculares, siendo evidente que la metodología de extracción de dsRNA fue muy efectiva para enriquecer secuencias virales en la secuenciación HTS (Figura 3). Los virus más abundantes en el set de datos SI+AS fueron el PFYMV (3.747.752 reads), SMV (86.097) y el GBVA (2.844,7 reads), con niveles de abundancia de 123.828,8, 2.844,7 y 284,2 reads por millón (RPM), respectivamente (Figura 3). Para el caso de las muestras obtenidas en las plántulas y semillas de gulupa, sólo se encontraron secuencias virales asociadas al badnavirus GBVA, con niveles de abundancia de 21 RPM (881 reads) y 20,1 RPM (1250 reads), respectivamente (Figura 3).

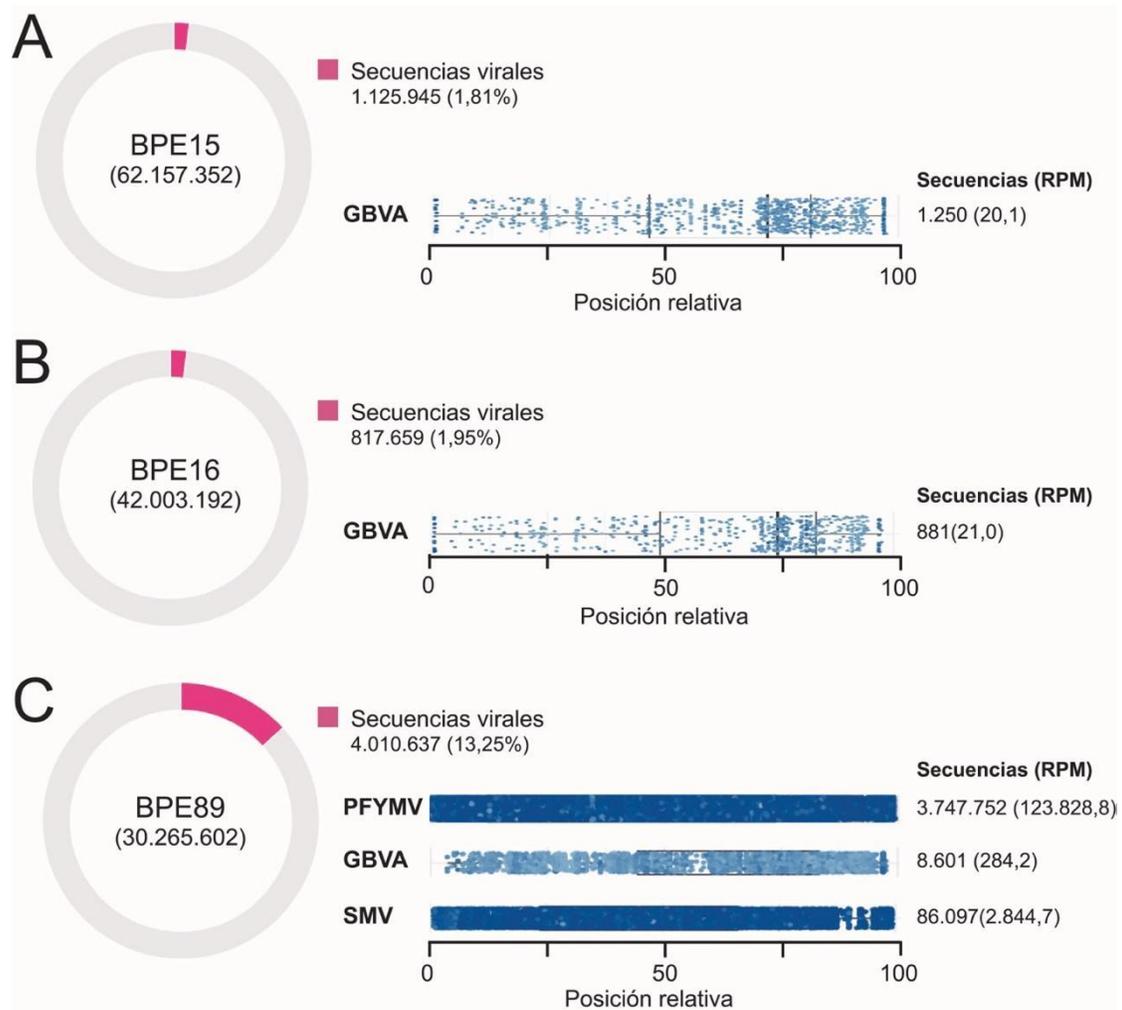


Figura 3. Detección y caracterización de genomas de virus mediante secuenciación masiva de nueva generación (HTS). Las gráficas circulares representan la proporción de secuencias virales en cada grupo de datos para brotes de semillas (A), plántulas (B) y muestras sintomáticas y asintomáticas de plantas de gulupa en producción (C). Las gráficas de barras corresponden a la ubicación de *reads* para cada genoma de los virus detectados en las tres clases de muestras. La intensidad del color es indicativa del porcentaje de identidad con respecto a secuencias de genomas de referencia y su distribución indica la profundidad a lo largo del genoma viral.

El genoma completo del PFYMV presentó 6.088 nt (aislamiento PFYMV_BPE89) y se identificaron los tres ORF que codifican para una poliproteína de 1.768 aa y 197.9 kDa asociada con la replicación (ORF1), una proteína de movimiento de 617 aa y 68.6 kDa (ORF2), y para la cápside viral de 193 aa y 19.8 kDa (ORF3). La poliproteína es clivada

por una cistein-proteasa viral para dar origen a una metil-transferasa (MT), proteasa (PRO), helicasa (HEL) y para la polimerasa de ARN que depende de ARN (RdRP). También se identificó en el extremo 5' las secuencias conservadas HP1 (posiciones 33-63) y HP2 (posiciones 75-98) que forman una horquilla (*hairpin loop*) asociada con el empaquetamiento del genoma viral y en el extremo 3' se ubicó el motivo de ARNt-val, así como la secuencia "Tymobox" en las posiciones 5.383-5.404 que actúa como una secuencia promotora para la síntesis de ARN subgenómico (ARNsg) del ORF3 (Figura 4). La secuencia del PFYMV_BPE89 compartió un 99,7% de identidad a nivel de nucleótidos con el aislamiento PFYMV_Antioquia, única secuencia completa hasta ahora reportada en GenBank para el genoma de este virus. Ambos aislamientos difirieron en 17 nt, mientras que con las secuencias encontradas por Sepúlveda et al. (2020) en muestras de gulupa asintomáticas de Antioquia (BPE4 y BPE6), dichos valores fueron del 96,1%. El análisis filogenético realizado con las secuencias completas de los genomas de diferentes especies del género *Tymovirus* ubicó a los cuatro aislamientos de PFYMV en un subclado que hace parte del grupo que incluye a la especie tipo (Turnip yellow mosaic virus -TYMV), además del *Asclepias asymptomatic virus* (AsAV), *Okra mosaic virus* (OMV) y *Kennedy yellow mottle virus* (KYMV) (Figura 4).

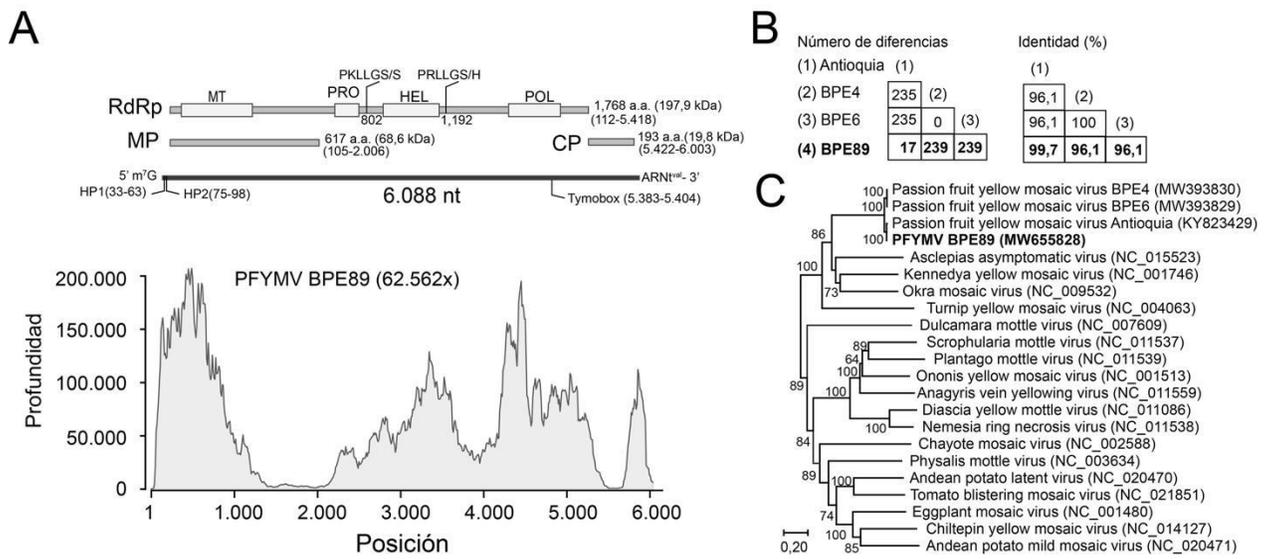


Figura 4. (A) Diagrama del genoma de PFYMV obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa en producción. (A) Se presenta la ubicación de cada ORF y de secuencias representativas en los genomas de tymovirus, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Matriz de diferencias y porcentaje de identidad de nucleótidos para diferentes aislamientos de PFYMV obtenidos en gulupa. (C) Árbol filogenético

generado a partir de secuencias completas del genoma viral de diferentes tymovirus. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap* y en letra negrita se indica el aislamiento aquí secuenciado.

El ensamblaje del genoma del SMV (aislamiento SMV_BPE89) tuvo un tamaño de 9.608 nt (excluyendo la cola de poli-A) y un gran ORF que codifica para una poliproteína de 3.065 aa y 349,3 kDa; también se identificó el ORF interno (posiciones 2.424 a 3.103) denominado N3-PIPO que codifica para una proteína putativa de 227 aa y 26,4 kDa. Los análisis bioinformáticos permiten predecir que la poliproteína es procesada por tres proteasas virales (P1, HC-pro y NIa-pro) en 10 proteínas maduras (Figura 5). Entre las posiciones 17-28 de la región 5' del genoma se ubicó el motivo conservado Potybox A (TAAAGACAACAA), mientras que una variación del motivo Potybox B (TCTACAAG) se identificó 39 nt más adelante (Figura 5). Una comparación del genoma completo del aislamiento SMV_BPE89 con respecto al aislamiento SMV_Gulupa (KY249378) reportado por Jaramillo et al. (2018) demostró que comparten un 98,7% de identidad, mientras que dicho valor fue del 97,9% con la accesión MN124783 (aislamiento SMV/BSB1) obtenida a partir de la infección de *Passiflora* sp. en Brasil y del 97,4 % con el aislamiento WS109 procedente de soya (FJ640959) (Figura 5). El análisis filogenético realizado a partir de la secuencia de nucleótidos de todo el genoma, agrupó al SMV_BPE89 con los otros dos aislamientos obtenidos en passifloráceas en un subclado claramente separado de los aislamientos de este virus procedentes de plantas de soya cultivadas (Figura 5).

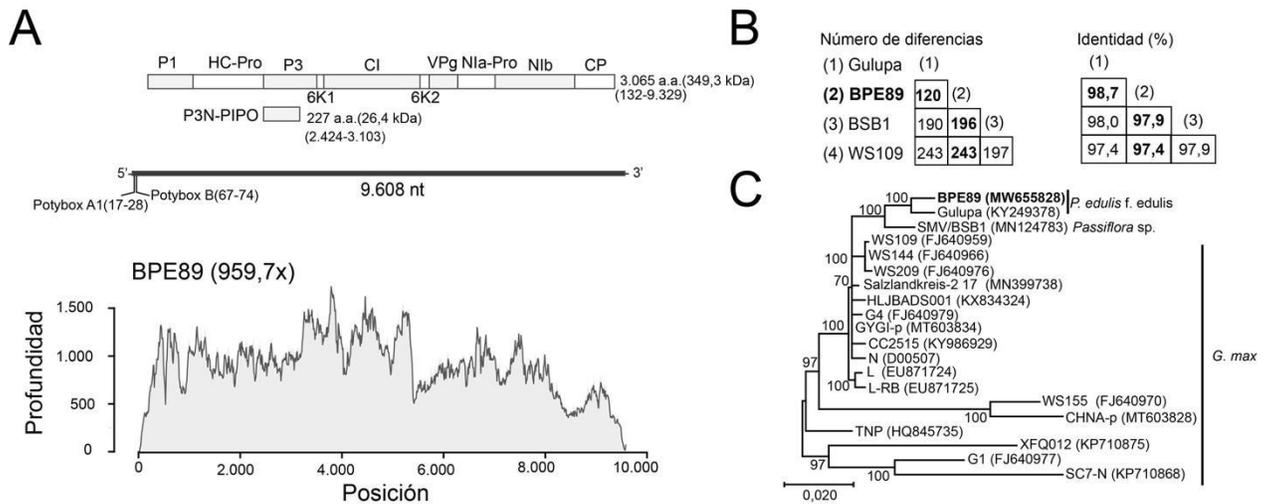


Figura 5.(A) Diagrama del genoma de SMV obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa en producción. (A) Se presenta la ubicación de cada ORF y de secuencias representativas de los genomas de potyvirus, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Matriz de diferencias y porcentaje de identidad de nucleótidos para diferentes aislamientos de SMV obtenidos en gulupa (BSB1, Gulupa) y en soja (WS109). (C) Árbol filogenético generado a partir de secuencias completas del genoma viral de diferentes aislamientos de SMV en passifloras y soja. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap* y en letra negra se indica el aislamiento aquí secuenciado.

La secuenciación HTS del ADN derivado de RCA, permitió el ensamblaje del genoma del GBVA de 6.951 pb, con dos ORF que codifican para las proteínas P2 y P3, tal como lo reportó recientemente Sepúlveda et al. (2020). En este caso, nuevamente no se encontró el ORF1 que se presenta en la mayoría de especies de badnavirus. El ORF 2 se ubicó entre las posiciones 257-664 y codifica para una proteína de 135 aa (15,5 kDa) cuya función se desconoce en la actualidad. El ORF 3 se identificó entre las posiciones 661-6.456 nt, y se predice que traduce para una poliproteína de 1.931 aa (222,1 kDa), que una vez es clivada por una aspartil-proteasa da origen a la proteína de movimiento, un péptido con dominio de unión al zinc (zinc-knuckle), aspartil-proteasa, reversa transcriptasa y ARNasa H (Figura 6). Además de estas regiones, se identificó la región que codifica para el ARNt-Met que define el inicio del genoma viral (5'-TGGTAGCGAAGCAAGGTTCA-3'), la caja TATA (5'-TATATAA-3') entre las posiciones 6.806-6.812 y una señal de poliadenilación (5'-AATAAA-3') entre las posiciones 6.520-6.525 (Figura 6).

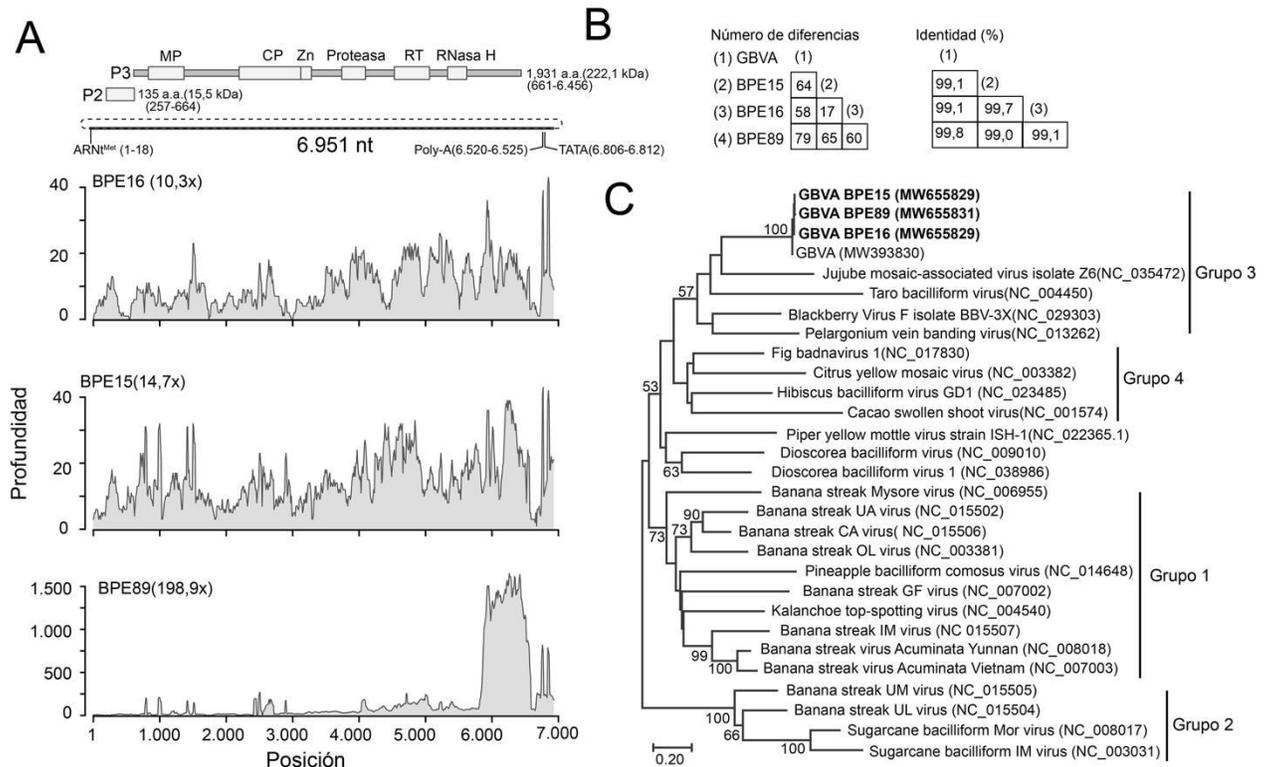


Figura 6. (A) Diagrama del genoma de GBVA obtenido en muestras foliares de plantas de gulupa en producción (BPE89), así como de plántulas (BPE16) y semillas (BPE15). (A) Se presenta la ubicación de cada ORF y de secuencias representativas de los genomas de badnavirus, así como la profundidad de secuenciación a lo largo del genoma. (B) Matriz de diferencias y porcentaje de identidad de nucleótidos para diferentes aislamientos de GBVA. (C) Árbol filogenético generado a partir de secuencias completas del genoma viral de diferentes badnavirus. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap* y en letra negra se indican los aislamientos secuenciados en Colombia.

Comparaciones realizadas entre los tres genomas de GBVA obtenidos en el presente estudio (BPE15, BPE16 y BPE89) con el genoma del aislamiento MW393830 reportado por Sepúlveda et al. (2020), indicaron que éstos comparten más del 99% de identidad a nivel de la secuencia de nucleótidos para todo el genoma. El análisis filogenético con dichas secuencias agrupó a estos cuatro aislamientos de GBVA en un único subclado que hace parte del Grupo 3 de los badnavirus y cuyas especies más cercanas fueron Jujube mosaic-associated virus (JuMaV) y Taro bacilliform virus (TaBV) (Figura 6).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la prevalencia de seis virus: SMV, CMV, CABMV, PFYMV, GBVA, begomovirus que, con excepción del último, han sido previamente reportados afectando gulupa en Colombia sobre diferentes tipos de muestras obtenidas en cultivos en producción (sintomáticas y asintomáticas) y material de siembra (plántulas y brotes de semillas) del departamento de Antioquia (Colombia). Los resultados de las pruebas moleculares de RT-qPCR indicaron la infección de los virus de ARN: SMV (SI=33,3% y AS=20%), CMV (SI=13,3% y AS=6,6%) y PFYMV (SI=26,6% y AS=46,6%) tanto en material con síntomas asociados a enfermedades virales (i.e. mosaicos, verdeamiento de venas, deformación foliar, etc) como en aquellas muestras asintomáticas; mientras que el badnavirus GBVA se detectó con pruebas de PCR convencional en niveles del 26,6% y 20%, respectivamente. Estos valores de prevalencia resultan muy preocupantes para los programas de expansión del cultivo de gulupa en esta región de Colombia, pues indican el establecimiento del potyvirus SMV en el oriente de Antioquia, en donde hasta hace pocos años su presencia no se había reportado. Considerando que los efectos de la infección del SMV resultan devastadores para la producción comercial de este frutal, tal como se ha observado en la subregión del suroeste de Antioquia, en donde la prevalencia del virus supera el 60% y se reporta el abandono y/o el desplazamiento de muchos cultivos a otras zonas por efecto de esta enfermedad viral, deberían tomarse medidas cuarentenarias efectivas para impedir su expansión hacia nuevas regiones productoras de gulupa. Por otra parte, la detección del PFYMV en niveles de prevalencia tan altos como el 46,6% en muestras asintomáticas de gulupa en producción, no resulta sorprendente, pues Jaramillo et al. (2019) habían demostrado que este virus se presenta de manera generalizada en esta zona de Antioquia; aunque hasta el momento se desconocen sus efectos individuales sobre la longevidad de los cultivos, calidad de los frutos o disminución en los rendimientos de este frutal. El PFYMV fue inicialmente reportado en cultivos de maracuyá en el estado de Río de Janeiro (Brasil) con síntomas de mosaicos amarillos, deformación foliar y amarillamiento de venas (Crestani et al., 1986) y posteriormente registrado en plantaciones de este mismo hospedante en diferentes departamentos de Colombia (Morales et al., 2002). La confirmación que se realiza en el presente estudio de su alta prevalencia en cultivos de gulupa en Antioquia,

reafirma la necesidad de emprender evaluaciones biológicas que conduzcan a determinar con detalle sus efectos sobre la producción de gulupa, así como evaluar sus mecanismos de transmisión y posibles hospedantes alternos, como base para el planteamiento de recomendaciones de manejo que eviten su dispersión en el país.

Para el caso del cucumovirus CMV, aunque sus niveles de prevalencia fueron inferiores al 13,3% en plantas en producción, su detección en este estudio representa el primer registro formal de este virus sobre gulupa en Antioquia. Este reporte se suma al realizado por Camelo (2010) en el departamento de Cundinamarca, en donde utilizando pruebas de RT-PCR convencional encontró infección por CMV en 20 de 34 muestras de gulupa evaluadas en este departamento. La susceptibilidad de *P. edulis* a este cucumovirus ha sido reportada desde hace varias décadas (Colariccio et al., 1987; Kitajima, 2020) e incluso se ha postulado que su infección mixta con el CABMV induce mayores niveles de enfermedad en maracuyá, especialmente en lo referente al síntoma específico de endurecimiento de los frutos (Colariccio et al., 2018). Sin embargo, el efecto individual del CMV en los cultivos de passifloras generalmente es marginal, pues es frecuente que las plantas se recuperen rápidamente luego de su infección (Kitajima et al., 2018).

La detección del GBVA tanto en muestras sintomáticas como asintomáticas de gulupa, confirma la ocurrencia de esta nueva especie de badnavirus en este cultivo en Colombia y plantea la necesidad de evaluar su importancia económica, métodos de transmisión y niveles de variación intraespecífica con premura. El GBVA fue recientemente reportado por Sepúlveda et al. (2020) en plantas asintomáticas de gulupa obtenidas en el oriente de Antioquia y confirmada su naturaleza episomal mediante el uso de la técnica de RCA. La posibilidad de que este virus se integre en el genoma del hospedante también fue planteada en dicho estudio, por lo que dicha hipótesis requiere ser evaluada con prontitud, ya que esto representaría un gran reto para la generación de plantas certificadas de gulupa derivadas de cultivo *in vitro*, tal como ocurre en algunas variedades de musáceas con la problemática derivada de la integración del Banana streak virus (BSV) (Bhat et al., 2016).

De otra parte, la detección de estos cuatro virus en brotes derivados de semillas sexuales de gulupa con valores que alcanzaron niveles de hasta el 86,6% para PFYMV, 53,3% para GBVA, 40% para SMV y 13,3% para CMV conducen a plantear la hipótesis que la

transmisión vertical de dichos virus juega un papel fundamental en la epidemiología de las enfermedades que causan éstos en el cultivo de gulupa y que por tanto la generación de semilla certificada por su sanidad viral, resulta en una tarea prioritaria para la producción tecnificada de este frutal. Trabajos previos habían encontrado altos valores de prevalencia del SMV en semillas de gulupa (95%) (Jaramillo et al., 2018). Adicionalmente, se conoce que este virus es transmitido de manera eficiente por este medio en soya, demostrándose incluso que el SMV podría infectar todas las partes de las semillas incluyendo los embriones (Domier et al., 2011). Así mismo, la detección en semillas del PFYMV con tan altos niveles de prevalencia, plantea la posibilidad de que también dicho virus presente transmisión vertical en gulupa, una situación que no sería excepcional por cuanto la transmisión por semilla se ha documentado para diferentes tymovirus (i.e. Turnip yellow mosaic virus, Eggplant mosaic virus y Dulcamara mottle virus) (King et al., 2012). Una situación similar ocurre con el CMV, pues se ha encontrado su transmisión por semilla en cultivos tan diversos como frijol, pimentón o espinaca (Ali y Kobayashi, 2010). Finalmente, la detección del GBVA en 53,3% de semillas de gulupa plantea su transmisión vertical, tal como se ha reportado para otros badnavirus como el Cacao swollen shoot virus (CSSV), Taro bacilliform virus (TaBV) y Kalanchoe top-spotting virus (KTSV), en donde la eficiencia de transmisión por este medio alcanza valores del 40% (Bhat et al., 2016). Aunque la transmisión vertical de estos cuatro virus en gulupa deberá ser confirmada mediante la realización de pruebas biológicas, los resultados de detección molecular obtenidos en el presente estudio permiten plantear que el movimiento de material de siembra (semillas y plántulas) juega un papel clave en su dispersión entre las regiones productoras de gulupa de Colombia y por tanto los gremios de productores, agricultores y organismos de sanidad vegetal estatal deberían tomar todas las medidas preventivas para evitar esta situación.

Este trabajo fue complementado con el uso de HTS para obtener información sobre los genomas de los virus más prevalentes en gulupa en el Oriente de Antioquia, lográndose ensamblar los genomas completos del SMV (9.608 nt), PFYMV (6.088 nt) y GBVA (6.951 nt). Al realizar comparaciones con las secuencias previamente reportadas para estos virus, se encontró que compartían niveles superiores al 97% con respecto a los genomas de aislamientos obtenidos en Antioquia, lo que permite afianzar la información disponible para el diseño de pruebas específicas de detección molecular al servicio del sector

fruticultor del país. El hallazgo de estos virus en cultivos de gulupa de Colombia, hace parte de las más de 20 especies de virus que se han encontrado en el mundo infectando *P. edulis* (Fisher y Rezende 2008; Jaramillo et al., 2019; Liberato and Zerbini, 2020), y la confirmación de las secuencias de sus genomas se une al número creciente de virus caracterizados a partir de análisis de HTS y otras técnicas moleculares actuales, tal como es el caso del Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) (*Polerovirus*, *Luteoviridae*) asociado a infecciones mixtas con el CABMV en cultivos de maracuyá en Bahia (Brasil) (Vidal et al., 2018); el Passion fruit chlorotic mottle virus (PCMoV) y Melochia yellow mosaic virus (MeLYMV) (*Begomovirus*, *Geminiviridae*) descubiertos en el Estado de Mato Grosso do Sul (Brasil) (Fontenele et al. 2018; Spadotti et al. 2019), el Passion fruit leaf distortion virus (PLDV) (*Begomovirus*, *Geminiviridae*) encontrado en cultivos de maracuyá en el Valle del Cauca (Colombia) (Vaca-Vaca et al. 2017) y la descripción del *Passiflora edulis* symptomless virus (PeSV) (*Roymovirus*, *Potyviridae*) en la variedad “Passion Dream”, un genotipo local de *P. edulis* cultivado en Israel (Jover-Gil et al. 2018).

La información generada en este trabajo y en otros estudios recientes adelantados sobre los virus que infectan gulupa en Colombia, plantean la necesidad de establecer programas de manejo integrado de enfermedades virales apoyados en la utilización de métodos de diagnóstico molecular como los aquí descritos y en los que la generación de semilla certificada y la limitación al movimiento de plántulas entre regiones de cultivo debe ser pilares fundamentales.

CONCLUSIONES

Mediante pruebas moleculares de RT-qPCR se detectó la infección de los virus de ARN: SMV, CMV y PFYMV en plantas asintomáticas y sintomáticas de gulupa obtenidas en el oriente de Antioquia (Colombia) con niveles superiores al 20% para el SMV y PFYMV. Así mismo, utilizando PCR convencional se encontró la nueva especie de badnavirus GBVA en dichas muestras, con niveles de prevalencia del 26,6% y 20% para el material sintomático y asintomático de gulupa, respectivamente.

En evaluaciones realizadas en materiales de siembra de gulupa (plántulas y semillas sexuales) comercializados en esta región del oriente de Antioquia, se detectó la infección de los virus SMV, PFYMV y GBVA en muy altos niveles de prevalencia, lo que puede ser

un indicativo de que dichos materiales juegan un papel importante en la transmisión de estos virus en este frutal.

Utilizando secuenciación masiva de nueva generación (HTS) de grupos de muestras de tejidos foliares de gulupa, se obtuvieron las secuencias completas de los virus SMV, PFYMV y GBVA, confirmándose que sus genotipos presentan altos niveles de identidad (>97%) con respecto a las secuencias de aislamientos colombianos previamente depositadas en GenBank.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías del Departamento de Antioquia (Proyecto 1101-805-62786, Convenio No. 4600007658-779) y realizado con la participación de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Universidad CES y Caribbean Exotics. El proyecto fue supervisado por la Secretaria de Agricultura de Antioquia y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia. Las muestras biológicas fueron obtenidas bajo la Resolución 0209 del 9 de Marzo de 2020 del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia.

LITERATURA CITADA

Agronet. 2020. Área, producción y rendimiento de Gulupa en Colombia. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> (Consulta del 15/11/2021).

Ali, A. y M. Kobayashi. 2010. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods* 163(2): 234-237.

Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov, V.M. Lesin, S.I. Nikolenko, S. Pham, A.D. Prjibelski, A.V. Pyshkin, A.V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M.A. Alekseyev y P.A. Pevzner. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455-477.

Bhat, A.I., T. Hohn y R. Selvarajan. 2016. Badnaviruses: The current global scenario. *Viruses* 8(6): 177.

Boratyn, G.M., D. Thierry-Mieg, B. Busby y T.L. Madden. 2019. Magic-BLAST, an accurate DNA and RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics* 20: 405.

Camelo, V.M. 2010. Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región del Sumapaz (Cundinamarca). Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 60 p.

Chomczynski, P. y N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-159.

Chong, Y.H., Y.H. Cheng, H.W. Cheng, Y.C. Huang y S.D. Yeh. 2018. The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as East Asian passiflora virus. *Journal of General Plant Pathology* 84: 208-220.

Colariccio A., C.M. Chagas, M.K. Mizuki, J. Vega y E. Cereda. 1987. Infecção natural do maracujá amarelo pelo vírus do mosaico do pepino no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 12: 254-257.

Colariccio, A., R.M. Garcêz, L.K. Rodrigues, M. Eiras, L.A.M. Peruch y A.L.R. Chaves. 2018. Doenças causadas por vírus na cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis*). In: Peruch, L.A.M. y A.L. Schroeder (eds.). *Maracujazeiro-azedo: polinização, pragas e doenças*. EPAGRI. Florianópolis. pp.171-202.

Crestani, O.A., E.W. Kitajima, M.T. Lin y V.L.A. Marinho. 1986. Passion fruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathology* 76: 951-955.

Cuspoca, J. 2007. Evaluación de virus de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 31 p.

Cutler, J., J. Langer, S. Von Bargen, O. Acosta-Losada, F. Casierra-Posada, A. Castañeda-Cárdenas, M. Betancourt-Vásquez, W. Cuellar, E. Arvydas-Stasiukynas, D. Altenbach y C. Büttner. 2018. Preliminary evaluation of associated viruses in production

systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12(2): 390-396.

Domier, L.L., H.A. Hobbs, N.K. Mccoppin, C.R. Bowen, T.A. Steinlage, S. Chang, Y. Wang y G.L. Hartman. 2011. Multiple loci condition seed transmission of Soybean mosaic virus in soybean. *Phytopathology*. 101: 750-756.

Doyle, J. 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G.M., A.W.B. Johnston y J.P.W. Young (eds.). *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer. Heidelberg. pp. 283-293.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.

Feng, J.L., S.N. Chen, X.S. Tang, X.F. Ding, Z.Y. Du y J.S. Chen. 2006. Quantitative determination of cucumber mosaic virus genome RNAs in virions by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38(10): 669-676.

Fischer, I.H. y J.A.M. Rezende. 2008. Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technology* 2(1): 1-19.

Fontenele, R.S., R.A. Abreu, N.S. Lamas, D.M.T. Alves-Freitas, A.H. Vidal, R.R. Poppiel, F.L. Melo, C. Lacorte, D.P. Martin, M.A. Campos, A. Varsani y S.G. Ribeiro. 2018. Passion fruit chlorotic mottle virus: molecular characterization of a new divergent geminivirus in Brazil. *Viruses* 10(4): E169.

Fribourg, C., R. Koenig y D. Lesemann. 1987. A new tobamovirus from *Passiflora edulis* in Peru. *Phytopathology* 77: 486-491.

Gao, L., X. Ding, K. Li, W. Liao, Y. Zhong, R. Ren, Z. Liu, K. Adhimoolam y H. Zhi. 2015. Characterization of Soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 128: 1489-1505.

Gillaspie, A.G., G. Pio-Ribeiro, G.P. Andrade y H.R. Pappu. 2001. RT-PCR detection of seedborne Cowpea aphid-borne mosaic virus in peanut. *Plant Disease* 85: 1181-1182.

Gish, W. y D.J. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3(3): 266-272.

Gordillo, L.A. 2011. Incidencia del Soybean mosaic virus en cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 106 p.

Gutiérrez, P., A. Rivillas, D. Tejada, S. Giraldo, A. Restrepo, M. Ospina, S. Cadavid, Y. Gallo y M. Marín. 2021. PVDP: A portable open source pipeline for detection of plant viruses in RNAseq data. A case study on potato viruses in Antioquia (Colombia). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 113: 101604.

Jaramillo, H., M. Marín y P. Gutiérrez P. 2018. Molecular characterization of Soybean mosaic virus (SMV) infecting Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia, Colombia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 51(11-12): 617-636.

Jaramillo, H., M. Marín y P. Gutiérrez. 2019. Complete genome sequence of a Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 72(1): 8643-8654.

Joy, P.P. y C.G. Sherin. 2016. Diseases of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) and their management. In: Kumar, A. y P. Mall (Eds.). *Insect Pests Management of Fruit Crops*. Biotech. New Delhi. pp. 453-470.

Joshi, N.A. y J.N. Fass. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. (Version 1.33) [Software]. <https://github.com/najoshi/sickle>. (consulta del 20/03/2021).

Jover-Gil, S., A. Beeri, P. Fresnillo, A. Samach y H. Candela. 2018. Complete genome sequence of a novel virus, classifiable within the Potyviridae family, which infects passion fruit (*Passiflora edulis*). *Archives of Virology* 163(11): 3191-3194.

Kitajima. 2020. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). *Biota Neotropica* 20(2): e20190932.

King, A.M.Q. 2012. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press. San Diego.

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz y K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547-1549.

Liberato, J.R. y F.M. Zerbini. 2020. Diseases of Passionfruit (*Passiflora* spp.). <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Passionfruit.aspx>; (consulta del 18/09/2020).

Manicom, B., C. Ruggiero, R.C. Ploetz y A. Goes. 2003. Diseases of passion fruit. In: Ploetz, R.C. (eds.). *Diseases of tropical fruit crops*. CAB international. London. pp. 413-441.

Melgarejo, L.M. 2019. Gulupa (*Passiflora edulis*), curuba (*Passiflora tripartita*), aguacate (*Persea americana*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) Innovaciones. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Morales, F.J., I. Lozano, M. Castaño, J. Arroyave, A.C. Velasco y F. Varón. 2002. Partial characterization of a tymovirus infecting passion fruit in Colombia, South America. *Journal of Phytopathology* 150(4-5): 292-296.

Nascimento, A.V., E.N. Santana, A.S. Braz, P.F. Alfenas, G. Pio-Ribeiro, G.P. Andrade, M.G. de Carvalho y F. Murilo-Zerbini. 2006. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Archives of Virology* 151: 1797-1809.

Nakasato, K., S. Fujioka, Y. Sugawara, T. Ono, T. Nishio y S. Tsuda. 2020. First detection of two potyviruses, uraria mosaic virus and passiflora mosaic virus Y, from passionfruit in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 86: 401-404.

Ortiz, E. y L. Hoyos. 2012. Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 6(1): 110-116.

Parrella, G. y D. Sorrentino. 2009. Identification of a Cucumber mosaic virus isolate from *Passiflora edulis* in Southern Italy and Validation of Subgroup Identification by In Silico Restriction Fragment Length Polymorphism. *Journal of Phytopathology* 157: 762-767.

Ramos-González, P.L., G.F. Dos Santos, C. Chabi-Jesus, R. Harakava, E.W. Kitajima y J. Freitas-Astúa. 2020. Passion Fruit Green Spot Virus Genome Harbors a New Orphan ORF and Highlights the Flexibility of the 5'-End of the RNA2 Segment Across Cileviruses. *Frontiers in Microbiology*. 14(11): 206.

Robinson, J.T., H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E.S. Lander, G. Getz y J.P. Mesirov. 2011. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* 29(1): 24-26.

Rojas, M.R., R.L. Giltberson, D.R. Rusell y D.P. Mawell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77(4): 340-347.

Sepúlveda, M. 2020. Identificación molecular de virus que infectan gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en cultivos asintomáticos y material de siembra en Antioquia. Tesis Ingeniería Biológica. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 26 p.

Spadotti, D.M.A., V.H. Bello, G.M. Favara, O.S. Stangarlin, R. Krause-Sakate, J.A.M. Rezende. 2019. *Passiflora edulis*: new natural host of Melochia yellow mosaic virus in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 14: 23.

Vaca-Vaca, J.C., E.C. Carrasco-Lozano y K. López-López. 2017. Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. *Archives of Virology* 162(2): 573-576.

Valverde, R., S. Nameth y R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.

Vidal, A.H., M.M. Sanches, D.M.T. Alves-Freitas, E.F.M. Abreu, C. Lacorte, B. Pinheiro-Lima, R.C.C. Rosa, O.N. Jesus, M.A. Campos, A. Varsani y S.G. Ribeiro. 2018. First World Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus infecting Passionfruit. *Plant Disease* 102(12): 2665.

Xanthis, C.K., V.I. Maliogka, H. Lecoq, C. Dezbiez, I. Tsvetkov, N.I. Katis. 2015. First report of cucumber mosaic virus infecting watermelon in Greece and Bulgaria. *Journal of Plant Pathology* 97(2): 391-403.

Zhang, S., T. Zhao, J. Liu, L. Zi, X. Li, Y. Wang, Z. Zhang, D. Li, J. Yu y C. Han. 2020. First Report of Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus in Passion Fruit Plants Exhibiting Mosaic and Mottling in China. *Plant Disease* 104(2): 601.

Cuadro 1. Lista de primers utilizados en este estudio para la detección de virus en gulupa.

Virus	Primers	Secuencia	Fuente
PFYMV	Tymo_F_CP	5' AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG 3'	Jaramillo et al. (2019)
	qTymo_R_CP	5' GCG ACG AGA GAG GTG AGT CG 3'	
SMV	SMV_qRT-F	5' CAGATGGGCGTGGTTATGA 3'	Gao et al. (2015)
	SMV_qRT-R	5' ACA ATG GGT TTC AGC GGA TA 3'	
CMV	CMV-R	5' CGA CTT CAA CAG GCG AGC 3'	Cuspoca (2007)
	CMVdo1244b	5' TGC TCR AYG TCR ACA TGA AG 3'	Xanthis et al. (2015)
	CMV_qRT_R	5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3'	Feng et al. (2006)
CABMV	CABMV_F	5' CGC TCA AAC CCA TTG TAG AA 3'	Gillaspie et al. (2001)

	CABMV_R	5' TAT TGC TTC CCT TGC TCT TTC 3'	
Badnavirus	GBVA_RT_F	5' GCA AAA GCA GAC ACC GAA CC 3'	Sepúlveda et al. (2020)
	GBVA_RT_R	5' TGT ATC TCT GCG TCT ATG GTG G 3'	
Begomovirus (Componente A)	PAL1v1978	5' GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT YCC NGT 3'	Rojas et al. (1993)
	PAR1c496	5' AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG 3'	
Begomovirus (Componente B)	PVL1v2040	5' GCC TCT GCA GCA RTG RTC RAT CTT CAT ACA 3'	Rojas et al. (1993)
	PCRc1	5' CTA GCT GCA GCA TAT TTA CRA RWA TGC CA 3'	

A. Anexos: Capítulo 1

Anexo A-1: Muestras de *Passiflora edulis* f. *edulis* (PE) evaluadas indicando el origen, código de la muestra, concentración de RNA y los valores de Tm y Ct para los virus SMV, CABMV, CMV y PFYMV.

Municipio - Finca	Muestra	Concentración RNA (ng/μl)	SMV		CABMV		CMV		PFYMV	
			Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct
PLANTAS EN PRODUCCIÓN ASINTOMÁTICAS										
Sonsón	PE24	1719,0	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
Sonsón	PE25	1569,6	-	>35	-	>35	-	>35	83,0	24,66
Sonsón	PE26	970,1	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
Sonsón	PE27	1903,8	-	>35	-	>35	-	>35	84,8	27,20
San Vicente Ferrer	PE28	1312,4	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	23,88
San Vicente Ferrer	PE29	1902,5	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	23,81
San Vicente Ferrer	PE30	1383,4	-	>35	-	>35	-	>35	85,3	21,10
San Vicente Ferrer	PE31	898,7	-	>35	-	>35	-	>35	83,3	25,83
Marinilla	PE48	2809,6	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	28,81
Sonsón	PE52	2269,5	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
Marinilla	PE62	486,1	-	>35	-	>35	82,3	17,44	-	>35
L.V.S	PE65	1024,3	81,2	33,35	-	>35	-	>35	-	>35
L.V.S	PE67	701,3	80,5	34,61	-	>35	-	>35	-	>35
La Esperanza	PE69	964,7	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
La Bendición	PE71	769,9	81,3	33,65	-	>35	-	>35	-	>35
PLANTAS EN PRODUCCIÓN SINTOMÁTICAS										
Sonsón	PE33	1223,9	80,0	12,57	-	>35	-	>35	-	>35
Sonsón	PE34	1735,1	-	>35	-	>35	-	>35	84,7	26,53
Sonsón	PE35	3354,0	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35

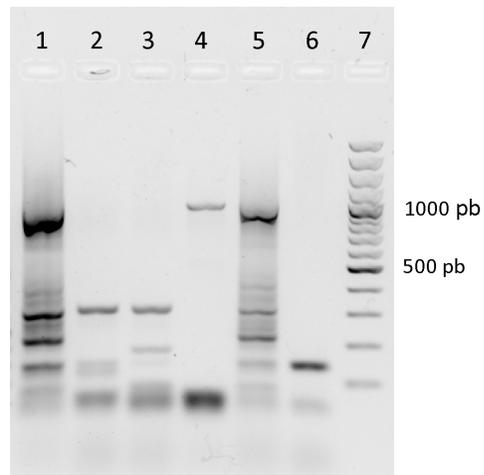
Municipio - Finca	Muestra	Concentración RNA (ng/μl)	SMV		CABM V		CMV		PFYM V	
			Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct
Sonsón	PE36	1193,6	80,0	20,54	-	>35	-	>35	-	>35
San Vicente Ferrer	PE37	738,3	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	23,94
San Vicente Ferrer	PE38	1558,3	-	>35	-	>35	-	>35	87,0	10,56
San Vicente Ferrer	PE39	2024,1	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	23,96
San Vicente Ferrer	PE40	1020,6	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	23,02
Marinilla	PE47	7578,4	80,3	33,81	-	>35	-	>35	-	>35
Sonsón	PE51	2977,2	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
Marinilla	PE61	367,0	-	>35	-	>35	82,0	17,49	-	>35
L.V.S	PE66	956,2	81,0	33,01	-	>35	81,3	19,36	-	>35
L.V.S	PE68	751,3	81,2	32,06	-	>35	-	>35	-	>35
La Esperanza	PE70	1140,1	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
La Bendición	PE72	3041,6	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
PLÁNTULAS										
Marinilla	PE63	2058,7	-	>35	-	>35	-	>35	86,1	19,52
Marinilla	PE64	1437,6	-	>35	-	>35	-	>35	85,5	20,83
Envigado	PE74	1094,5	82,0	33,21	-	>35	-	>35	-	>35
Envigado	PE75	734,8	81,0	31,61	-	>35	-	>35	-	>35
Biopass	PE76	905,9	81,3	32,59	-	>35	-	>35	-	>35
Biopass	PE77	4486,1	81,3	30,91	-	>35	-	>35	-	>35
La Bendición	PE93	2055,0	81,2	30,16	-	>35	-	>35	83,8	34,26
La Bendición	PE94	4959,6	81,2	28,10	-	>35	-	>35	-	>35
La Bendición	PE95	2228,5	81,5	27,83	-	>35	-	>35	-	>35

Anexo A-1: (Continuación)**Anexo A-1:** (Continuación)

Municipio - Finca	Muestra	Concentración RNA (ng/ μ l)	SMV		CABM V		CMV		PFYM V	
			Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct
La Bendición	PE96	2210,4	81,2	30,49	-	>35	-	>35	84,7	30,50
Yarumal	PE97	1569,7	81,3	28,95	-	>35	-	>35	85,2	29,47
Yarumal	PE98	2285,9	81,0	34,04	-	>35	-	>35	84,5	34,36
Yarumal	PE99	5281,9	81,5	30,34	-	>35	-	>35	84,0	33,13
Yarumal	PE100	921,8	81,3	30,16	-	>35	-	>35	85,2	28,33
Biopass	PE102	2462,3	81,5	30,32	-	>35	-	>35	84,7	29,08
BROTOS DE SEMILLA										
Belén 1	PE78	2554,5	-	>35	-	>35	-	>35	85,3	28,95
Bello	PE79	1988,9	-	>35	-	>35	-	>35	85,0	26,86
Belén 2	PE80	1144,3	-	>35	-	>35	82,2	24,78	84,7	29,08
Minorista	PE81	1076,6	-	>35	-	>35	81,3	25,17	84,8	28,04
Colombia	PE82	3448,5	80,7	31,05	-	>35	-	>35	84,5	28,47
La Esquina	PE83	1329,5	-	>35	-	>35	-	>35	85,0	31,22
R.G	PE84	3354,8	80,8	31,68	-	>35	-	>35	84,8	30,37
Plaza de Flores	PE85	1546,1	-	>35	-	>35	-	>35	85,0	29,71
La Esquina	PE86	3539,4	81,2	28,02	-	>35	-	>35	84,5	33,56
Poblado	PE87	901,5	81,7	30,80	-	>35	-	>35	84,7	29,02
Plaza de Envigado	PE88	2439,9	80,3	31,47	-	>35	-	>35	84,3	28,69

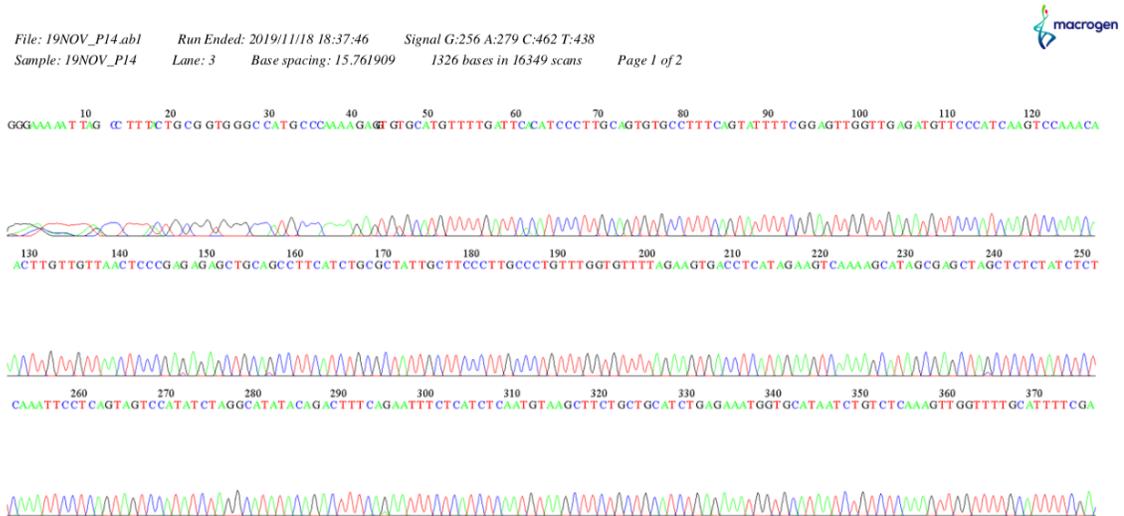
Envigado	PE89	1699,5	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
S.P.	PE90	1875,0	-	>35	-	>35	-	>35	84.5	31,15
Distrifrutas	PE91	2069,7	-	>35	-	>35	-	>35	85.7	27,88
Z.G.	PE92	1883,0	81,5	26,59	-	>35	-	>35	-	>35

Anexo A-2: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-PCR del gen de cápside de SMV (991 pb) en muestras de plantas sintomáticas de gulupa de Sonsón y Marinilla (carriles 2 al 4). Primers: CP_F_SMV (5'- GCT YGC TTC GTC YGG AAA AG-3') y CP_R_SMV (5'- GCG ACC CGA AAT GAT AAC TG-3'). Los carriles 5 y 6 corresponden al control positivo y negativo respectivamente. Las muestras fueron posteriormente purificadas para secuenciación Sanger.

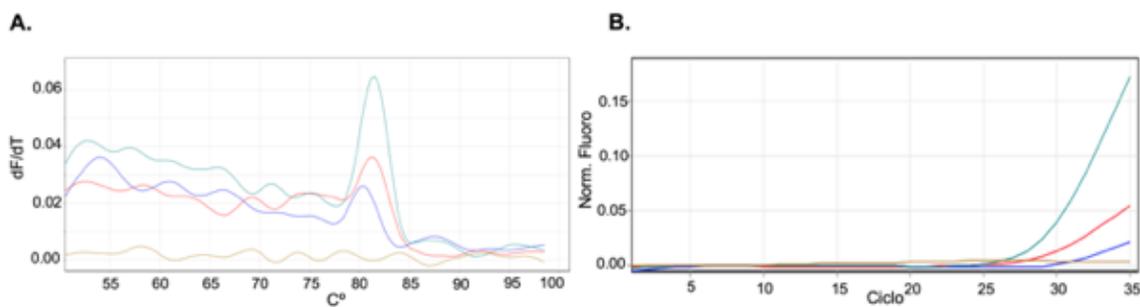


- *Soybean mosaic virus (SMV)*

Anexo A-3: Electroferograma de un amplicón de RT-PCR del gen de la cápside de SMV (991 pb), obtenido por el método de secuenciación de Sanger utilizando los primers CP_F_SMV (5'- GCT YGC TTC GTC YGG AAA AG-3') y CP_R_SMV (5'- GCG ACC CGA AAT GAT AAC TG-3').

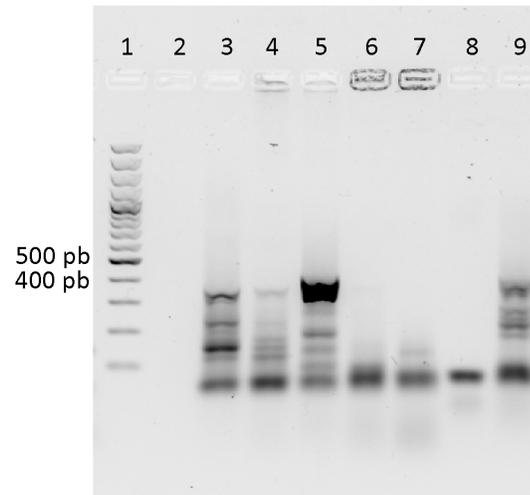


Anexo A-4: Detección molecular de SMV a partir de material de siembra de gulupa del oriente antioqueño, mediante RT-qPCR. (A). Curvas de melting de $81 \pm 1^\circ\text{C}$. Primers: SMV_qRT_F (5´ CAG ATG GGC GTG GTT ATG A 3´) y SMV_qRT_R (5´ ACA ATG GGT TTC AGC GGA TA 3´) B. Curvas de amplificación.



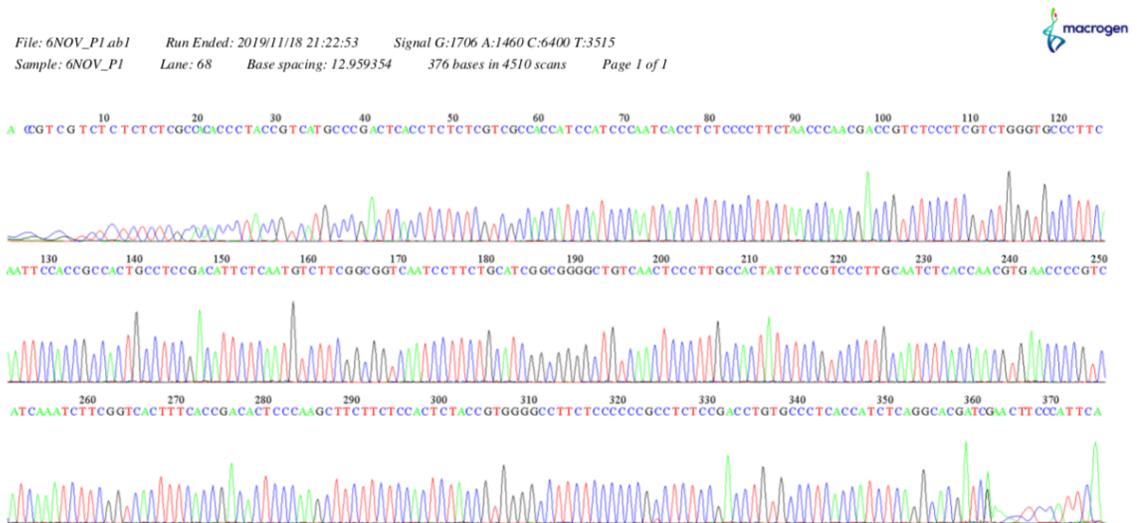
Anexo A-5: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-PCR del gen de cápside de PFYMV (~400 pb) en muestras de plantas en producción asintomáticas y sintomáticas de gulupa de San Vicente de Ferrer (carriles 3 al 7). Primers: Tymo_F_CP (5'- AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG -3') y Tymo_R_CP (5'- GAA TGG AGT TCG ATC

GTG C-3'). Los carriles 8 y 9 corresponden al control negativo y positivo, respectivamente. Las muestras fueron posteriormente purificadas para secuenciación Sanger.

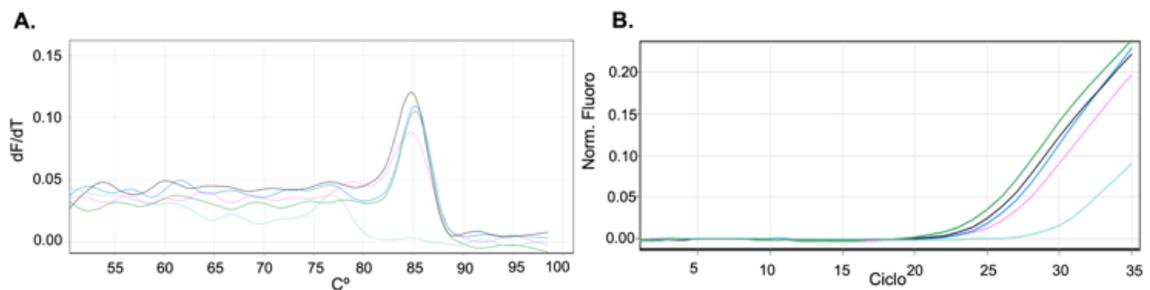


- *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV)

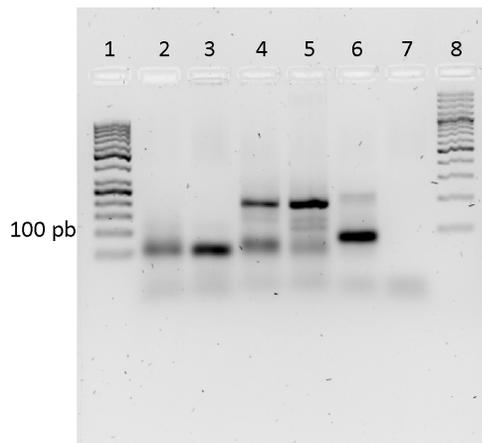
Anexo A-6: Electroferograma de un amplicón de RT-PCR del gen de la cápside de PFYMV (~400 pb), obtenido por el método de secuenciación de Sanger utilizando los primers Tymo_F_CP (5'- AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG -3') y Tymo_R_CP (5'- GAA TGG AGT TCG ATC GTG C-3').



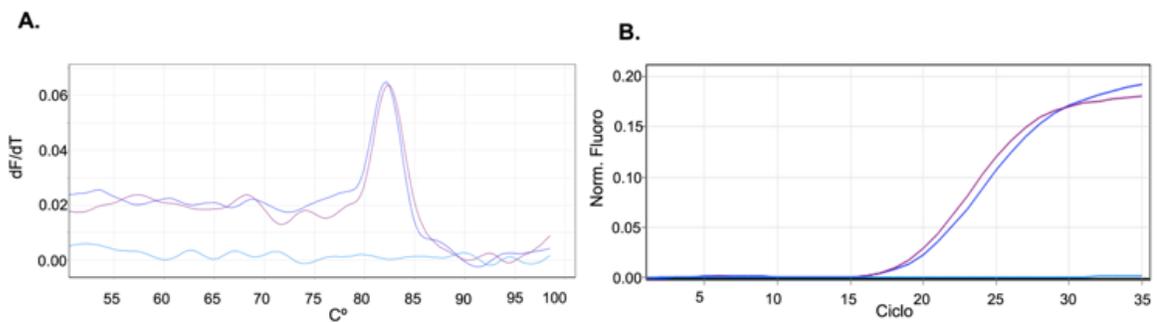
Anexo A-7: Detección molecular de PFYMV a partir de tejido foliar de gulupa del oriente antioqueño, mediante RT-qPCR. (A). Curvas de melting de $84.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Primers: Tymo_F_CP (5'- AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG -3') y qTymo_R_CP (5' GCG ACG AGA GAG GTG AGT CG 3') B. Curvas de amplificación.



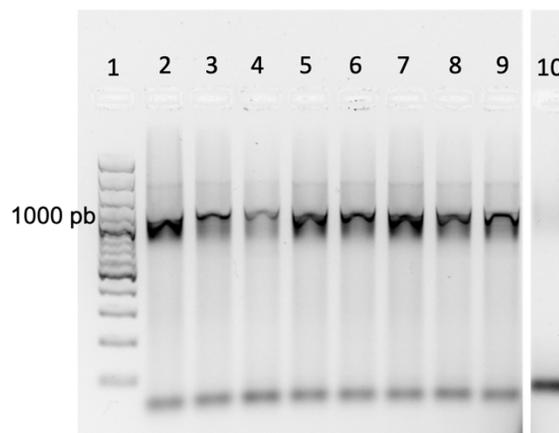
Anexo A-8: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-qPCR para CMV (90 pb) en muestras de plantas en producción asintomáticas y sintomáticas de gulupa de Marinilla (carriles 2 a 5). Primers: (CMV_qRT_F (5'- CGT TGC CGC TAT CTC TGC TAT-3') y CMV_qRT_R (5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3')). Los carriles 6 y 7 corresponden al control positivo y negativo, respectivamente. Las muestras fueron posteriormente purificadas para secuenciación Sanger.



Anexo A-9: Detección molecular de CMV a partir de tejido foliar de gulupa del oriente antioqueño, mediante RT-qPCR. (A). Curvas de melting de $81,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Primers: CMV_qRT_F (5'- CGT TGC CGC TAT CTC TGC TAT-3') y CMV_qRT_R (5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3') B. Curvas de amplificación.



Anexo A-10: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por PCR del gen de cápside de GBVA (979 pb) en brotes de semilla de gulupa del oriente de Antioquia (carriles 2 al 9). Primers: GBVA_RT_F (5' GCA AAA GCA GAC ACC GAA CC 3') y GBVA_RT_R (5' TGT ATC TCT GCG TCT ATG GTG G 3'). El carril 10 corresponde al control negativo. Las muestras fueron posteriormente purificadas para secuenciación Sanger.



- *Gulupa Bacilliform virus A* (GBVA)

Anexo A-11: Electroferograma de un amplicón de RT-PCR del gen de la cápside de GBVA (979 pb), obtenido por el método de secuenciación de Sanger utilizando los primers GBVA_RT_F (5' GCA AAA GCA GAC ACC GAA CC 3') y GBVA_RT_R (5' TGT ATC TCT GCG TCT ATG GTG G 3').

File: 58OCT_P41.ab1 Run Ended: 2020/10/20 21:46:25 Signal G:209 A:261 C:242 T:218
Sample: 58OCT_P41 Lane: 66 Base spacing: 15.667362 1398 bases in 15729 scans Page 1 of 2



T C A G G A G G A C A G G A T C T C T G G T A C A C A T G C G A C C C T G A A C T G A A G G A G T C A A A G A A A G A A G A T T G G T C G G C C A C T A C C G G A C T C T G A T G G C T A C C C C T A T C A G A C C A A T A C T C C



C T T C C T G G G A T A A A T A C A A T T A T C C A A G G A T A G G A C A C G C G A C C A T A T T T C A A A G T T T G A C T G A A G A G T G G G T T C C A C C A A G T G G C T A T G G C C G A A G A A A G C A T A C C A T G G A C A G C A



T T T A T C A C C C A G A A G G A T T A T A T G A A T G G C T T G T A A T G C C A T T T G G A C T G A A G A A T G C A C C A G C A A T A T T C C A A A A A A G A T G G A T A A C T G T T T C A G G G A T T G C G A A G G A T T C A T C G C A G T



Capítulo 2.

Viruses infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Southwestern Antioquia (Colombia)

Manuscrito preparado en el formato de la revista:

Archives of Phytopathology and Plant Protection (ISSN 0323-5408)

Daniela Cardona

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: dcardonam@unal.edu.co

Mónica Higueta

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: mmhiguit@unal.edu.co

Jaime Posada

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: jposadar@unal.edu.co

Yuliana Gallo

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

Pablo A. Gutiérrez

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

Mauricio Marín

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: mamarinm@unal.edu.co (*Corresponding author)

ABSTRACT

Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) is one of the most important fruit crops in Colombia, but unfortunately, viral diseases have started to affect the productivity and quality of fruits. Five viruses are known to infect purple passion fruit in Colombia: soybean mosaic virus (SMV), cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV), cucumber mosaic virus (CMV), and gulupa bacilliform virus A (GBVA), a tentative new badnavirus species. In addition, passion fruit leaf distortion virus (PLDV), a new begomovirus identified in yellow passion fruit (*P.edulis* f. *flavicarpa*) might pose a risk to purple passion fruit in the future. Here, we investigated the prevalence of these viruses in adult plants and planting material from southwestern Antioquia using a combination of PCR-based methods and high-throughput sequencing. Our results suggest a high prevalence (>90%) of PFYMV and GVBA in all tested samples, low prevalence (<20%) of SMV, and the presence of CMV in plantlets and asymptomatic plants at 40% and 10% prevalence. Partial genome sequences for SMV, PFYMV, and GVBA variants circulating in this region were also obtained.

Keywords: high-throughput sequencing; Passifloraceae; RT-qPCR; virus detection

1. Introduction

Despite the high international demand and good market prices for purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*), little attention has been paid by Colombian farmers to the sanitary status of planting material regarding viral diseases. In recent years, the cultivation of purple passion fruit has experienced a rapid expansion in cultivated area from 650 ha in 2015 to 1495 ha in 2019 that has resulted in the constant and informal

distribution of planting material across different regions; this situation can be an important contributing factor to the introduction and dispersal of new viral pathogens (Agronet, 2021; Jaramillo et al., 2018; Sepúlveda et al., 2021). For a long time, viruses were not considered a serious threat to purple passion fruit in Colombia, however, these diseases are becoming more conspicuous all over the country and may reach epidemic levels if adequate measures are not taken (Jaramillo et al., 2018, 2019; Sepúlveda et al., 2021). So far, the most important viruses affecting the purple passion fruit in Colombia are the potyviruses soybean mosaic virus (SMV) and cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), the tymovirus passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV), and the cucumovirus cucumber mosaic virus (CMV) (Camelo, 2010; Gordillo, 2011; Cutler et al., 2018; Jaramillo et al., 2018, 2019). Additionally, a recent high-throughput sequencing survey revealed the existence of a highly prevalent virus within the genus *Badnavirus*, tentatively named gulupa bacilliform virus A (GBVA) (tentative binomial name: *Badnavirus passiflorae*), for which symptoms and impact to the purple passion fruit crops are still unknown (Sepúlveda et al., 2021).

As a result of improved agronomical practices, the province of Antioquia is the largest and most efficient producer of purple passion fruit within Colombia. The average annual yield in this province is estimated at 22,2 t/ha, which is significantly higher than the national average of 16,3 t/ha (Agronet, 2021). Unfortunately, the free movement of planting material across provinces might result in the arrival of new viral pathogens such as CABMV, which has not been detected in Antioquia but has been found in the province of Cundinamarca using ELISA (Gordillo, 2011). CABMV is the causal agent of the passion fruit woodiness disease, responsible for significant economic damages in the *P. edulis* agroindustry of Brazil and several African countries as it causes fruit woodiness, reduction

in juice yields and a shorter lifespan of orchards (Gonçalves et al., 2017; Munguti et al., 2019). In addition, a new begomovirus (*Geminiviridae*) named passion fruit leaf distortion virus (PLDV) was found to infect yellow passion fruit in the province of Valle del Cauca (Colombia) (Vaca-Vaca et al., 2017); this virus is of interest as it might also infect purple passion fruit.

To prevent the spread of new viruses in Antioquia, the local purple passion agroindustry has started a program to monitor and characterize the diversity of viruses affecting this crop for the future implementation of molecular detection methods of asymptomatic stock plants, and planting material. These investigations have resulted in the complete genome sequencing of SMV isolated from southwest Antioquia (Jaramillo et al., 2018), a PFYMV isolate from the east (Jaramillo et al., 2018, 2019), the discovery of GBVA in eastern Antioquia (Sepúlveda et al., 2021), and have provided evidence that the use of apparently healthy, but uncertified, planting material might be an important factor in the dispersal of viruses. For example, testing of asymptomatic adult plants and plantlets sold by nurseries in eastern Antioquia revealed the presence of GBVA in all tested samples, PFYMV in 20% of adult plants and 10% of plantlets, and SMV in 20% of adult plants and 30% of plantlets (Sepúlveda et al., 2021). A follow-up study in the same region revealed high prevalence of PFYMV (>33%) and SMV (> 20%) in adult plants, high prevalence of SMV (40%), CMV (13.3%), PFYMV (86.6%) and GBVA (53.3%) in sprouting seeds; and significant levels of SMV (86.6%), PFYMV (60%), and GBVA (53.3%) in plantlets (Cardona et al., 2021).

To this day, virome studies of purple passion fruit have been mostly focused in production areas of eastern Antioquia, but little is known about the incidence of viruses in planting material in the southwestern part of the province. To address this gap, we have performed a molecular investigation on the prevalence of SMV, PFYMV, CMV, CABMV, GBVA and

begomovirus in symptomatic and asymptomatic adult plants from commercial fields, plantlets sold by nurseries in the region, and sexual seed obtained from ten different local providers.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

All plant material consisted of symptomatic and asymptomatic adult leaf samples, plantlets, and seeds collected at municipalities in the southwestern region of Antioquia (Colombia). Seed samples were obtained at ten different providers in the municipalities of Jardín (5°35'48.36"N, 75°49'9.7"W) and Jericó (5°47'39" N, 75°47'23"W). Plantlets were from ten nurseries in Jardín, Jericó, Urrao (6°19'0.7"N, 76°8'4.19"W), and Angelópolis (6°6'42.59"N, 75°42'38.05"W); each lot sample comprised three plantlets about one to three months of age. Samples from adult plants were collected at ten commercial plots in Jardín and Jericó and were classified as asymptomatic, or symptomatic when they exhibited symptoms typical of viral disease such as leafrolls, leaf deformation, rugose mosaics, greening of veins, and marbling spots and/or deformation in fruits. For both asymptomatic and symptomatic samples, each lot was represented by two leaves from ten randomly collected plants (Figure 1).

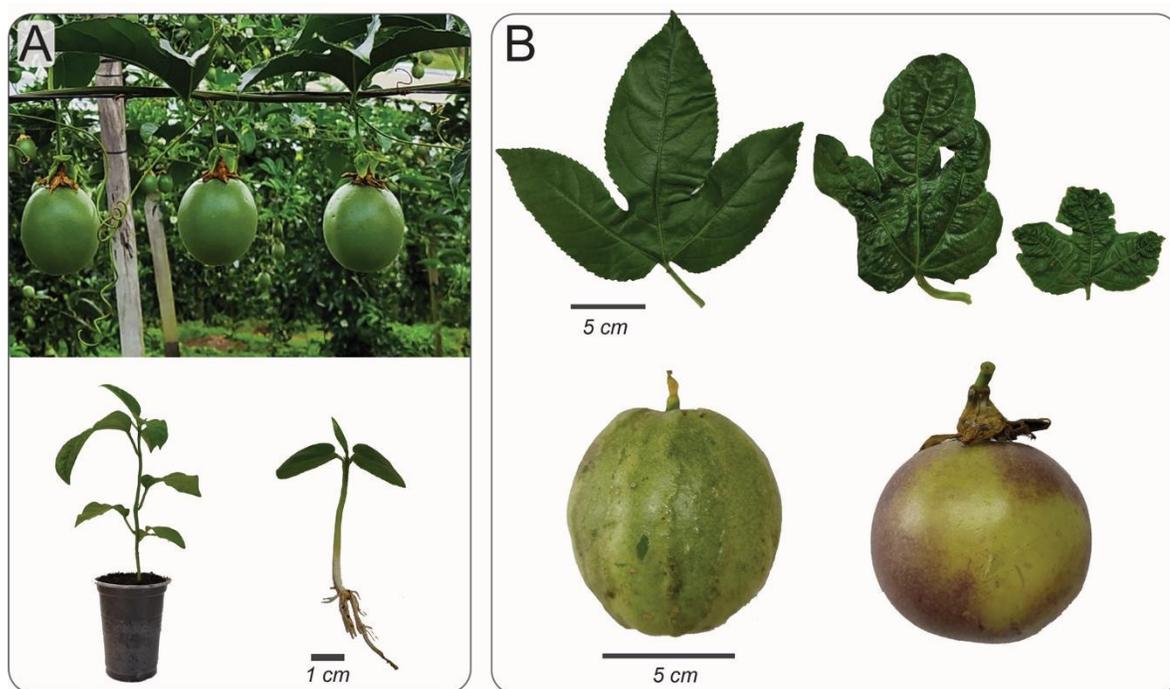


Figure 1. Plant samples used in this study. A) Asymptomatic purple passion fruits (above) and plantlets (below), B) asymptomatic leaf (above-left) and symptomatic leaves showing deformations and rugose mosaics (above-right); fruits showing abnormalities in the skin and color-breaking (below).

2.2. Extraction of nucleic acids

Prior to nucleic acid extraction, seeds were fermented for 48 hours to remove the external coating and stored at 4°C for two weeks (Malgarejo, 2019); after this time, seeds were sown in sterile peat-pots at room temperature and, after germination, sprouts were collected under sterile conditions and processed for nucleic acid extraction. Total RNA was extracted from 100 mg of frozen plant tissue ground into a fine powder with liquid-nitrogen. Extraction from seed sprouts was performed using the GeneJET Plant RNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, USA); in the case of leaves, extraction was performed with the total RNA isolation reagent, TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, USA) following the protocol of Chomczynski and Sacchi (1987). Total RNA was diluted in 40 µL

of DEPC-treated water and stored at -20°C until further use. DNA extraction from seed sprouts was performed with the GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit from 60 mg of tissue (Thermo Fisher Scientific, USA). In leaves, DNA was extracted from 60 mg of homogenized tissue using Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Doyle and Doyle, 1990). Purified DNA was diluted in 50 μL of nanopure water and stored at -20°C until further use. The purity and concentration of nucleic acids was determined by absorbance readings at 260 and 280 nm in a Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.3. cDNA synthesis

Synthesis of cDNA was carried out in a reaction volume of 20 μL , including 200 U of RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA), 1X RT buffer, dNTPs at 0.5 mM, 20 units of RiboLock, 50-100 ng of total RNA, and 20 pmoles of the corresponding virus-specific reverse primer (Table 1). An oligo-dT₁₈ primer was used for SMV and CABMV; primer Tymo_R_CP for PFYMV (Jaramillo et al., 2019) and an equimolar mix of primers CMV-R (Cuspoca, 2007), CMVdo1244b (Xanthis et al., 2015), and CMV_qRT_R (Feng et al., 2006) for CMV. Reactions were first incubated for 5 min at 65°C , followed by 1 hour at 42°C for 1 hour, and an inactivation step of 10 min at 70°C .

2.4. RT-qPCR

Real time PCR reactions were carried out in a volume of 14 μL that included 50-100 ng of cDNA, primers at 0.3 μM (Table 1), and 6.25 μL of Maxima SYBR Green/ROX reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Amplification of target sequences was performed under the following cycling conditions: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 35 cycles with 15 s at 95°C , and 60 s at 52°C . Reactions were carried out in a Rotor-Gene

Q-5plex (Qiagen, Germany) cycler, and data analyzed using the Q-Rex Software. Melting curves were acquired on the green channel by measuring the change in fluorescence in the 50-99°C range. Each run included positive controls for each virus, negative controls contained all the elements of the reaction mixture minus the template. The sequence of selected amplicons was confirmed by Sanger sequencing after purification from a 2% agarose gel using the GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Table 1. List of primers used in this study.

Target	Primers	Sequence	Source
PFYMV	Tymo_F_CP	5' AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG 3'	Jaramillo et al. (2019)
	qTymo_R_C P	5' GCG ACG AGA GAG GTG AGT CG 3'	
SMV	SMV_qRT-F	5' CAGATGGGCGTGGTTATGA 3'	Gao et al. (2015)
	SMV_qRT-R	5' ACA ATG GGT TTC AGC GGA TA 3'	
CMV	CMV-R	5' CGA CTT CAA CAG GCG AGC 3'	Cuspoca (2007) Xanthis et al. (2015)
	CMVdo1244 b	5' TGC TCR AYG TCR ACA TGA AG 3'	
	CMV_qRT_ R	5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3'	Feng et al. (2006)
	CMV_qRT_ F	5' CGT TGC CGC TAT CTC TGC TAT 3'	
CABMV	CABMV_F	5' CGC TCA AAC CCA TTG TAG AA 3'	Gillaspie et al. (2001)
	CABMV_R	5' TAT TGC TTC CCT TGC TCT TTC 3'	
Begomovirus (A)	PAL1v1978	5' GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT YCC NGT 3'	Rojas et al. (1993)
	PAR1c496	5' AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG 3'	
Begomovirus (B)	PVL1v2040	5' GCC TCT GCA GCA RTG RTC RAT CTT CAT ACA 3'	Rojas et al. (1993)
	PCRc1	5' CTA GCT GCA GCA TAT TTA CRA RWA TGC CA 3'	

Badnavirus	GBVA_RT_F	5' GCA AAA GCA GAC ACC GAA CC 3'	Sepúlveda et al. (2021)
	GBVA_RT_ R	5' TGT ATC TCT GCG TCT ATG GTG G 3'	

2.5. RCA and standard PCR

Detection of GBVA was performed using Rolling Circle Amplification (RCA) products as template. The RCA reaction was done in a total reaction volume of 50 μL including 0.5 μL of phi29 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 2.5 μL of reaction buffer at 10x, 3.1 μL of dNTPs at μM , 1.25 μL of hexamer primers at 10 μM , and 1 μL template DNA preheated at 95°C for 3 min. Reaction tubes were incubated at 30°C for 18 h, and were followed by an enzyme inactivation step at 65°C for 10 min. RCA products were used as template for standard PCR with primers GBVA_RT_F/R (Sepúlveda et al., 2021). For begomovirus, primers targeting the DNA-A (PAL1v1978/PAR1c496) and DNA-B segments (PVL1v2040/PCRC1) were used (Rojas et al., 1993) (Table 1). PCR reactions were carried in a total volume of 25 μL , with 13 μL of sterile nanopure water, 2.5 μL of 10X reaction buffer, 1.8 μL of 25 mM MgCl_2 , dNTPs at 2.5 μM , 0.2 μL of Taq polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 μL of BSA, 20-50 ng of template DNA or RCA, and 0.5 μM of each primer pair (Table 1). Amplifications were performed in a T3 thermal cycler (Biometra, Germany) under the following cycling conditions: initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles with 30 s at 94°C, 45 s at 52°C, and 1 min at 72°C, and a final extension step of 5 min at 72°C. Each run included positive and negative controls. The sequence of selected amplification products was confirmed by Sanger sequencing after purification using the GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific, USA) from a 1.5% agarose gel.

2.5. High-throughput sequencing

cDNA libraries for high-throughput sequencing (HTS) were prepared with the TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep kit using bulked total RNA from asymptomatic (BPE19) and symptomatic (BPE20) adult plants, plantlets (BPE22), seed sprouts (BPE23) and seed embryos (BPE24); ribosomal RNA (rRNA) was removed with the Ribo-Zero Plant kit (Illumina, USA). The quality and quantity of the nucleic acid preparations was assessed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Sequencing was performed with the Illumina NovaSeq system service provided by Macrogen (South Korea). The quality of each dataset was verified with fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), and the low-quality bases (Phred < 30) were removed using Seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>). Preliminary detection of viruses was done with the PVDP platform (Gutierrez et al., 2021), and detected genomes were assembled with Magic-BLAST (Boratyn et al., 2019) using NCBI accession codes KY249378, KY823429, and MW393830 as templates for SMV, PFYMV, and GBVA, respectively. Contigs and scaffolds were verified for assembly errors with the Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al., 2011). Phylogenetic analyses were carried out in MEGA 11 (Tamura et al., 2021) using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987) with 1,000 bootstrap replicates. Sequences were aligned with MUSCLE (Edgar, 2004) and ambiguous positions were removed for each sequence pair. Evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method with a gamma distribution (Tamura, 1992).

3. Results

3.1. Detection of viruses by RT-qPCR and PCR

The presence of the RNA viruses PFYMV, SMV, CMV, and CABMV was assessed by RT-qPCR in samples of seeds, plantlets, and adult plants with or without symptoms of

viral infection. PFYMV was the most prevalent virus as it was detected in all the seed lots and symptomatic adult plants (100%), and in nine out of ten asymptomatic adult plants and plantlets tested (90%) (Figure 2B). For PFYMV, Ct values were between 14.7 and 25.3 which suggests a high viral loads in all infected samples. SMV, on the other hand, was only found in two (20%) asymptomatic lots from Jericó (Je-PE110, Ct = 27.9), and Jardín (Ja-PE116, Ct = 30.3); one (10%) symptomatic lot from Jardín (Ja-PE134, Ct= 11.7); two (20%) plantlet nurseries in Jardín (Ja-PE140, Ct= 28.2) and Jericó (Je-PE144, Ct= 30.3); and one (10%) seed lot from Jericó (Je-PE146, Ct: 23.9). Despite being less prevalent than PFYMV, SMV exhibited the lowest Ct value in this study. With respect to CMV, infection was only detected in asymptomatic plants from Jericó (Je-PE112, Ct= 23.5) and Jardín (Ja-PE116, Ct= 18.4) (20%); and plantlets from four (40%) nurseries in the same municipalities (Je-PE136, Ct= 24.4; Ja-PE138, Ct=23.7; Ja-PE140, Ct=25.4 and Je-PE144, Ct=23.6); this virus was not detected in any of the symptomatic or seed lots tested (Figure 2B). The average Tm values for SMV ($80.7^{\circ}\text{C} \pm 0.5$), CMV ($81.6^{\circ}\text{C} \pm 0.8$), and PFYMV ($84.4^{\circ}\text{C} \pm 0.3$) were within the expected range reported for these viruses in Colombia (Figure 2A), (Jaramillo et al., 2018; Jaramillo et al., 2019; Sepúlveda et al., 2021). Finally, no evidence for infection with CABMV was found in any of the samples, a result that is consistent with previous reports that suggest that this virus has still not arrived in Antioquia (Sepúlveda et al., 2021). Testing for the badnavirus GBVA was performed by standard PCR using RCA products as templates. In this case, amplicons with expected size of 979 pb were detected in all 40 samples (Figure 3B, C). None of the samples tested positive for infection with begomovirus (Figure 3A).

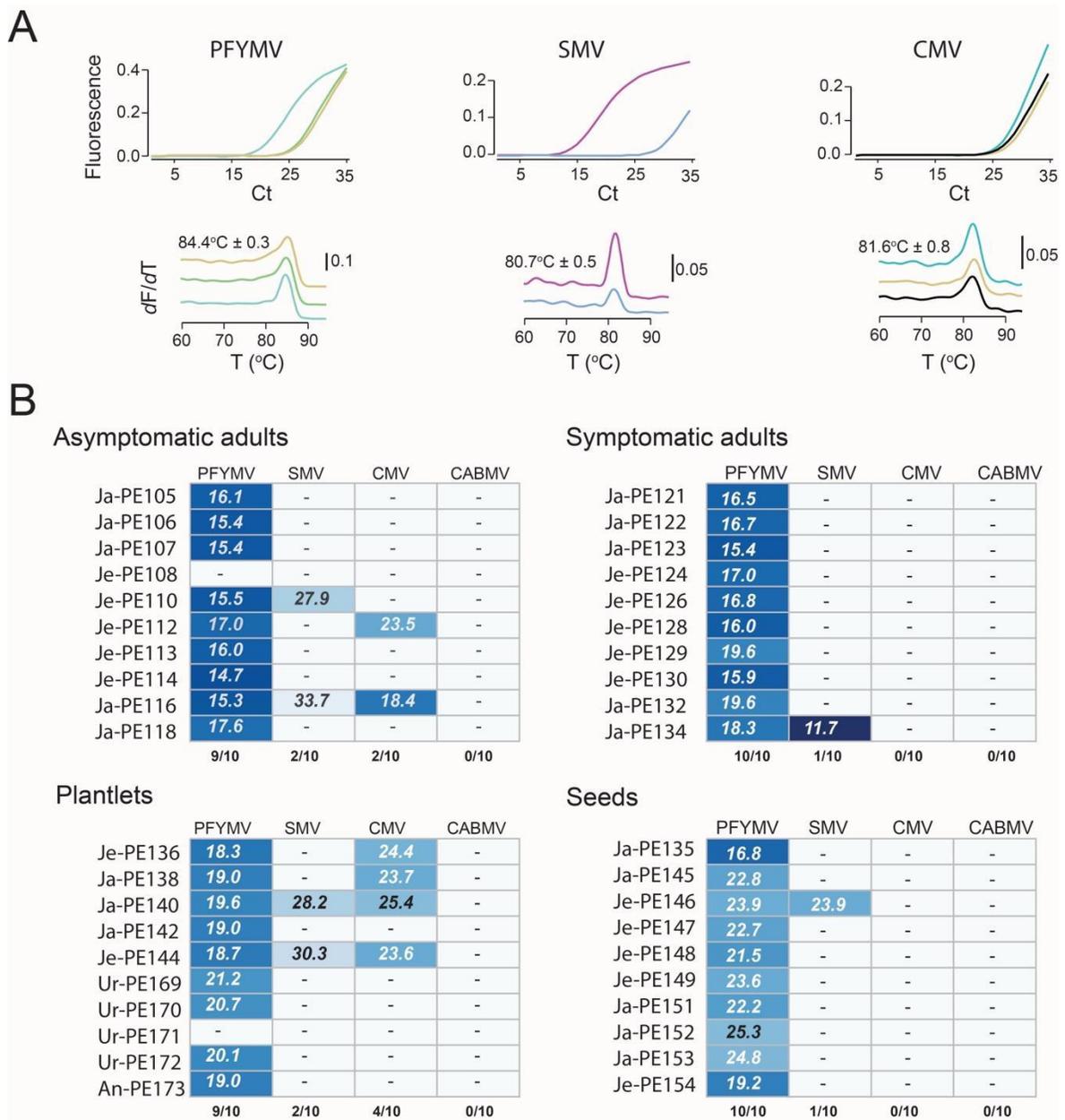


Figure 2. RT-qPCR detection of RNA viruses in purple passion fruit. A) RT-qPCR detected infection of PFYMV, SMV and CMV in purple passion fruit, with amplicons exhibiting T_m values in the expected range. B) Prevalence and Ct-values of tested purple passion fruit samples. Individual sample codes are shown to the left of each panel. Numbers indicate the Ct value for each virus; negative samples ($Ct > 35$) are labelled with the minus sign. Labels at the bottom of each panel indicate fraction of positive samples for each virus.

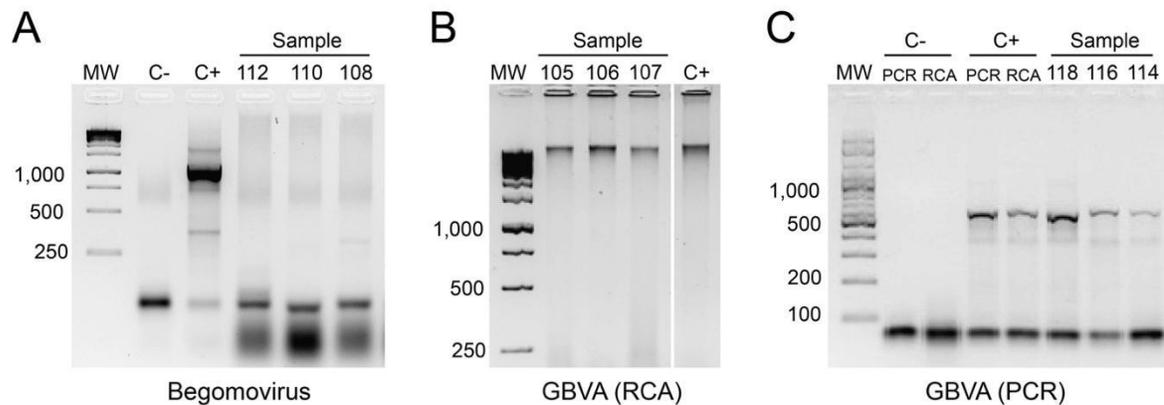


Figure 3. PCR detection of DNA viruses in purple passion fruit. A) PCR test using primers PAL1v1978/PAR1c496 for detection of begomoviruses in purple passion fruit; the positive control amplified as a fragment with the expected size (~1200 bp), in contrast all samples were negative. B) RCA products from in purple passion fruit samples. C) PCR detection of GBVA using RCA products as templates with primers GBVA_RT_F/R.

3.2. High-throughput sequencing

To further characterize the viruses infecting adult plants, plantlets, and seeds of purple passion fruit in southwestern Antioquia, we performed a bulked high-throughput sequencing of the RNA samples. RNAseq analysis of seeds was performed on RNA extractions from seed embryos and from seed sprouts. RNAseq resulted in paired-end datasets of 12.0 million reads for the asymptomatic plants (BPE19), 13.4 million for the symptomatic adult plants (BPE20), 12.6 million for plantlets (BPE22), 14.1 million for seed sprouts (BPE23), and 12.4 million for seed embryos (BPE24) (Figure 4). In general, the content of virus-like sequences detected in the RNAseq data was low and varied between 0.18% for the symptomatic plant dataset and 0.06% in the plantlets. With respect to the viruses studied in this work, GBVA was the most prevalent virus, as it was detected in all datasets with abundances between 9.5 and 59.9 reads per million; this virus was also the

dominant virus in plantlets and seed sprouts. SMV was detected at high loads in the symptomatic adults at 129.3 reads per million, trace sequences were also detected in the seed embryo dataset (16 reads). PFYMV was only detected in plantlets at 2.6 reads per million. Viral sequences from either CMV, CABMV or begomoviruses were not identified in any of the datasets. Besides these viruses, reads attributed to a putative unidentified tymoviridae were found to be dominant in the datasets from adult plants and seed embryos with abundances ranging between 149.9 and 748.7 reads per million. As the nature of these virus-like sequences needs to be confirmed experimentally they are not discussed further and will be addressed elsewhere. In contrast with the high prevalence observed for PFYMV in the RT-qPCR analysis across all samples, this virus was only detected in the dataset from plantlets (BPE22) in low amounts, which resulted in a scaffold with 1.25 coverage comprising 42% of the genome (Figure 5A) and sharing 99.0-100% nucleotide sequence identity with available PFYMV sequences available at GenBank.

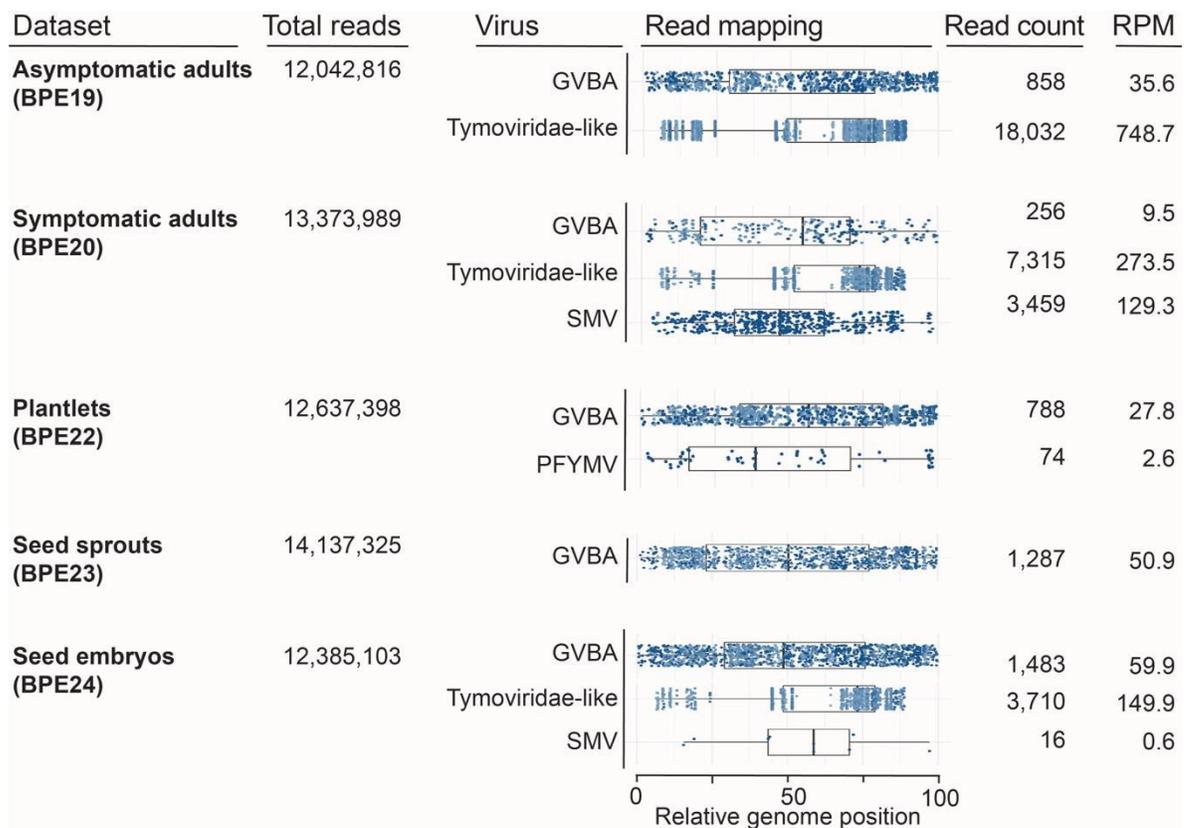


Figure 4. Detection of virus-like sequence in the five RNAseq datasets. Box plots of reads with respect to the relative position of viral reference genomes, revealed sequence mapping for GVBA, SMV, PFYMV and a tymoviridae-like virus. The intensity of the data points is correlated with the similarity of each read with respect to the most closely related viral genome.

Phylogenetic analysis of the PFYMV scaffold confirmed its close relationship with previously sequenced PFYMV isolates from eastern Antioquia, and its affinity to *Asclepias* asymptomatic virus, *Kennedya* yellow mosaic virus, and *Okra* mosaic virus (Figure 5A). As said before, SMV sequences were identified in the datasets from symptomatic adults (BPE20), and seed embryos (BPE24). Sequences from embryos assembled into a scaffold comprising 7% of the SMV genome and shared 96.7 sequence identity with respect to isolate Antioquia (KY249378). In contrast, sequences from the symptomatic adults resulted in a scaffold of 35.8x sequence coverage comprising 92% of the reference genome and 99.69% identity with respect to the same isolated (Figure 5B). Phylogenetic

analysis confirmed the sequence to be part of the SMV clade infecting *P. edulis* which includes isolates BPE89 from eastern Antioquia, isolate Gulupa from the southwest and isolate BSB1 from Brazil infecting an unknown *Passiflora* species (Figure 5B). Scaffolds corresponding to the badnavirus GBVA were assembled in the five datasets with coverages between 5.2 to 15.9x with phylogenetic affinity to the reference GBVA genome (Accession MW393830) described by Sepúlveda et al. (2021) in a clade clearly differentiated from other badnaviruses (Figure 5C).

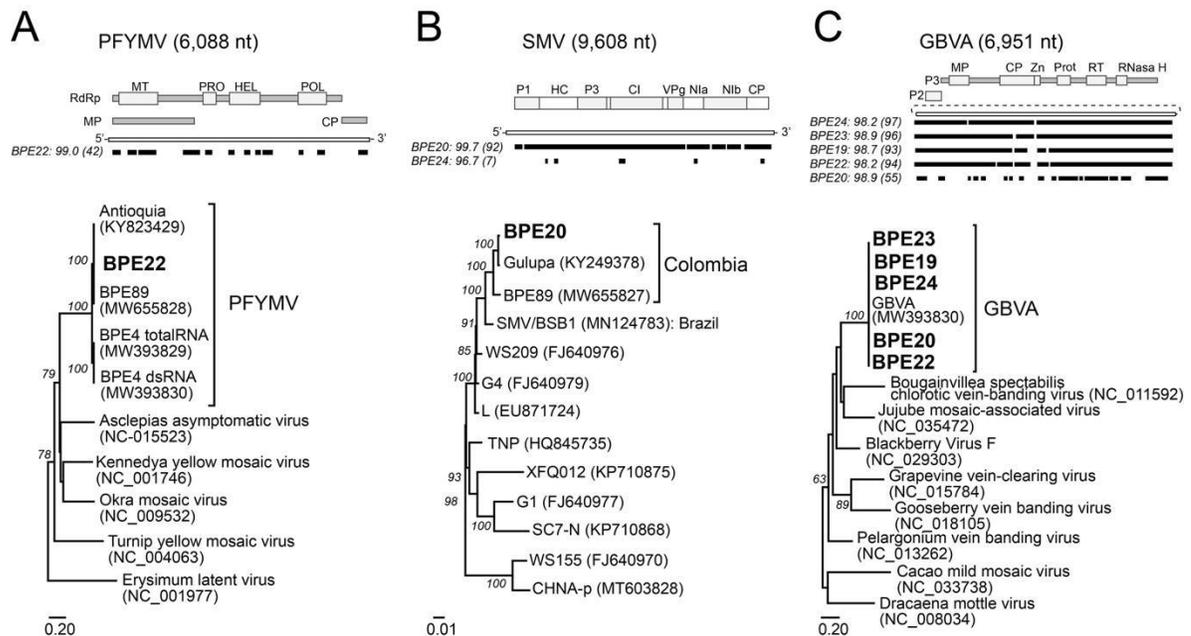


Figure 5. Scaffold assembly and phylogenetics of virus partial genomes detected in purple passion fruit samples. A) A scaffold with 1.25 coverage comprising 42% of the PFYMV genome and a neighbor-joining phylogenetic tree confirming the phylogenetic affinity of the assembled partial genome to Passion fruit yellow mosaic virus. B) Two scaffolds comprising 7% (BPE24) and 92% (BPE20) of the SMV genome and a neighbor joining phylogenetic tree confirming the phylogenetic affinity of the assembled partial genome to soybean mosaic virus. C) Five scaffolds of the GBVA genome and a neighbor joining phylogenetic tree confirming the phylogenetic affinity of the assembled partial genome to gulupa bacilliform virus A.

4. Discussion

This study was implemented to assess the sanitary status of the purple passion fruit in Colombia with respect SMV, CMV, CABMV, PFYMV, GBVA, and begomovirus. Except for the latter, all these viruses have been detected in commercial fields and/or planting material of purple passion fruit in the country (Camelo, 2010; Gordillo, 2011; Cutler et al., 2018; Jaramillo et al., 2018, 2019; Sepúlveda et al., 2021). RT-qPCR confirmed infection of the RNA viruses PFYMV at high prevalence ($\geq 90\%$) in all samples, SMV at low prevalence ($\leq 20\%$) in all samples, and CMV in plantlets and asymptomatic plants at 40%, and 20% prevalence, respectively. The badnavirus GBVA was detected in all tested samples by standard PCR of RCA products and confirms the widespread distribution of this virus in Colombia; as little is known about the biology of this virus, future work should investigate its impact on the productivity of purple passion fruit, transmission mechanisms, and diversity. GBVA was detected by Sepúlveda and collaborators in 2021 in asymptomatic purple passion fruit plants from eastern Antioquia; RCA confirmed the episomal nature of this virus, however, genome analysis of the *P. edulis* genome contigs suggest the possibility that this virus can also be integrated within the host genome (Sepúlveda et al., 2021). This is a worrying fact as the presence of integrated endogenous than could potentially be activated into infectious particles might hinder the generation of virus-free planting material and crop improvement programs as observed for *Musa* spp. and the badnavirus banana streak virus (BSV) (Bhat et al., 2016).

Detection of SMV, CMV, PFYMV, and GBVA in southwest Antioquia is worrying and might have a significant impact on future expansion plans for the purple passion fruit crop in the region. Previous work already demonstrated the circulation of SMV in the region (Jaramillo et al., 2018) but failed to detect PFYMV (Jaramillo et al., 2019); unfortunately, this study gives evidence for the expansion of this virus into southwest Antioquia at very

high prevalence, in addition to CMV which was mostly found in plantlets commercialized by nurseries in the region. Detection of PFYMV in all seed samples suggests that this virus could be transmitted vertically as observed for other tymoviruses such as Turnip yellow mosaic virus, Eggplant mosaic virus, and Dulcamara mottle virus (King et al., 2012). Vertical transmission has also been suggested for SMV (Jaramillo et al., 2018), which is agreement with detection of this virus in one of the seed lots analyzed in this work. Evidence for vertical transmission of SMV and PFYMV is still circumstantial and should be investigated in detail in the future; however, the use of infected seeds and plantlets are likely major factors in the dispersal of these viruses among purple passion fruit producing regions in Colombia.

This work was complemented with HTS methods to obtain more detailed information about the viruses circulating in purple passion fruit crops in southwestern Antioquia. This technique allowed the obtention of GBVA scaffolds from all datasets, two SMV scaffolds from the symptomatic adults and seen embryos, and one PFYMV scaffold from plantlets. Of particular interest was the consistent detection of reads suggesting the presence of an unidentified member of the family *Tymoviridae* in the datasets from adult plants and seed embryos; future work should provide further evidence to either confirm or reject the existence of this putative virus which might add yet another virus to the current purple passion fruit virome in Colombia. Our study also suggests that the potyvirus CABMV and begomovirus are still not of important concern for the purple passion fruit crop in Antioquia, as none of these viruses were detected using HTS or PCR-based methods. CABMV is the causal agent of the passion fruit woodiness disease, which is responsible for significant economic damages in the *P. edulis* agroindustry of Brazil and several African countries (Gonçalves et al., 2017; Munguti et al., 2019). On the other hand,

begomovirus are one of the most important virus groups affecting crops in the tropical and subtropical regions (Hull, 2013; Marín and Gutiérrez, 2016), and there is already a report of a novel begomovirus species (PLDV) affecting yellow passion fruit in the province of Valle del Cauca (Vaca-Vaca et al. 2017). To avoid the spread of these viruses in Antioquia, constant surveillance of purple passion fruit stands, and planting material should be implemented as soon as possible, especially when stablishing new plots, as during this time there is a higher risk of introducing new pathogens into a region. In this sense, HTS is an ideal tool as it allows detection of pathogens without any *a priori* knowledge of potential pathogens to be tested. This would be particularly useful for purple passion fruit given the rapid increase in cultivated area experienced in recent years in Colombia (Agronet, 2021). The availability of healthy planting material that reduces the risk of vertical and/or horizontal transmission of diseases is a cornerstone of any successful agroindustry (Hull, 2013; Marín and Gutiérrez, 2016). To achieve this goal, it is essential to have adequate testing methods and protocols that can detect infection prior to the development of visible symptoms. Our experience suggests that modern techniques such as RT-qPCR and high-throughput sequencing can provide complementary information on virus surveillance and phytosanitary certification programs (Gallo et al., 2019, 2020; Corrales-Cabra et al., 2021; Gutiérrez et al., 2021). RT-qPCR, which is highly sensitive and specific, can be used to measure the prevalence of known viruses in seed lots, plantlets, and stock plants. High-throughput sequencing is a more expensive and less sensitive technique than PCR-based testing methods but can offer valuable information on the emergence of novel pathogens and variants and should be used to complement and/or update testing PCR-based testing methods (Gutiérrez et al., 2021; Schumpp et al., 2021). Individual sequencing costs can be decreased with the use of bulked samples, as previous work has demonstrated that they can detect viruses present

in high-loads and have already been used successfully in the identification of native viruses affecting different crops in Colombia such as lulo (*Solanum quitoense*), cape gooseberry (*Physalis peruviana*), potato (*S. phureja* and *S. tuberosum*), and tamarillo (*S. betaceum*) (Gallo et al., 2019; 2020; Corrales Cabra et al., 2021; Gutiérrez et al., 2015; 2021). All these techniques have become a fundamental part of integrated disease management programs in developed countries, and we have shown that their implementation in developing countries such as Colombia is feasible.

This work should be complemented with similar studies in other purple passion fruit cultivating regions across Colombia to better characterize the diversity of viruses affecting this crop and this information should be part of a holistic phytosanitary approach that involves the participation and good articulation between growers, nurseries, and surveillance institutions.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Author contributions

YG, MM and PG designed the study; DC, JP and MH conducted the experiments. DC, MM and PG analyzed the results. MM, YG and PG prepared the manuscript. All authors read and approved the final version.

Ethical approval

This article does not contain any research involving human or animal participants.

Funding

This work was funded by Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías del Departamento de Antioquia under grant [1101-805-62786 (Convenio No. 4600007658-779)]; and executed with the participation of Universidad Nacional de Colombia sede Medellín and Universidad CES. The project was supervised by Secretaria de Agricultura de Antioquia and Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia. Plant samples were collected using permission RGE152-26 from Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible [Resolution 0209, 9/03/2020].

ORCID

Daniela Cardona <http://orcid.org/0000-0002-9793-4533>

Jaime Posada <https://orcid.org/0000-0001-8042-9242>

Mónica Higueta <http://orcid.org/0000-0002-4031-4931>

Yuliana Gallo García <http://orcid.org/0000-0002-6018-453X>

Mauricio Marín <http://orcid.org/0000-0001-7123-2747>

Pablo A. Gutiérrez <http://orcid.org/0000-0002-7003-6485>

References

Agronet (2021). Área, producción y rendimiento de Gulupa en Colombia. In: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>; accessed: October 2020.

Bhat AI, Hohn T, Selvarajan R (2016). Badnaviruses: The current global scenario. *Viruses*, 8(6): 177. doi: 10.3390/v8060177

Boratyn GM, Thierry-Mieg D, Busby B, Madden TL (2019). Magic-BLAST, an accurate DNA and RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics* 20: 405. doi: 10.1186/s12859-019-2996-x

Camelo VM (2010). Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región del Sumapaz (Cundinamarca). Master's Thesis in Phytopathology. Faculty of Agronomy. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 60 p.

Cardona D, Gallo Y, Higueta M, Hoyos R, Gutiérrez P, Marín M (2021). Detección molecular de virus en cultivos, plántulas y semillas de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) en el oriente de Antioquia. *Bioagro*. *In press*.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156-159. doi: 10.1006/abio.1987.9999

Corrales-Cabra E, Higueta M, Hoyos R, Gallo Y, Marín M, Gutiérrez P (2021). Prevalence of RNA viruses in seeds, plantlets, and adult plants of cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Antioquia (Colombia). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 116: 101715. doi: 10.1016/j.pmpp.2021.101715.

Cuspoca, J (2007). Evaluación de virus de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. Thesis in Agronomy. Faculty of Agronomy. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 31 p.

Cutler J, Langer J, Von Bargen S, Acosta-Losada O, Casierra-Posada F, Castañeda-Cárdenas A, Betancourt-Vásquez M, Cuellar W, Arvydas-Stasiukynas E, Altenbach D, Büttner C (2018). Preliminary evaluation of associated viruses in production systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2): 390-396. doi: 10.17584/rcch.2018v12i2.7799

Doyle J (1991). DNA Protocols for Plants. pp. 283-293. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW, Eds., *Molecular Techniques in Taxonomy*, Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-83962-7_18

Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5):1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340

Feng JL, Chen SN, Tang XS, Ding XF, Du ZY, Chen JS (2006). Quantitative determination of cucumber mosaic virus genome RNAs in virions by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(10): 669-676. doi: 10.1111/j.1745-7270.2006.00216.x

Gao L, Ding X, Li K, Liao W, Zhong Y, Ren R, Liu Z, Adhimoolam K, Zhi H (2015). Characterization of Soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 128: 1489-1505. doi: 10.1007/s00122-015-2522-0

Gallo Y, Marín M, Gutiérrez PA (2020). Detection of RNA viruses in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) by RNAseq using total RNA and dsRNA inputs. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(9-10): 395-413. doi: 10.1080/03235408.2020.1748368

Gallo Y, Marín M, Gutiérrez PA (2021). Detection of RNA viruses in *Solanum quitoense* by high-throughput sequencing (HTS) using total and double stranded RNA inputs. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113. doi: 10.1016/j.pmpp.2020.101570

Gillaspie AG Jr, Pio-Ribeiro G, Andrade GP, Pappu HR (2001). RT-PCR Detection of seedborne Cowpea aphid-borne mosaic virus in peanut. *Plant Disease*, 85(11): 1181-1182. doi: 10.1094/PDIS.2001.85.11.1181

Gonçalves Z, de Jesus O, Cerqueira-Silva CB; Diniz RP, Soares TL, de Oliveira EJ (2017). Methodological approaches to assess passion fruit resistance (*Passiflora* spp.) to passionfruit woodiness disease. *Bioscience Journal*, 33(6): 1441-1451. doi: 10.14393/BJ-v33n6a2017-36619

Gordillo LA (2011). Incidencia del Soybean mosaic virus en cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia. Master's Thesis in Microbiology. Faculty of Sciences. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 106 p.

Gutiérrez PA, Alzate JF, Montoya MM (2015). Complete genome sequence of an isolate of Potato virus X (PVX) infecting cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Virus Genes* 50: 518-522. doi: 10.1007/s11262-015-1181-1

Gutiérrez P, Rivillas A, Tejada D, Giraldo S, Restrepo A, Ospina M, Cadavid S, Gallo Y, Marín M (2021). PVDP: A portable open source pipeline for detection of plant viruses in RNAseq data. A case study on potato viruses in Antioquia (Colombia). *Physiological and Molecular Plant Pathology*.

Hull R (2013). *Plant Virology*. 5 Ed. Academic Press, London.

Jaramillo H, Marín M and Gutiérrez P (2018). Molecular characterization of Soybean mosaic virus (SMV) infecting Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia, Colombia. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 51(11-12): 617-636. doi: 10.1080/03235408.2018.1505411

Jaramillo H, Marín M and Gutiérrez P (2019). Complete genome sequence of a Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 72(1): 8643-8654. doi: 10.15446/rfnam.v72n1.69438

King AMQ (2012). Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego.

Marín M, Gutiérrez P (2016). Principios de virología molecular de plantas tropicales. Corpoica, Bogotá.

Melgarejo LM (2019). Gulupa (*Passiflora edulis*), curuba (*Passiflora tripartita*), aguacate (*Persea americana*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) Innovaciones. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Munguti F, Maina S, Nyaboga EN, Kilalo D, Kimani E, Macharia M, Holton T (2019). Transcriptome sequencing reveals a complete genome sequence of cowpea aphid-borne mosaic virus from passion fruit in Kenya. Microbiology Resource Announcements, 8(2): e01607-18. doi: 10.1128/MRA.01607-18.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011). Integrative Genomics Viewer. Nature Biotechnology 29(1): 24-26. doi: 10.1038/nbt.1754

Rojas MR, Giltberson RL, Rusell DR, Mawell DP (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77(4): 340-347. doi: 10.1094/PD-77-0340

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Schumpp O, Bréchon A, Brodard J, Dupuis B, Farinelli L, Frei P, Otten P, Pellet D (2021). Large-Scale RT-qPCR diagnostics for seed potato certification. *Potato Research* 64: 553–569. doi: 0.1007/s11540-021-09491-3

Sepúlveda M, Cardona D, Gallo Y, Higuita M, Gutiérrez P, Marín M (2021). Virome analysis for identification of viruses associated with asymptomatic infection of purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Colombia, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *In press*. doi: 10.1080/14620316.2021.1973583

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027. doi: 10.1093/molbev/msab120

Tamura K (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752

Vaca-Vaca JC, Carrasco-Lozano EC, López-López K (2017). Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. *Archives of Virology* 162(2): 573-576. doi: 10.1007/s00705-016-3098-y

Xanthis CK, Maliogka VI, Lecoq H, Dezbiez C, Tsvetkov I, Katis NI (2015). First report of cucumber mosaic virus infecting watermelon in Greece and Bulgaria. *Journal of Plant Pathology* 97(2): 391-403. doi: 10.4454/JPP.V97I2.007

B. Anexos: Capítulo 2

Municipio - Finca	Muestra	Concentración RNA (ng/μl)	SMV		CABMV		CMV		PFYMV	
			Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct
PLANTAS EN PRODUCCIÓN ASINTOMÁTICAS										
Jardín	PE105	551,5	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	16,14
Jardín	PE106	834,9	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	15,41
Jardín	PE107	861,7	-	>35	-	>35	-	>35	84,7	15,41
Jericó	PE108	1113,5	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
Jericó	PE110	1144,3	81,2	27,92	-	>35	-	>35	84,0	15,48
Jericó	PE112	331,0	-	>35	-	>35	81,5	23,45	84,0	16,95
Jericó	PE113	412,8	-	>35	-	>35	-	>35	84,7	16,04
Jericó	PE114	1366,6	-	>35	-	>35	-	>35	84,2	14,67
Jardín	PE116	1207,6	81,3	33,65	-	>35	80,0	18,43	84,5	15,27
Jardín	PE118	1703,3	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	17,55
PLANTAS EN PRODUCCIÓN SINTOMÁTICAS										
Jardín	PE121	1185,7	-	>35	-	>35	-	>35	84,8	16,45
Jardín	PE122	703,3	-	>35	-	>35	-	>35	84,7	16,71
Jardín	PE123	1527	-	>35	-	>35	-	>35	84,8	15,38
Jericó	PE124	1250,6	-	>35	-	>35	-	>35	84,7	17,04
Jericó	PE126	2338,2	-	>35	-	>35	-	>35	85,0	16,78
Jericó	PE128	1065,2	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	15,96
Jericó	PE129	850,6	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	19,60

Anexo B-1: Muestras de *Passiflora edulis* f. *edulis* (PE) evaluadas indicando el origen, código de la muestra, concentración de RNA y los valores de Tm y Ct para los virus SMV, CABMV, CMV y PFYMV en el suroeste antioqueño.

Municipio - Finca	Muestra	Concentración RNA (ng/μl)	SMV		CABMV		CMV		PFYMV	
			Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct
Jericó	PE130	745,1	-	>35	-	>35	-	>35	84,7	15,85
Jardín	PE132	1118,1	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	19,59
Jardín	PE134	2216,4	80,0	11,72	-	>35	-	>35	84,8	18,28
Jericó	PE130	745,1	-	>35	-	>35	-	>35	84,7	15,85
PLÁNTULAS										
Jericó	PE136	628,6	-	>35	-	>35	81,8	24,37	84,2	18,31
Jardín	PE138	375,3	-	>35	-	>35	82,0	23,69	84,2	19,01
Jardín	PE140	822,5	81,0	28,15	-	>35	82,2	25,43	84,3	19,60
Jardín	PE142	599,0	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	18,99
Jericó	PE144	550,3	80,8	30,33	-	>35	82,2	23,62	84,0	18,65
Urrao	PE169	1379,4	-	>35	-	>35	-	>35	84,3	21,18
Urrao	PE170	7666,0	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	20,71
Urrao	PE171	7720,0	-	>35	-	>35	-	>35	-	>35
Urrao	PE172	1154,9	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	20,11
Angelopolis	PE173	1752,5	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	18,96
BROTOS DE SEMILLA										
Jardín	PE135	199,3	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	16,78
Jardín	PE145	176,4	-	>35	-	>35	-	>35	84,0	22,75
Jericó	PE146	223,6	80,2	23,86	-	>35	-	>35	84,5	23,91
Jericó	PE147	118,2	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	22,71
Jericó	PE148	279,1	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	21,45
Jericó	PE149	710,1	-	>35	-	>35	-	>35	85,0	23,63

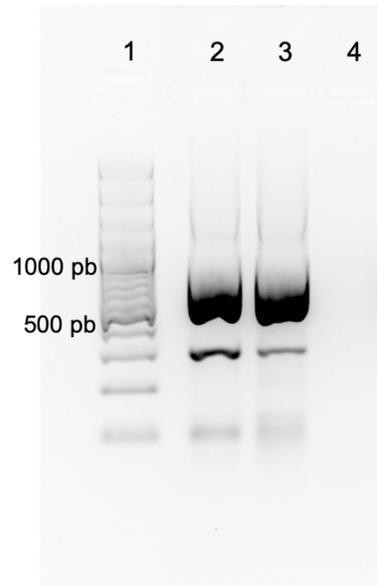
Jardín	PE151	343,0	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	22,17
--------	-------	-------	---	-----	---	-----	---	-----	------	-------

Anexo B-1: (Continuación)

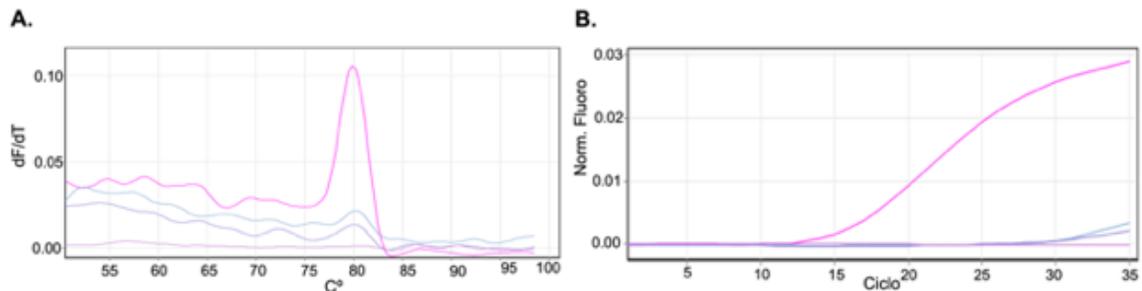
Anexo B-1: (Continuación)

Municipio - Finca	Muestra	Concentración RNA (ng/μl)	SMV		CABMV		CMV		PFYMV	
			Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct
Jardín	PE152	709,5	-	>35	-	>35	-	>35	84,5	25,30
Jardín	PE153	398,1	-	>35	-	>35	-	>35	84,3	24,81
Jericó	PE154	43,7	-	>35	-	>35	-	>35	84,2	19,20

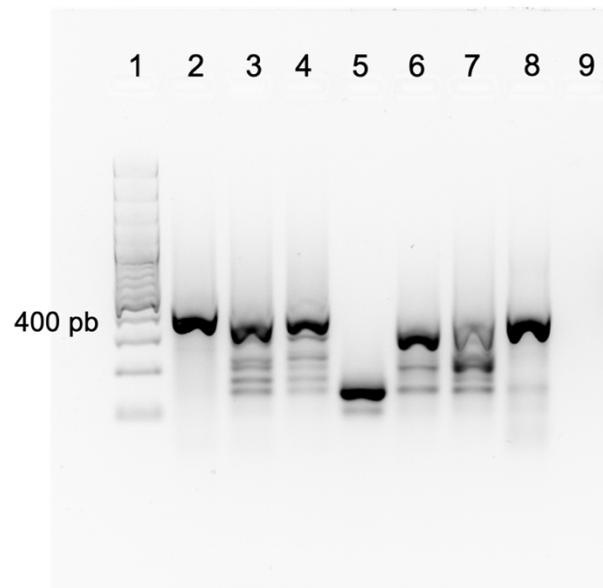
Anexo B-2: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-PCR del gen de cápside de SMV (991 pb) en muestras de plantas asintomáticas de gulupa de Jardín y plántulas de Jericó (carriles 2 y 3), respectivamente. Primers: CP_F_SMV (5'- GCT YGC TTC GTC YGG AAA AG-3') y CP_R_SMV (5'- GCG ACC CGA AAT GAT AAC TG-3') El carril 4 corresponde al control negativo.



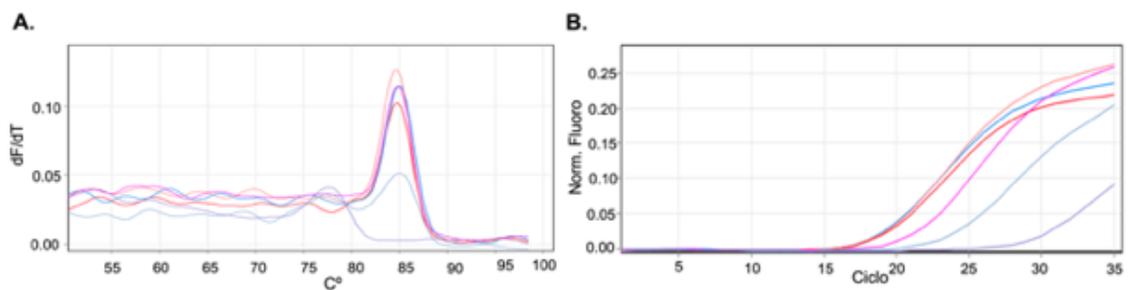
Anexo B-3: Detección molecular de SMV a partir de plantas sintomáticas y plántulas de gulupa del suroeste antioqueño, mediante RT-qPCR. (A). Curvas de melting de $81\pm 1^\circ\text{C}$. Primers: SMV_qRT_F (5' CAG ATG GGC GTG GTT ATG A 3') y SMV_qRT_R (5' ACA ATG GGT TTC AGC GGA TA 3') B. Curvas de amplificación



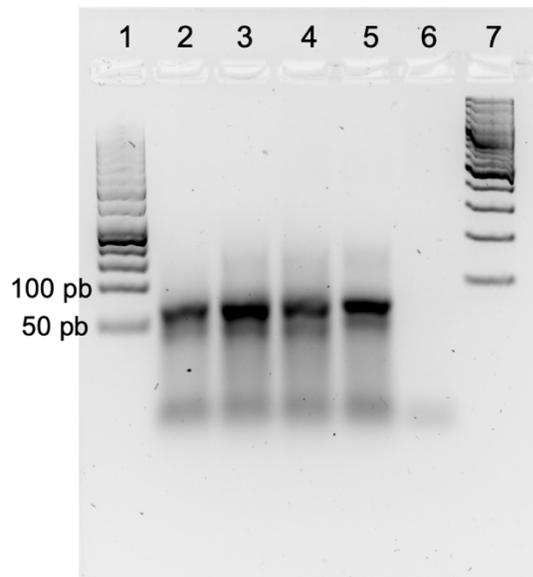
Anexo B-4: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-PCR del gen de cápside de PFYMV (~400 pb) en muestras de plantas en producción asintomáticas y sintomáticas de gulupa de Jardín y Jericó (carriles 3 al 8). Primers: Tymo_F_CP (5'- AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG -3') y Tymo_R_CP (5'- GAA TGG AGT TCG ATC GTG C-3') Los carriles 2 y 9 corresponden al control positivo y negativo, respectivamente.



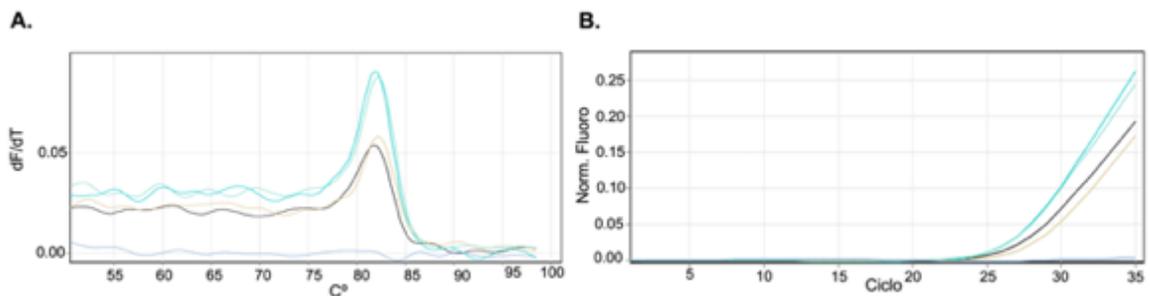
Anexo B-5: Detección molecular de PFYMV a partir de plantas sintomáticas de gulupa del suroeste antioqueño, mediante RT-qPCR. (A). Curvas de melting de $84.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Primers: Tymo_F_CP (5'- AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG -3') y qTymo_R_CP (5' GCG ACG AGA GAG GTG AGT CG 3') B. Curvas de amplificación.



Anexo B-6: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-qPCR para CMV (90 pb) en muestras de plántulas de gulupa de Jardín y Jericó (carriles 2 a 5). Primers: (CMV_qRT_F (5'- CGT TGC CGC TAT CTC TGC TAT-3') y CMV_qRT_R (5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3'). El carril 6 corresponde al control negativo. Las muestras fueron posteriormente purificadas para secuenciación Sanger.

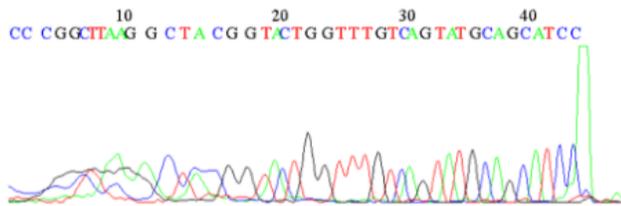


Anexo B-7: Detección molecular de CMV a partir de plántulas de gulupa del suroeste antioqueño, mediante RT-qPCR. (A). Curvas de melting de $81,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Primers: CMV_qRT_F (5'- CGT TGC CGC TAT CTC TGC TAT-3') y CMV_qRT_R (5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3') B. Curvas de amplificación.

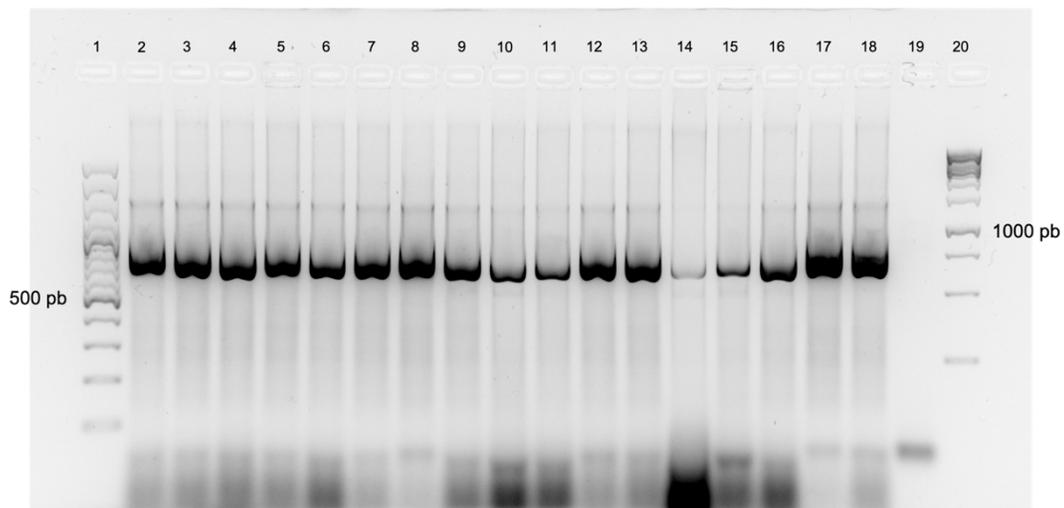


Anexo B-8: Electroferograma de un amplicón de RT-qPCR de 90 pb, obtenido por el método de secuenciación Sanger utilizando los primers CMV_qRT_F (5'- CGT TGC CGC TAT CTC TGC TAT-3') y CMV_qRT_R (5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3')

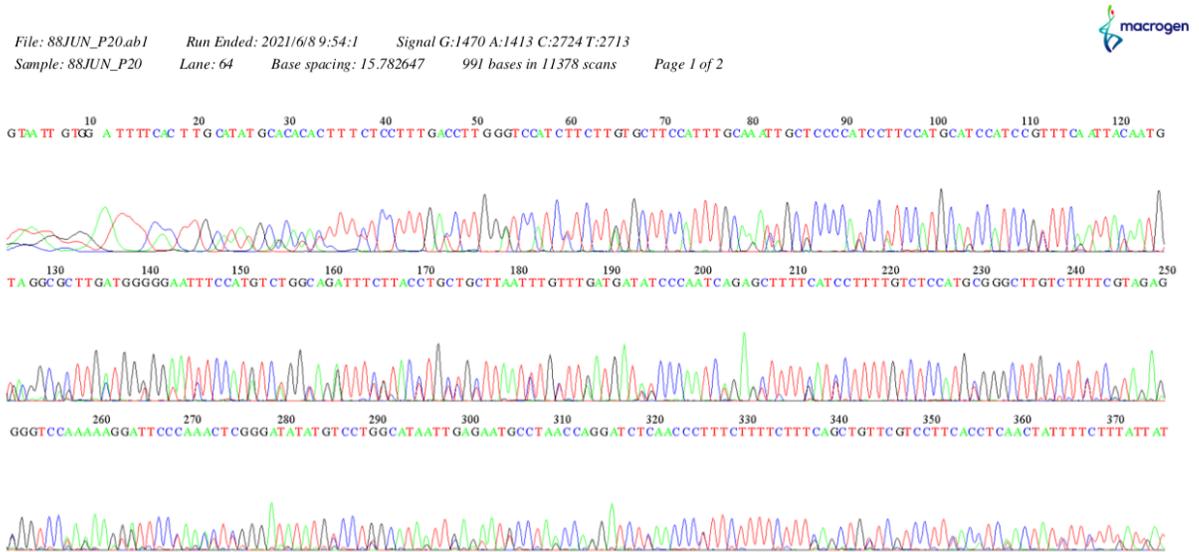
File: 93JUN_P3.ab1 Run Ended: 2021/6/7 20:49:24 Signal G:396 A:390 C:485 T:259
Sample: 93JUN_P3 Lane: 50 Base spacing: -13.4993105 44 bases in 563 scans Page 1 of 1



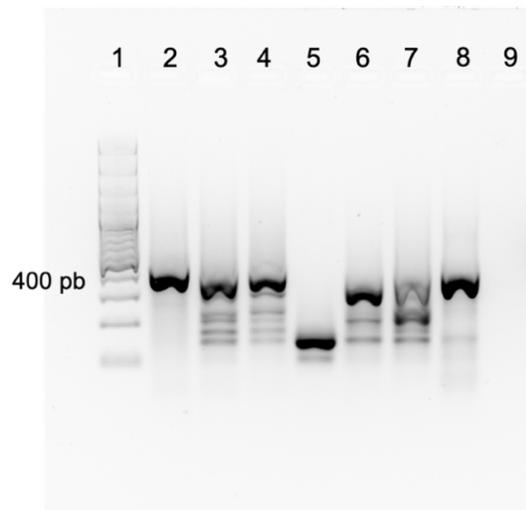
Anexo B-9: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-PCR del gen de cápside de GBVA (979 pb) en brotes de semilla de gulupa del oriente de Antioquia (carriles 2 al 17). Primers: GBVA_RT_F (5' GCA AAA GCA GAC ACC GAA CC 3') y GBVA_RT_R (5' TGT ATC TCT GCG TCT ATG GTG G 3'). Los carriles 18 y 19 corresponde al control positivo y negativo, respectivamente. Las muestras fueron posteriormente purificadas para secuenciación Sanger.



Anexo B-10: Electroferograma de un amplicón de RT-PCR del gen de la cápside de GBVA (979 pb), obtenido por el método de secuenciación Sanger utilizando los cebadores GBVA_RT_F (5' GCA AAA GCA GAC ACC GAA CC 3') y GBVA_RT_R (5' TGT ATC TCT GCG TCT ATG GTG G 3').



Anexo B-11: Electroforesis en gel de agarosa para la amplificación por RT-PCR del gen de cápside de PFYMV (~400 pb) en muestras de plantas en producción asintomáticas y sintomáticas de gulupa de Jardín y Jericó (carriles 3 al 8). Primers: Tymo_F_CP (5'- AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG -3') y Tymo_R_CP (5'- GAA TGG AGT TCG ATC GTG C-3') Los carriles 2 y 9 corresponden al control positivo y negativo, respectivamente.



Capítulo 3.

Natural infection of purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) by a novel member of the family *Tymoviridae* in Colombia

**Manuscrito preparado en el formato de la revista:
Acta Virologica (ISSN 0001-723X)**

Daniela Cardona Mejía

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: dcardonam@unal.edu.co

Andrea Restrepo Escobar

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: anrestrepoes@unal.edu.co

Mónica Higueta

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: mmhiguit@unal.edu.co

Yuliana Gallo

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

Pablo A. Gutiérrez

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

Mauricio Marín*

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

Summary. Purple passion fruit is one of the most important fruit exports of Colombia, but its productivity is being compromised by the emergence of several viral diseases. High-throughput sequence (HTS) surveys of viruses in purple passion fruit fields in the province of Antioquia suggested a new member of the family *Tymoviridae*. In this work, we characterize the complete genome sequence of this virus, tentatively named purple passionfruit leaf deformation virus (PpLDV) and study its distribution in Antioquia. PpLDV was assembled at high coverage in four datasets from different regions. The 6.1 kb genome of PpLDV encodes a single polyprotein with domains characteristic of the family *Tymoviridae*, contains a marafibox-like promoter and the 3'-UTR can fold into a tRNA-like secondary with a valine anti-codon. A phylogenetic analysis of the polyprotein revealed that PpLDV is a distinct member of the *Tymoviridae* more closely related to the genus *Tymovirus* and the unclassified Poinsettia mosaic virus (PnMV). The presence of PpLDV was confirmed by RT-qPCR and RT-PCR in samples from commercial purple passion fruit fields, plantlets and seeds sprouts collected in Antioquia using primers designed in this study.

*Corresponding author. E-mail: mamarinm@unal.edu.co; phone: +57-604-4309391.

Abbreviations: CABMV = cowpea aphid-borne mosaic virus; CMV = cucumber mosaic virus; CP = coat protein; Ct = cycle threshold; DEPC = diethylpyrocarbonate; dsRNA = double stranded RNA; ELV = erysimum latent virus; GBVA = gulupa bacilliform virus A; Hel = helicase; HRM = high resolution melting; HTS = high-throughput sequencing; JTT = Jones-Taylor-Thornton model; MP = movement protein; MRFV = Maize rayado fino virus; Mtr = methyl transferase; ORF = open reading frame; PFYMV = passion fruit yellow

mosaic virus; Pol = polymerase; PnMV = Poinsettia mosaic virus; PpLDV = purple passionfruit leaf deformation virus; Pro = protease; PVDP = Plant-Virus-Detection-Pipeline; RNAseq = RNA sequencing; rRNA = ribosomal RNA; RT-PCR = reverse transcription PCR; RT-qPCR = reverse transcription quantitative real-time PCR; SMV = soybean mosaic virus; TYMV = Turnip yellow mosaic virus; UTR = untranslated region

Keywords: High-throughput sequencing; *Marafivirus*; *Passifloraceae*; Plant virology; RT-qPCR; *Tymovirus*

Running title: Infection of purple passion fruit by a new tymoviridae

Introduction

Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*), a close relative of yellow passion fruit (*P. edulis* f. *flavicarpa*), has attracted worldwide attention on account of its great potential in the fresh fruit market and food processing industries (Fischer and Rezende, 2008; Melgarejo, 2019). Purple passion fruit is typically consumed fresh, but is also very popular in the preparation pastries, desserts, yoghurts, teas, alcoholic drinks, vinegars, sauces, and sweets (Fischer and Rezende, 2008; Ramaiya *et al.*, 2012). In addition to culinary uses, there is also an emerging pharmaceutical interest on the use of *P. edulis* extracts for the treatment of tumors (Kido *et al.*, 2020), wounds (Soares *et al.*, 2020), depression and anxiety (Alves *et al.*, 2020), inflammation (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019), hypertension, and diabetes (de Faveri *et al.*, 2020). Colombia is the top worldwide producer of purple passion fruit with exports totaling about 8700 tons per year mostly to

the United Kingdom, Belgium, and the Netherlands (Asohofrucol, 2021). Within the country, the province of Antioquia is the most efficient producer of purple passion fruit with a yield estimated at 22.2 t/ha which is significantly higher than the national average of 16.3 t/ha (Agronet, 2021). Purple passion fruit has become the most important agricultural exports of Colombia together with banana, cape gooseberry and avocado representing annual income of approximately 31 million USD (Melgarejo, 2019; Asohofrucol, 2021).

Unfortunately, the productivity of purple passion fruit in Colombia started to be seriously compromised by the rapid emergence of different viral diseases that remained uncharacterized until recent years (Jaramillo *et al.*, 2018, 2019; Sepúlveda *et al.*, 2021). To address this problem, a series of high throughput sequencing (HTS) surveys have been performed in the province of Antioquia. These studies have revealed that the most prevalent viruses infecting purple passion fruit in the region are the potyvirus soybean mosaic virus (SMV), the tymovirus passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV), the cucumovirus cucumber mosaic virus (CMV) and a new badnavirus tentatively named gulupa bacilliform virus A (GBVA) (tentative binomial name: *Badnavirus passiflorae*) (Jaramillo *et al.*, 2018, 2019; Sepúlveda *et al.*, 2021). In addition, serological and PCR-based methods suggest the circulation of the potyvirus cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) in the province of Cundinamarca (Camelo, 2010; Gordillo, 2011). Worldwide, about twenty virus species from the genera *Potyvirus*, *Polerovirus*, *Rhabdovirus*, *Carlavirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Tymovirus*, *Nepovirus* and *Begomovirus* are known to infect *P. edulis* (Fisher and Rezende, 2008; Jaramillo *et al.*, 2019; Liberato and Zerbini, 2020); however, this number is expected to increase because of the generalized use of HTS. In this work, we provide evidence for the existence of a

new virus of the family *Tymoviridae* naturally infecting purple passion fruit stands in the province of Antioquia using HTS, real-time RT-PCR (RT-qPCR), RT-PCR and Sanger sequencing.

Materials and Methods

Plant material. The four RNAseq datasets used in this study comprised samples from different tissues, RNA inputs, and regions within the province of Antioquia (Colombia) (Table 1; Fig. 1). Datasets BPE19 and BPE20 were generated from asymptomatic and symptomatic leaves collected at commercial plots in the municipalities of Jardín (5° 35' 50" N y 75° 50' 50" W) and Jericó (05°46'59"N, 75°46'59"W) in southwestern Antioquia; dataset BPE8-9 was derived from a bulked sample of randomly collected leaves from commercial purple passion fruit stands in the municipalities of Sonsón (5.7120° N, 75.3098° W), San Vicente (6.3033° N, 75.3179° W) and Rionegro (6.1409° N, 75.4112° W) in eastern Antioquia; the fourth dataset, BPE24, was generated from embryos of seeds collected in Jardín and Jericó. When observed, viral symptoms in adult plants included leafrolls, leaf deformations and rugose mosaics (Fig. 1).

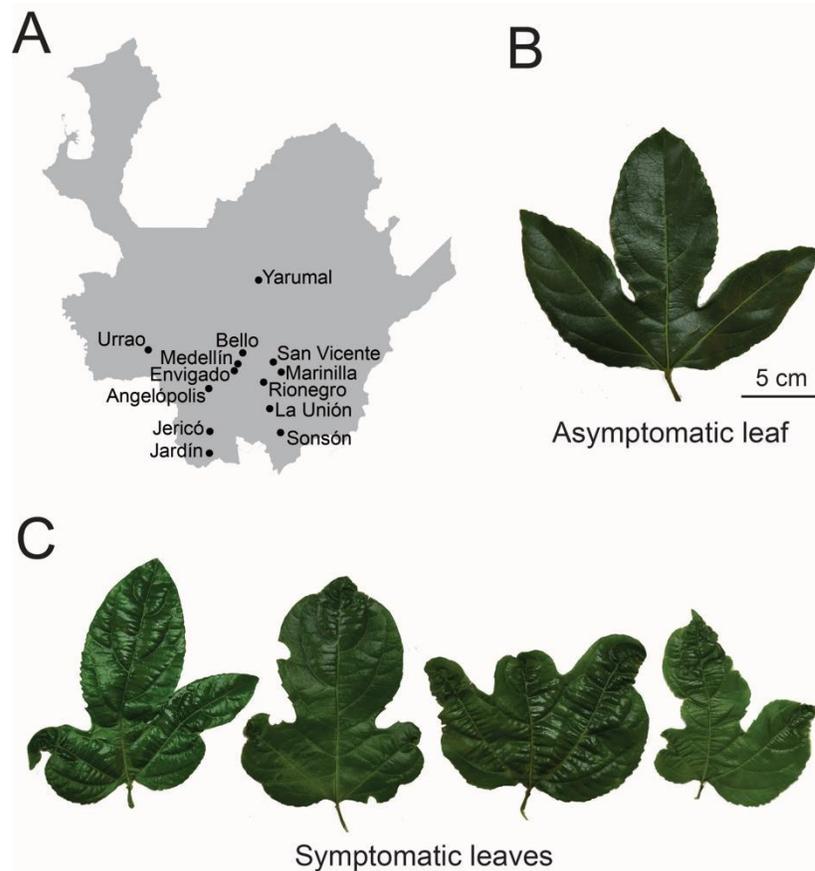


Fig. 1. Collection sites and symptoms of viral infection in purple passion fruit. A) Samples used in this study were collected in different municipalities from southwest, east, central, and northern Antioquia. B) Asymptomatic leaves exhibited the typical leaf morphology of *P. edulis* f. *edulis* consisting of three-lobed leaves with serrate margins and glossy surface. C) Symptomatic leaf samples exhibited extreme deformation characteristic of viral infections.

RNA extraction. Prior to extraction, plant tissue was ground into a fine powder using a mortar and a pestle in liquid nitrogen. RNAseq inputs for datasets BPE19 and BPE20 consisted of total RNA extracted from 100 mg of tissue using the Trizol method (Chomczynski and Sacchi, 1987). For the BPE24 dataset, total RNA was purified from

100 mg of seed-embryos using the GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Dataset BPE8-9 was generated from double stranded RNA (dsRNA) purified from 5 g of leaf tissue using the procedure described by Valverde and collaborators (1990) with Cellulose fibers (C6288 Medium, Merck, USA) equilibrated in 16.5% STE buffer (100mM NaCl, 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA at pH 8.0). Total RNA for quantitative (RT-qPCR) and standard RT-PCR was prepared by the Trizol method and eluted in 40 μ L of DEPC-treated water and preserved at -20°C until further use. RNA concentration and purity was determined using the A260/280 ratio measured in a Nanodrop 2000C spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

RNAseq. The quality and quantity of the RNA inputs for sequencing was assessed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). cDNA libraries for high-throughput RNA sequencing were synthesized with the TruSeq Stranded Total RNA LT Sample kit (Illumina, USA); ribosomal RNA (rRNA) was removed with the Ribo-Zero Plant kit (Illumina, USA). Sequencing was performed with the Illumina NovaSeq system service provided by Macrogen (South Korea). High-throughput sequencing resulted in datasets of 12,042,816 (BPE19), 13,373,989 (BPE20), 12,385,103 (BPE24), and 15,132,801 (BPE8-9) 101 nt paired-end reads (Table 1).

Table 1. Description of the RNAseq datasets used in this study.

Sample name	Tissue	Municipalities	Extraction method	Number of reads	<i>Tymoviridae</i> -like sequences (Percent identity)	Other viruses in the sample
-------------	--------	----------------	-------------------	-----------------	---	-----------------------------

BPE19	Asymptomatic leaves	Jardín Jericó	Total RNA (Trizol)	12,042,816	2,729 (81.9%)	GBVA
BPE20	Symptomatic leaves	Jardín Jericó	Total RNA (Trizol)	13,373,989	874 (81.8%)	GBVA SMV
BPE24	Seed embryos	Jardín Jericó	Total RNA (GeneJET)	12,385,103	889 (81.7%)	GBVA SMV
BPE8-9	Randomly collected leaves	Sonsón Rionegro San Vicente	dsRNA (Valverde <i>et al.</i> , 1990)	15,132,801	10,182 (81.4%)	GBVA PFYMV SMV

RT-qPCR and RT-PCR. Synthesis of cDNA as template for qPCR was carried out in a reaction volume of 20 μ L, including 200 U of RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA), 1X RT buffer, dNTPs at 0.5 mM, 20 units of RiboLock, 50-100 ng of total RNA, and 20 pmoles of reverse primer Gulupa_tymR_CP_6413 (5'-GATTCAGCGACGGACAACC-3'). Reactions were first incubated for 5 min at 65°C, followed by 1 hour at 42°C for 1 hour, and an inactivation step of 10 min at 70°C. Real time PCR reactions were carried out in a volume of 14 μ L that included 50-100 ng of cDNA, 0.3 μ M of primers qGulupa_tymF_CP_6314 (5'-CTCCGCCTAAGCCACCTTG-3') and Gulupa_tymR_CP_6413, and 6.25 μ L of Maxima SYBR Green/ROX reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Amplification of 100 bp of target sequences was performed under the following cycling conditions: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 35 cycles with 15 s at 95°C, and 60 s at 52°C. All reactions were carried out in a Rotor-Gene Q-5plex (Qiagen, Germany) cycler, and data analyzed using the Q-Rex Software. Melting curves were acquired on the green channel by measuring the change in fluorescence in the 50-99°C range. Each run included a positive control sample for the new virus; negative controls contained all the elements of the reaction mixture minus the template. The sequence of selected RT-qPCR amplicons was confirmed by Sanger sequencing after purification from a 2% agarose gel using the GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Partial genome amplification was performed by RT-PCR using the Verso 1-step RT-qPCR Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) with primers Gulupa_tymF_CP (5'-CTCAACCTTCTGTCCACTCC-3') and Gulupa_tymR_CP_6413 targeting the CP

region; and Gulupa_tymF_MT (5'-CCTCGTCCCTTTCCTATCCC-3') and Gulupa_tymR_MT (5'-AGAGCGTCATACACCTTTCG-3') targeting the Mtr region. All Primers were designed with PrimerBLAST (Ye *et al.*, 2012) using the assembled genome as reference.

Bioinformatic analyses. Preliminary detection of viral sequences was performed with the Plant Virus Detection Platform, PVDP (Gutiérrez *et al.*, 2021). Viral sequences were assembled *de novo* with rnaSPAdes (Bushmanova *et al.*, 2019). High quality contigs from rnaSPAdes exhibiting significant sequence similarity to members of the family *Tymoviridae* were selected with dc-megablast (Altschul *et al.*, 1997) using a custom database comprising all available sequences at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Assemblies were inspected manually for potential errors using the Integrative Genomics Viewer software (Robinson *et al.*, 2017) after mapping reads with MagicBLAST (Boratyn *et al.*, 2019). The open reading frame (ORF) encoding the viral polyprotein and its protein motifs were identified with ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), and PFAM (El-Gebali *et al.*, 2019), respectively. RNA secondary structural motifs were identified with RNAfold (Gruber *et al.*, 2008). Phylogenetic analyses were performed in MEGA X with the Neighbor-Joining method and 1000 bootstrap replicates (Kumar *et al.*, 2018). The evolutionary distances were computed using the JTT method (Jones *et al.*, 1992) for amino acid sequences and the Tamura-Nei method (Tamura and Nei, 1993) for nucleotide sequences.

Results and Discussion

Identification, assembly, and characterization of tymoviridae-like sequences

In addition to viruses known to infect purple passion fruit in Colombia such as SMV, PFYMV, and GBVA, analysis of purple passion fruit datasets from adult plants and planting material using the PVDP platform (Gutiérrez *et al.*, 2021) often detected a large number of sequences with nucleotide identities in the 81.4 to 81.9% range to members of the genera *Tymovirus*, *Marafivirus*, and *Maculavirus* (Table 1). Data mining of *de novo* assemblies containing tymoviridae-like sequences revealed the presence of contigs of about 6.5 kb in length with very high sequence coverages of 872.0x (BPE19), 359.3x (BPE20), 177.6x (BPE24), and 4,612.8x (BPE8-9) and molecular features typical of members of the family *Tymoviridae* (Fig. 2A). The assembled contigs contained a single open reading frame of 6,137 nt (185-6,322) encoding a polyprotein of 2,405 amino acids with a theoretical molecular weight of 227.7 kDa (Fig. 2A). The predicted polyprotein contains a viral methyltransferase domain (Mtr, Pfam:PF01660, E-value:2.9e-59) typical of ssRNA viruses (Kong *et al.*, 1999) at amino acid positions 38-319; an endopeptidase domain (Pro, Pfam:PF05381, E-value:5.5e-18) of the Merops family C21 typical of tymoviruses (Rozanov, *et al.*, 1995) at 750-857; a viral helicase domain (Hel, Pfam:PF01443, E-value:2.3e-44) (Ahola *et al.*, 2000) at 983-1,171; an RNA-dependent RNA-polymerase domain (Pol, Pfam:PF00978, E-value:1.1e-13) at 1,440-1743; and a tymovirus coat protein domain (Pfam: PF00983, E-value:2.9e-30) at 1,864-2044. Genome expression of viruses in the family *Tymoviridae* involves autocatalytic cleavage of the replication polyprotein which are predicted at positions 854, and 1,224 between the Pro/Hel, and Hel/Pol domains (Fig. 2A, B). A motif with the sequence 5'-CAGGGUGAAUUGCUC-3', and identical to the marafibox found in maize rayado fino virus (MRFV) and Poinsettia mosaic virus (PnMV), was identified at positions 5,690-5,710 (Fig. 2C). Inspection of untranslated 5'-terminal regions for the formation of secondary

RNA structures revealed the potential formation of three stem-loops at positions 48-86, 100-134, and 151-166 with free energies of -10.31, -11.7, and -4.71 kcal/mol, respectively (Fig. 2D). The assembled contigs do not contain a poly(A) tract 3' end, however, the 3'-UTR can fold into a tRNA-like secondary structure of -35.7 kcal/mol at positions 6,376-6,487 with four stem-loops and a 5'-CAC-3' val anti-codon in agreement with the 3'-terminal tRNA-like structures of some members of the family *Tymoviridae* (Rietveld *et al.*, 1982; Stephan *et al.*, 2008) (Fig. 2D).

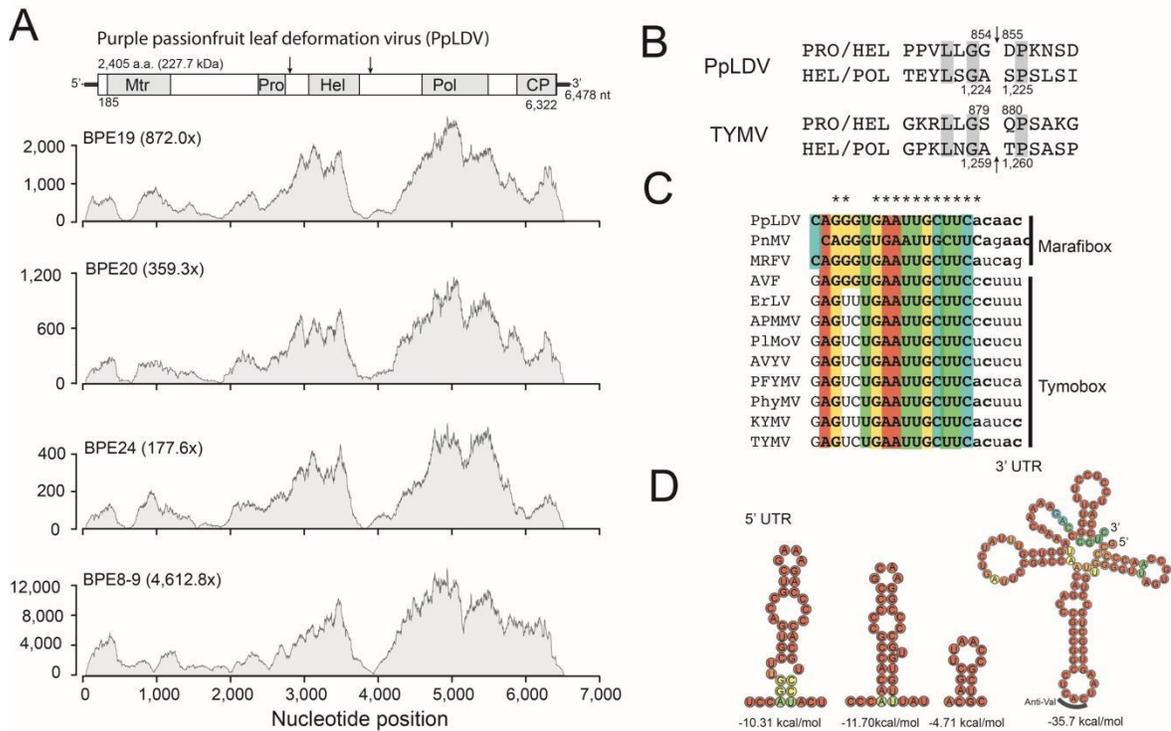


Fig. 2. General description of the purple passionfruit leaf deformation virus (PpLDV) genome. A) Genome feature of the assembled genomes illustrating the relative position of functional domains and putative protease cleavage sites (arrows). Sequence coverage plots for each assembly are shown at the bottom. B) Predicted protease cleavage sites of the PpLDV polyprotein compared with respect to TYMV. C) Sequence alignment of the

marafi- and tymoboxes with the corresponding sequence in PpLDV. D) Secondary structure elements predicted at the 5'- and 3'- untranslated regions of PpLDV.

A comparison of amino acid sequences of functional domains revealed 30.8–64.1% identities with the genera *Marafivirus*, *Maculavirus* and *Tymovirus* in the family *Tymoviridae* (Table 2). The most similar segments corresponded to the Mtr, Hel, and Pol domains with identities in the 46.8 to 64.1% range. The Pro and CP regions were the most variable regions with amino acids identities in the 26.9–43.3% range and nucleotides identities in the 39.4–50.4% range (Table 2).

Table 2. Comparison of the PpLDV amino acid sequences of functional domains with equivalent regions from different members of the family *Tymoviridae*. Sequence identities at nucleotide level reveal are shown in parenthesis.

Virus species	MTr4	Pro	Hel	Pol	CP
<i>Tymovirus</i>					
Andean potato mild mosaic virus (APMMV)	54.0 (55.5)	39.8 (42.3)	50.6 (53.0)	63.9 (60.5)	34.4 (48.7)
Physalis mottle virus (PhyMV)	56.3 (56.4)	35.5 (46.6)	47.2 (51.9)	58.9 (59.0)	31.8 (44.1)
Plantago mottle virus (PIMoV)	59.0 (56.7)	38.7 (39.8)	53.2 (53.7)	60.7 (58.8)	35.0 (48.7)
Anagyris vein yellowing virus (AVYV)	57.0 (58.3)	33.3 (39.8)	53.6 (54.9)	60.8 (59.1)	38.9 (49.6)
Turnip yellow mosaic virus (TYMV)	59.3 (56.8)	37.6 (45.9)	49.6 (53.7)	60.3 (60.0)	30.8 (45.5)
Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV)	59.2 (56.7)	34.4 (46.2)	54.0 (55.3)	60.0 (59.5)	36.9 (48.5)
Kennedya yellow mosaic virus (KYMV)	63.8 (59.9)	36.6 (41.6)	49.4 (51.5)	59.6 (60.8)	35.7 (50.4)
Erysimum latent virus (ErLV)	55.4 (55.2)	26.9 (44.4)	49.4 (54.6)	58.6 (58.1)	36.5 (47.3)
<i>Maculavirus</i>					
Grapevine fleck virus (GFkV)	50.0 (53.8)	38.2 (46.8)	53.6 (56.6)	57.9 (58.9)	31.9 (46.4)
<i>Marafivirus</i>					
Alfalfa virus F (AVF)	52.2 (56.0)	37.6 (46.2)	55.3 (57.0)	62.9 (61.7)	39.8 (49.2)
Maize rayado fino virus (MRFV)	53.7 (56.7)	43.3 (48.5)	54.0 (54.3)	61.5 (57.7)	38.7 (49.1)

Unclassified					
Poinsettia mosaic virus (PnMV)	51.8 (54.5)	41.9 (46.2)	55.3 (55.2)	64.1 (61.1)	36.9 (49.2)
<u>Bombyx mori latent virus (BmMLV)</u>	<u>47.8 (51.5)</u>	<u>30.1 (39.4)</u>	<u>46.8 (51.2)</u>	<u>56.8 (57.8)</u>	<u>33.1 (44.3)</u>

A phylogenetic analysis based on the amino acid sequences corresponding to the Mtr-Pro-Hel-Pol segment of approved members of the family *Tymoviridae* revealed that all assembled sequences formed a well-defined cluster with 100% bootstrap and basal to known members of the genus *Tymovirus* and closely related to PnMV which has yet to be assigned to a genus (Fig. 3). This result suggests that the identified virus probably represents a new tymoviridae species for which we suggest the name purple passionfruit leaf deformation virus (PpLDV).

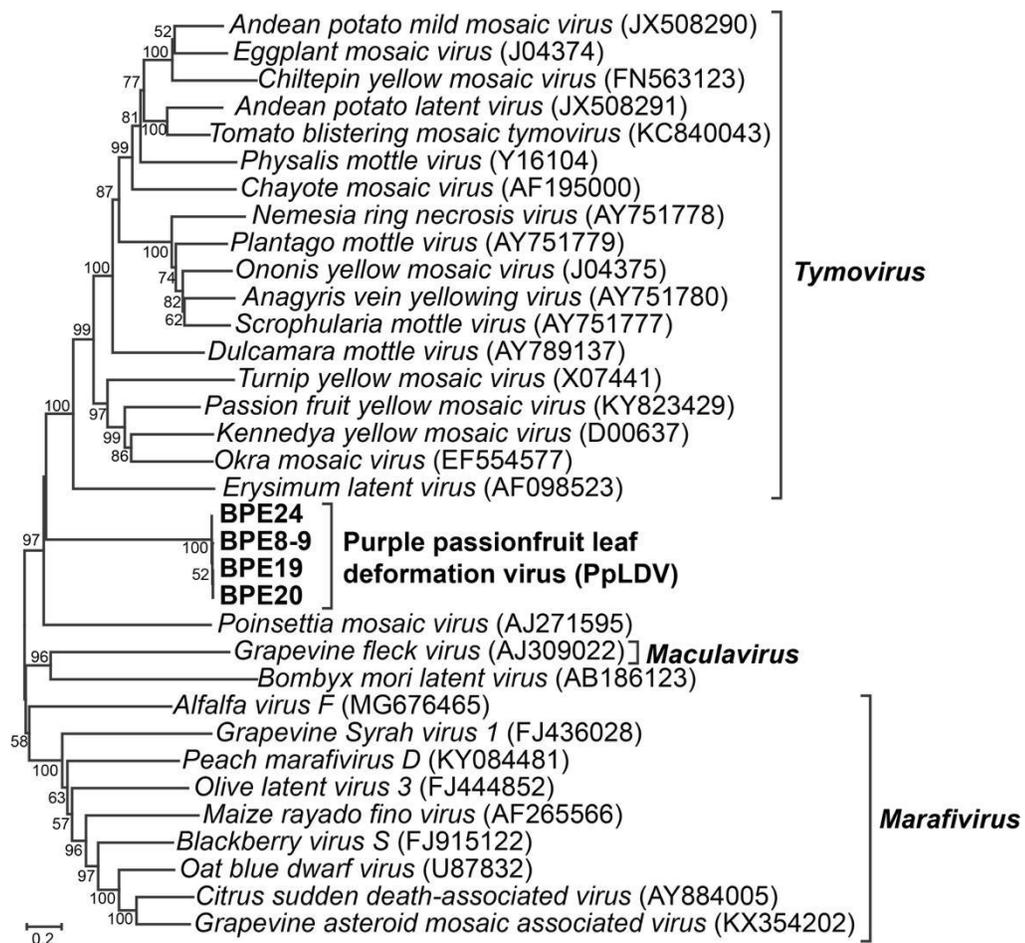


Fig. 3. Relationship of purple passionfruit leaf deformation virus (PpLDV) to other members of the family Tymoviridae. The phylogenetic tree obtained using the Mtr-Pro-Hel-Pol region of the polyprotein reveals that PpLDV is a distinct member of the family Tymoviridae, basal to the genus Tymovirus, and related to Poinsettia mosaic virus (PnMV) yet to be assigned a genus within the family.

Currently, the family Tymoviridae comprises the genera Tymovirus (28 species), Marafivirus (11 species), and Maculavirus (one species), in addition to Bombyx mori latent virus (BmLV) and Poinsettia mosaic virus (PnMV) which has not been assigned to a genus (ICTV Master Species List #3, 6 March 2021; <https://talk.ictvonline.org>). Viruses in

this family have isometric virions non-enveloped, about 30 nm in diameter with a single stranded RNA genome of positive sense of about 6.0-7.5 kb, high cytosine content (32-50%), a 5' end m7G cap and most of them have a tRNA-like at the 3'-end (King *et al.*, 2012). At the molecular level, a genus within the family can be distinguished based on the number of ORFs, the presence of characteristic regulatory sequences, and molecular features of the 3'UTR: the genus *Tymovirus* contain three ORFs, a tymobox, and a tRNA-like structure at the 3'-end; *Marafivirus* encode a single ORF, contain a marafibox, and have 3'-terminal poly(A) tail, while *Maculavirus* have four ORFs and a poly(A) tail. PpLDV has a C content of 32.0% and shares several features typical of the genus *Marafivirus*: it lacks an ORF encoding for a movement protein (MP), encodes a single polyprotein, and contains a sgRNA promoter identical to the marafibox. However, the genome of marafiviruses, and also of maculaviruses and PnMV, are polyadenylated at the 3' terminus; this contrast with the tRNA^{val}-like motif found in PpLDV which is most typical of tymoviruses. PpLDV is also more phylogenetically closely related to members of the genus *Tymovirus* than all other known genera (Fig. 3; Table 2). PpLDV is clearly a new species within the family *Tymoviridae* and probably represent a member of a new genus; future work should clarify the taxonomic status of this virus.

RT-qPCR and RT-PCR

The presence of PpLDV was confirmed in a new set of samples from commercial purple passion fruit fields, plantlets and seeds sprouts collected in the municipalities of Jardín, Jericó, Urrao, Angelópolis, Sonsón, San Vicente Ferrer, Marinilla, Yarumal, Rionegro, Bello, Envigado, and Medellín (Fig. 1A). Detection was performed using RT-qPCR with specific primers targeting the 6314-6413 CP region. Amplicons exhibited a melting point

of $84.7 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4A), had the expected size of 100 bp (Fig. 4B) and were confirmed by Sanger sequencing (data not shown). In seed sprouts, PpLDV was detected in samples from southwest Antioquia collected at the municipalities of Jericó and Jardín. In plantlets, this virus was detected in one sample from Marinilla (east), two from Yarumal (north), and one from Jardín, and Jericó in the southwest (Fig. 4C). PpLDV was most prevalent in adult plants, being detected in six asymptomatic samples from Jardín and Jericó, two from San Vicente Ferrer and one from Sonsón. In symptomatic plants, the virus was detected in eight samples from Jardín and Jericó, and one sample from Sonsón and San Vicente Ferrer (Fig. 4C). Ct ranged from 9.4 to 28.1 and were higher in samples collected from Jericó with Ct values of 9.4 in one asymptomatic sample, and 9.8 and 13.2 in symptomatic samples (Fig. 4C). In addition, to RT-qPCR, the presence of PpLDV was confirmed by RT-PCR amplification of regions within the MTr (747 bp) and CP (638 bp) domains of PpLDV from three RT-qPCR positive samples (Fig. 5A). Amplicons shared 97.1-100% nucleotide sequence identities with the assembled PpLDV genomes and phylogenetic analysis of the Sanger consensus formed a well-defined clade for PpLDV with 100% bootstrap and clearly separated from its closest relatives *erysimum latent virus* (ELV) and PnMV (Fig. 5B).

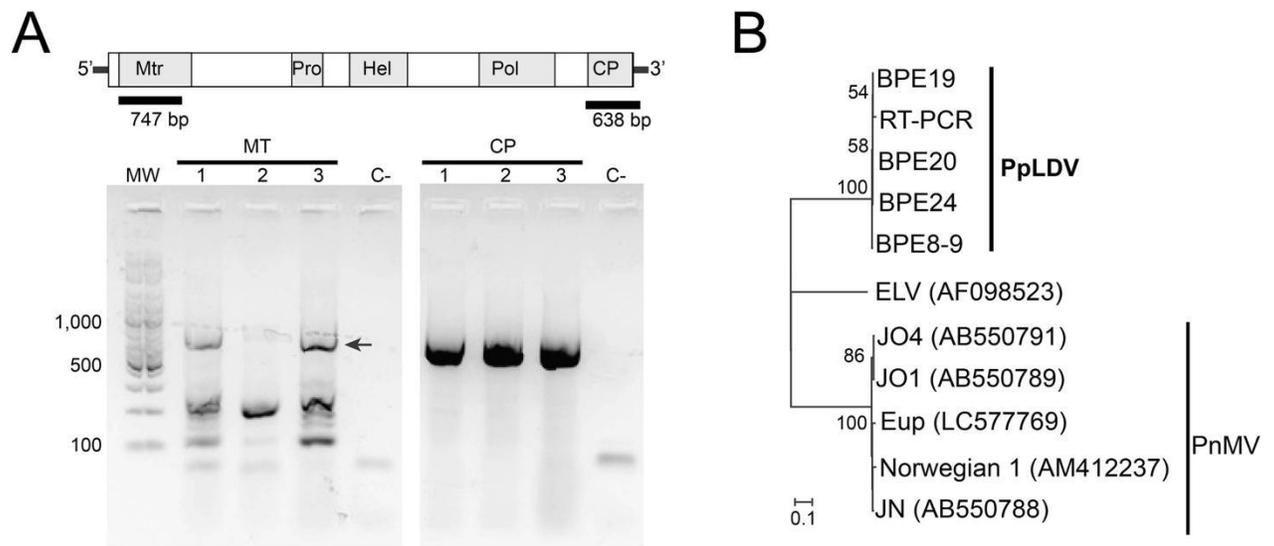


Fig. 5. Detection of PpLDV by standard RT-PCR. A) Agarose gel electrophoresis of amplification products using specific primers targeting the Mtr and CP regions of the PpLDV polyprotein. Bands of the expected molecular size were observed in each case. For the Mtr amplifications products, the arrow indicates the bands purified for Sanger sequencing. B) Neighbor-joining tree of the consensus Sanger sequence comprising the Mtr and CP amplicons confirms the identity of the amplified virus as PpLDV.

This work strongly suggests the existence of a new virus member of the family *Tymoviridae* that naturally infects purple passion fruit in Antioquia (Colombia), an adds yet another species to approximately twenty viruses known to infecting this crop across the world (Fisher and Rezende, 2008; Jaramillo *et al.*, 2019; Liberato and Zerbini, 2020). The virome of purple passion fruit and related crops remains largely unexplored as evidenced by the recent reports of the begomoviruses (*Geminiviridae*) passion fruit chlorotic mottle virus (PCMoV) and Melochia yellow mosaic virus (MeiYMV) discovered in Mato Grosso do Sul in Brazil (Fontenele *et al.*, 2018; Spadotti *et al.*, 2019); cotton leaf curl Multan virus

(CLCuMuV) and its cotton leaf curl Multan betasatellite (CLCuMuB) from Yunnan province in China (Tang *et al.*, 2020); and passion fruit leaf distortion virus (PLDV) discovered in yellow passion fruit in Valle del Cauca in Colombia (Vaca-Vaca *et al.*, 2017). With respect to RNA viruses, recent reports include cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) (*Polerovirus*, *Luteoviridae*) reported in mixed infection with CABMV in yellow passion fruit in Bahia (Brazil) (Vidal *et al.*, 2018), and the potyviruses *Passiflora edulis* symptomless virus (PeSV) (*Roymovirus*) from Israel (Jover-Gil *et al.* 2018) and *Passiflora* virus Y (PaVY) from Guangdong province in China (Chen *et al.*, 2021). The information presented here will be of value for future disease management programs and the production of certified planting material of purple passion fruit in Colombia. Future work should address the distribution of this virus in different regions in the country, means of transmission, cross infectivity in related crops such as yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and sweet passion fruit (*Passiflora ligularis*) in Colombia and other *Passiflora*-growing countries as well as its basic biology.

Acknowledgments. This work was funded by Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación

del Sistema General de Regalías del Departamento de Antioquia (Colombia) under grant #1101-805-62786 (Convenio # 4600007658–779) and supervision of Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colombia). Plant samples were collected using permission RGE152-26 from Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia (Resolution 0209, March 9, 2020).

References

Agronet (2021): Red de información y comunicación del sector Agropecuario Colombiano.

<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx>

Ahola T, den Boon JA, Ahlquist P (2000): Helicase and capping enzyme active site mutations in brome mosaic virus protein 1a cause defects in template recruitment, negative-strand RNA synthesis, and viral RNA capping. *J. Virol.* 74, 8803-8811.

<https://dx.doi.org/10.1128/jvi.74.19.8803-8811.2000>

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

<https://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

Alves JSF, Silva AMDS, da Silva RM, Tiago PRF, de Carvalho TG, de Araújo Júnior RF, de Azevedo EP, Lopes NP, Ferreira LS, Gavioli EC, da Silva-Júnior AA, Zucolotto SM (2020): In Vivo antidepressant effect of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* into cationic nanoparticles: improving bioactivity and safety. *Pharmaceutics* 12, 383.

<https://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12040383>.

Asohofrucol (2021): Balance del sector hortifrutícola 2020.

<https://www.agriculturayganaderia.com/website/wp-content/uploads/2020/12/BALANCE-D-EL-SECTOR-HORTIFRUT%C3%8DCOLA-2020-PROYECCIONES-2021.docx>

Boratyn GM, Thierry-Mieg D, Busby B, Madden TL (2019). Magic-BLAST, an accurate DNA and RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics* 20, 405.

<https://doi.org/10.1186/s12859-019-2996-x>

Bushmanova E, Antipov D, Lapidus A, Prjibelski AD (2019): rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data, *GigaScience* 8, 1-13. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz100>

Camelo VM (2010): Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región del Sumapaz (Cundinamarca). Master's Thesis in Phytopathology. Faculty of Agronomy. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 60 p.

Carmona-Hernandez JC, Taborda-Ocampo G, Valdez JC, Bolling BW, González-Correa CH (2019): Polyphenol extracts from three Colombian Passifloras (Passion Fruits) prevent inflammation-induced barrier dysfunction of Caco-2 Cells. *Molecules* 24, 4614. <https://doi.org/10.3390/molecules24244614>

Chen B, Wu D, Zheng H, Li G, Cao Y, Chen J, Yan F, Song X, Lin L (2021): Complete genome sequence of passiflora virus Y infecting passion fruit in China. *Arch. Virol.* 166, 1489-1493. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05013-1>.

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Bioch.* 162, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2).

De Faveri A, De Faveri R, Broering MF, Bousfield IT, Goss MJ, Muller SP, Pereira RO, de Oliveira E Silva AM, Machado ID, Quintão NLM, Santin JR (2020): Effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.) in cafeteria diet-induced metabolic disorders. *J. Ethnopharmacol.* 250, 112482. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112482>

El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A, Sonnhammer ELL, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto SCE, Finn RD (2019): The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, D427-D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>.

Fischer IH, Rezende JAM (2008): Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technol.* 2, 1-19.

Fontenele RS, Abreu RA, Lamas NS, Alves-Freitas DMT, Vidal AH, Poppiel RR, Melo FL, Lacorte C, Martin DP, Campos MA, Varsani A, Ribeiro SG (2018): Passion fruit chlorotic mottle virus: molecular characterization of a new divergent geminivirus in Brazil. *Viruses* 10, E169. <https://doi.org/10.3390/v10040169>

Gordillo LA (2011): Incidencia del Soybean mosaic virus en cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia. Master's Thesis in Microbiology. Faculty of Sciences. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 106 p.

Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL (2008): The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res.* 36, W70-W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>

Gutiérrez P, Rivillas A, Tejada D, Giraldo S, Restrepo A, Ospina M, Cadavid S, Gallo Y, Marín M (2021): PVDP: A portable open source pipeline for detection of plant viruses in RNAseq data. A case study on potato viruses in Antioquia (Colombia). *Physiol. Mol. Plant Path.* 113, 101604. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101604>

ICTV (2021): International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/>

Jaramillo H, Marín M, Gutiérrez P (2018): Molecular characterization of Soybean mosaic virus (SMV) infecting Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia, Colombia. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 51, 617-636. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1505411>

Jaramillo H, Marín M, Gutiérrez P (2019): Complete genome sequence of a Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*). Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 72, 8643-8654. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n1.69438>

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992): The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput. Appl. Biosci. 8: 275-282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>

Jover-Gil S, Beeri A, Fresnillo P, Samach A, Candela H (2018): Complete genome sequence of a novel virus, classifiable within the *Potyviridae* family, which infects passion fruit (*Passiflora edulis*). Arch. Virol. 163, 3191-3194. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3983-7>

Kido LA, Hahm ER, Kim SH, Baseggio AM, Cagnon VHA, Singh SV, Maróstica MR Jr (2020): Prevention of prostate cancer in transgenic Adenocarcinoma of the mouse prostate mice by yellow passion fruit extract and antiproliferative effects of its bioactive compound piceatannol. J. Cancer Prev. 25, 87-99. <https://doi.org/10.15430/JCP.2020.25.2.87>.

King AMQ (2012): Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego.

Kong F, Sivakumaran K, Kao C (1999): The N-terminal half of the brome mosaic virus 1a protein has RNA capping-associated activities: specificity for GTP and S-adenosylmethionine. *Virology* 259, 200-210. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9763>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018): MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Liberato JR, Zerbini FM (2020): Diseases of Passionfruit (*Passiflora* spp.). <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Passionfruit.aspx>

Melgarejo LM (2019): Gulupa (*Passiflora edulis*), curuba (*Passiflora tripartita*), aguacate (*Persea americana*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*): Innovaciones. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79864>

Ramaiya SD, Bujang JS, Zakaria MH, King WS, Shaffiq Sahrir MA (2013): Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 93, 1198–1205. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5876>

Rietveld K, Van Poelgeest R, Pleij CW, Van Boom JH, Bosch L (1982): The tRNA-like structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA. *Nucleic Acids Res.* 10, 1929-1946. <https://doi.org/10.1093/nar/10.6.1929>

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011): Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnol.* 29, 24-26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>

Rozanov MN, Drugeon G, Haenni AL (1995): Papain-like proteinase of turnip yellow mosaic virus: a prototype of a new viral proteinase group. *Arch. Virol.* 140, 273-288. <https://doi.org/10.1007/BF01309862>

Sepúlveda M, Cardona D, Gallo Y, Higuaita M, Gutiérrez P, Marín M (2021): Virome analysis for identification of viruses associated with asymptomatic infection of purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Colombia, J. Hortic. Sci. Biotechnol. *In press*. <https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1973583>

Soares RDF, Campos MGN, Ribeiro GP, Salles BCC, Cardoso NS, Ribeiro JR, Souza RM, Leme KC, Soares CB, de Oliveira CM, Elston LB, da Fonseca CCP, Ferreira EB, Rodrigues MR, Duarte SMS, Paula FBA (2020): Development of a chitosan hydrogel containing flavonoids extracted from *Passiflora edulis* leaves and the evaluation of its antioxidant and wound healing properties for the treatment of skin lesions in diabetic mice. J. Biomed. Mater. Res. 108, 654-662. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36845>. Epub 2019 Dec 4.

Spadotti DMA, Bello VH, Favara GM, Stangarlin OS, Krause-Sakate R, Rezende JAM (2019): *Passiflora edulis*: new natural host of Melochia yellow mosaic virus in Brazil. Australas. Plant Dis. Notes 14, 23. <https://doi.org/10.1007/s13314-019-0354-5>

Stephan D, Siddiqua M, Ta Hoang A, Engelmann J, Winter S, Maiss E (2008): Complete nucleotide sequence and experimental host range of Okra mosaic virus. Virus Genes 36, 231-240. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0181-1>

Tamura K, Nei M (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10, 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.

Tang Y, He Z, Zhou G (2020): *Passiflora edulis* is a new host of Cotton leaf curl Multan virus–betasatellite complex in China. Can. J. Plant Pathol. 42, 493-498. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1706640>

Vaca-Vaca JC, Carrasco-Lozano EC, López-López K (2017): Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. Arch. Virol. 162, 573-576. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3098-y>

Valverde R, Nameth S, Jordan R (1990): Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Dis. 74, 255–258. <https://doi.org/10.1094/PD-74-0255>

Vidal AH, Sanches MM, Alves-Freitas DMT, Abreu EFM, Lacorte C, Pinheiro-Lima B, Rosa RCC, Jesus ON, Campos MA, Varsani A, Ribeiro SG (2018): First World Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus infecting Passionfruit. Plant Dis. 102, 2665. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0694-PDN>

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012): Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

Municipio	Muestra	PpLDV	
		Tm	Ct
PLANTAS EN PRODUCCIÓN ASINTOMÁTICAS			
Sonsón	PE24	-	>35
Sonsón	PE25	-	>35
Sonsón	PE26	-	>35
Sonsón	PE27	84,3	16,84
San Vicente Ferrer	PE28	84,0	17,62
San Vicente Ferrer	PE29	-	>35
San Vicente Ferrer	PE30	84,5	13,80
San Vicente Ferrer	PE31	-	>35
Marinilla	PE48	-	>35
Sonsón	PE52	-	>35
PLANTAS EN PRODUCCIÓN SINTOMÁTICAS			
Sonsón	PE33	-	>35
Sonsón	PE34	84,3	15,31
Sonsón	PE35	-	>35
Sonsón	PE36	-	>35
San Vicente Ferrer	PE37	-	>35
San Vicente Ferrer	PE38	-	>35
San Vicente Ferrer	PE39	85,0	19,29
San Vicente Ferrer	PE40	-	>35
Marinilla	PE47	-	>35
Sonsón	PE51	-	>35
Marinilla	PE63	-	>35
PLÁNTULAS			
Marinilla	PE64	84,2	33,02
Envigado	PE74	84,3	32,87
La Bendición	PE93	84,0	33,21
La Bendición	PE96	83,8	33,94
Yarumal C.E.	PE97	84,3	33,23

C. Anexos: Capítulo 3

Anexo C-1: Muestras de *Passiflora edulis* f. *edulis* (PE) evaluadas indicando el origen, código de la muestra y los valores de Tm y Ct para PpLDV (purple passion fruit leaf deformation virus) en el oriente antioqueño.

Anexos C-1: (Continuación)

Municipio	Muestra	PpLDV	
		Tm	Ct
PLANTAS EN PRODUCCIÓN ASINTOMÁTICAS			
Jardín	PE105	84,8	27,55
Jardín	PE106	85,0	26,13
Jardín	PE107	84,5	29,45
Jericó	PE108	-	>35
Jericó	PE110	-	>35
Jericó	PE112	84,5	28,07
Jericó	PE113	84,7	27,86
Jericó	PE114	84,7	9,40
Jardín	PE116	-	>35
Jardín	PE118	-	>35
PLANTAS EN PRODUCCIÓN SINTOMÁTICAS			
Jardín	PE121	84,5	20,42
Jardín	PE122	84,5	27,20
Jardín	PE123	84,7	30,24
Jericó	PE124	-	>35
Municipio	Muestra	PpLDV	
		Tm	Ct
Yarumal C.E.	PE98	84,5	26,21
Yarumal C.E.	PE99	-	>35
Yarumal C.E.	PE100	84,0	29,39
Biopass	PE102	-	>35
BROTOS DE SEMILLA			
Belén 1	PE78	-	>35
Bello	PE79	-	>35
Belén 2	PE80	-	>35
Minorista	PE81	-	>35

Colombia	PE82	-	>35
La Esquina	PE83	-	>35
R.G	PE84	-	>35
Plaza de Flores	PE85	-	>35
La Esquina	PE86	-	>35
Poblado	PE87	-	>35

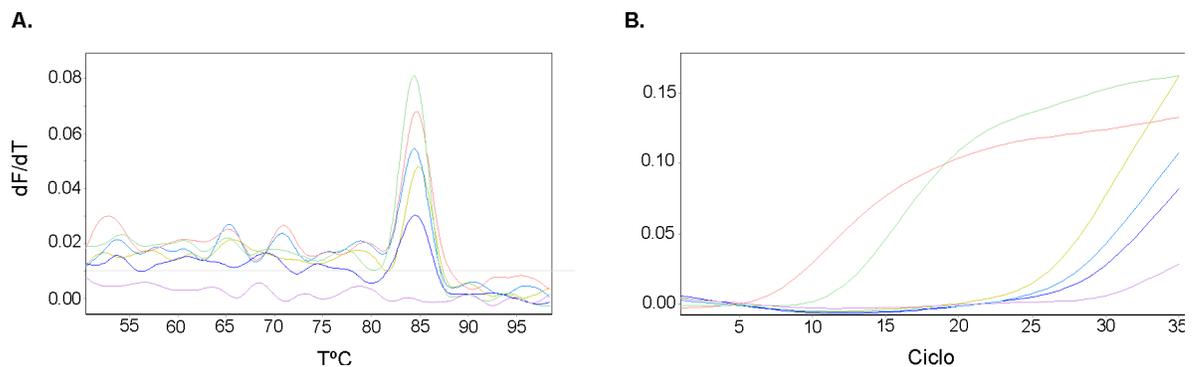
Anexo C-2: Muestras de *Passiflora edulis* f. *edulis* (PE) evaluadas indicando el origen, código de la muestra y los valores de Tm y Ct para PpLDV en el suroeste antioqueño.

Anexos C-2: (Continuación)

Municipio	Muestra	PpLDV	
		Tm	Ct
Jericó	PE126	84,5	13,18
Jericó	PE128	84,5	25,96
Jericó	PE129	-	>35
Jericó	PE130	85,2	9,77
Jardín	PE132	-	>35
Jardín	PE134	85,0	20,19
PLÁNTULAS			
Jericó	PE136	84,5	23,92
Jardín	PE138	-	>35
Jardín	PE140	-	>35
Jardín	PE142	85,0	29,38
Jericó	PE144	-	>35
Urrao	PE169	-	>35
Urrao	PE170	-	>35
Urrao	PE171	-	>35
Urrao	PE172	-	>35
Angelópolis	PE173	-	>35
BROTOS DE SEMILLA			
Jardín	PE135	-	>35
Jardín	PE145	-	>35
Jericó	PE146	-	>35
Jericó	PE147	85,3	17,72

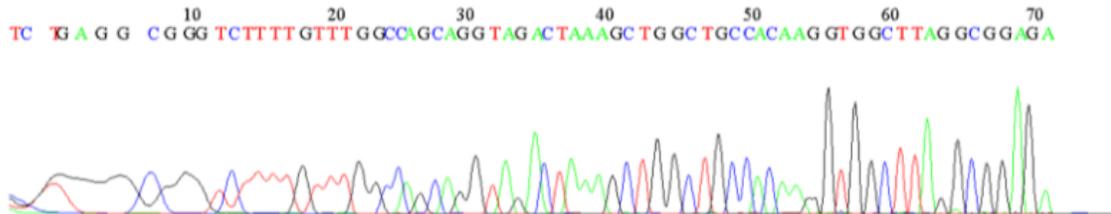
Jericó	PE148	-	>35
Jericó	PE149	-	>35
Jardín	PE151	-	>35
Jardín	PE152	85,0	22,34
Jardín	PE153	-	>35
Jericó	PE154	-	>35

Anexo C-3: Detección molecular de PpLDV a partir de tejido foliar de gulupa del suroeste antioqueño, mediante RT-qPCR. (A). Curvas de melting de $84.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$ Primers: qGul_tymF_CP_6314 (5'-CTCCGCCTAAGCCACCTTG-3') y Gul_tymR_CP_6413 (5'-GATTCAGCGACGGACAACC-3') (B). Curvas de amplificación.



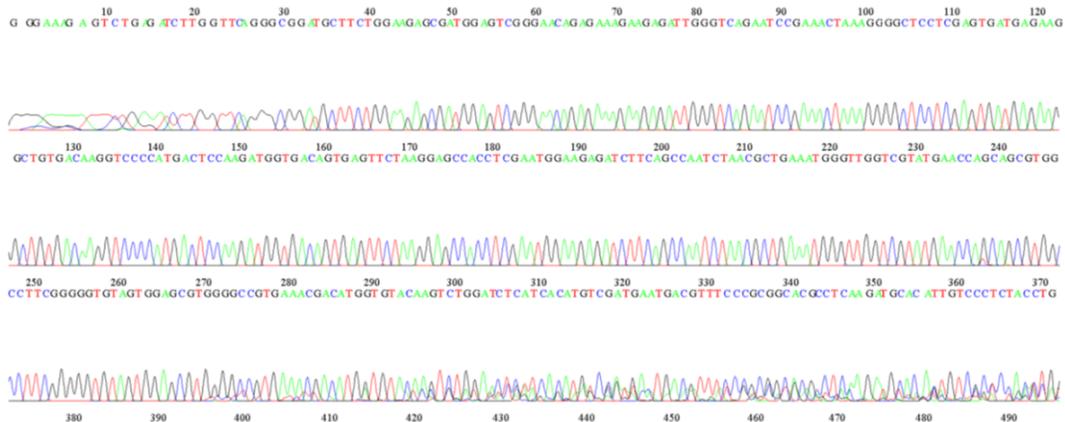
Anexo C-4: Electroferograma de un amplicón de RT-qPCR del gen de la cápside de PpLDV (100 pb) para la muestra BPE19, obtenido por el método de secuenciación Sanger utilizando los primers Gul_tymR_CP_6413 (5'-GATTCAGCGACGGACAACC-3') y qGul_tymF_CP_6314 (5'-CTCCGCCTAAGCCACCTTG-3').

File: 37SEP_P55.ab1 Run Ended: 2021/10/13 22:35:1 Signal G:10091 A:3684 C:7572 T:5121
 Sample: 37SEP_P55 Lane: 89 Base spacing: -13.4993105 71 bases in 938 scans Page 1 of 1

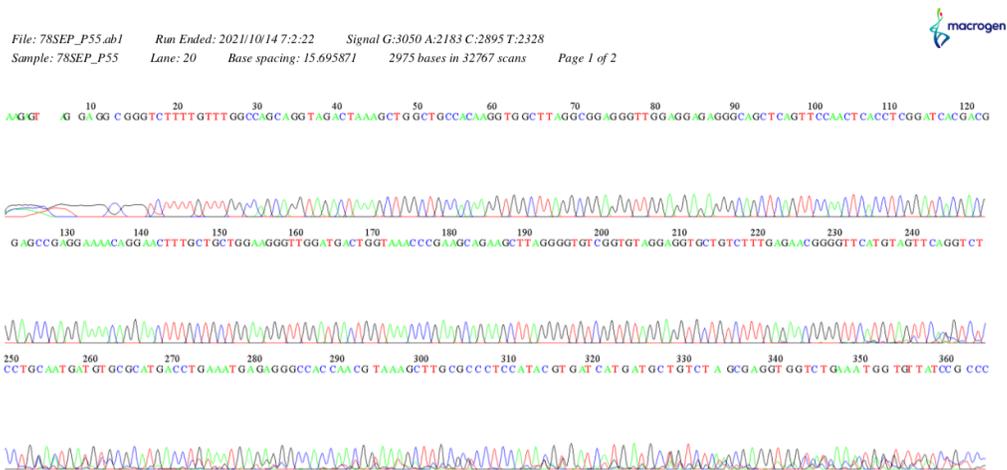


Anexo C-5: Electroferograma de un amplicón de RT-PCR del gen de la proteína de movimiento (MT) de PpLDV (747 pb) para la muestra BPE19, obtenido por el método de secuenciación Sanger utilizando los primers Gulupa_tymF_MT (5'-CCTCGTCCCTTTTCTATCCC-3') y Gulupa_tymR_MT (5'-AGAGCGTCATACACCTTTTCG-3').

File: 7SSEP_P64.ab1 Run Ended: 2021/10/14 7:22:22 Signal G:1768 A:1630 C:1458 T:1388
 Sample: 7SSEP_P64 Lane: 32 Base spacing: 15.583948 1861 bases in 20035 scans Page 1 of 2



Anexo C-6: Electroferograma de un amplicón de RT-PCR del gen de la cápside (CP) de PpLDV (638 pb) para la muestra PE130 correspondiente a tejido foliar sintomático del suroeste de Antioquia, obtenido por el método de secuenciación de Sanger utilizando los primers Gulupa_tymF_CP (5'-CTCAACCTTCTGTCCACTCC-3') y Gulupa_tymR_CP_6413 (5'-GATTCAGCGACGGACAACC-3').



Capítulo 4.

Establecimiento de plántulas de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) bajo condiciones de cultivo *in vitro* para su utilización en programas de certificación de semilla por su sanidad viral

**Manuscrito preparado para la revista:
Acta Biológica Colombiana (ISSN 1900-1649)**

Daniela Cardona Mejía

Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias y Laboratorio de Biotecnología vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: dcardonam@unal.edu.co

Anny Martínez

Laboratorio de Biotecnología vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: andmartinezmi@unal.edu.co

Rodrigo Hoyos

Laboratorio de Biotecnología vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. E-mail: rhoyos@unal.edu.co

Yuliana Gallo

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

Pablo Gutiérrez

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

Mauricio Marín

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)

RESUMEN

La gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) perteneciente a la familia Passifloraceae es uno de los frutales con mayor potencial de exportación en Colombia gracias a sus excelentes características organolépticas y posicionamiento en el mercado frutícola internacional. A pesar de su importancia, la información y prácticas agronómicas sobre el cultivo de gulupa son reducidos, principalmente en lo referente al manejo de enfermedades, las que vienen aumentando en sus niveles de incidencia y severidad en los últimos años en el país. Las técnicas de cultivo *in vitro* se han convertido en una alternativa para obtener plantas madre con características agronómicas deseables y altos estándares de sanidad vegetal, especialmente en lo referente a patógenos sistémicos como fitoplasmas y virus. El objetivo de este trabajo fue estandarizar un procedimiento eficiente para el establecimiento bajo condiciones *in vitro* de plántulas de gulupa, utilizando segmentos nodales y apicales y seis diferentes medios de cultivo. Los resultados obtenidos indican que bajas concentraciones de hormonas (0,1; 0,2; 0,6 mg/L) tienen un mejor efecto en el desarrollo de los explantes en comparación con el suplemento de altas concentraciones (1,2; 1,5 mg/L). El medio de cultivo 6 con base de MS y suplementado con carbón activado, vitaminas Gamborg, caseína hidrolizada y GA₃ permitió mayores porcentajes de establecimiento de los explantes, con un promedio de 50 días para obtener brotación de al menos 1,5 yemas y formación de 2,5 hojas. En ninguno de los medios de cultivo y de las condiciones evaluadas fue posible la inducción de enraizamiento antes de siete meses del establecimiento, por lo que se desarrolló una metodología alternativa de enraizamiento *ex vitro* en turba estéril como una solución práctica. Se espera que estos hallazgos permitan iniciar en el cultivo de gulupa, programas de limpieza *in vitro* de virus y otros fitopatógenos utilizando termoterapia, crioterapia, cultivo de meristemos y/o quimioterapia.

Palabras Clave: Enraizamiento *ex vitro*, fitohormonas, micropropagación, Passifloraceae, virus de plantas.

INTRODUCCIÓN

La gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) es una planta enredadera de la familia Passifloraceae, de distribución pantropical, actualmente cultivada en cuatro continentes: África, América, Asia y Oceanía (Ocampo y Wyckhuys, 2012). Es originaria del sur de Brasil, Paraguay y el norte de Argentina, y se ha distribuido ampliamente en los países de los Andes, donde puede crecer en forma silvestre o ser cultivada gracias a su tolerancia al frío (Ocampo et al., 2010). El fruto es muy apetecido para el consumo en fresco debido a su sabor y aroma; además, también se emplea en la industria de alimentos para obtener jaleas, suplementar derivados lácteos y jugos (Jiménez et al., 2009). Algunas investigaciones realizadas en *Passiflora edulis* f. *edulis* han demostrado un gran potencial fitofarmacéutico debido a los alcaloides, fenoles, flavonoides y compuestos cianogénicos que contiene esta planta; atribuyéndole propiedades sedativas, vermífugas, ansiolíticas, antiespasmódicas, diuréticas y eméticas (Dhawan et al., 2004; Yockteng et al., 2011). Gracias a su apariencia, valor nutricional, propiedades medicinales y cualidades exóticas, la gulupa es bastante apetecida en otros países como Bélgica, Alemania, Países Bajos y Reino Unido (Castilla, 2019).

En Colombia, el cultivo de la gulupa se extiende a cerca de 1.500 ha y genera alrededor de 25.000 t de fruta al año (Agronet, 2020), ubicándose en los primeros lugares en la lista de frutas exóticas de mayor exportación (Leal Acosta, 2020). Esta fruta se cultiva en regiones con altitudes entre 1.400 y 2.200 msnm principalmente de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Santander y Cauca. Además, su producción representa un renglón de importancia económica y social para la región Andina, dada su alta rentabilidad y la generación de cerca de 210 empleos rurales/ha/año (Ocampo y Wyckhuys, 2012). Desafortunadamente, los planes de expansión para el cultivo de este frutal en Colombia se ven afectados por diversas plagas y enfermedades que limitan significativamente su producción y disminuyen la calidad de los frutos, por lo que es fundamental la implementación tanto de prácticas de manejo integrado como el establecimiento de un programa de semilla certificada para esta especie (Sepúlveda et

al., 2021). Algunos de los problemas fitosanitarios más importantes de la gulupa incluyen: marchitez vascular por *Fusarium oxysporum*, mancha bacterial por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* y roña por *Cladosporium cladoporioides* (Ortiz y Hoyos, 2012; Joy y Sherin, 2016). Además, en Colombia se han reportado diversas enfermedades de origen viral principalmente asociadas a la infección por el potyvirus: soybean mosaic virus (SMV) (Cutler et al., 2018; Jaramillo et al., 2018), el cucumovirus: cucumber mosaic virus (CMV) (Camelo, 2010; Gordillo, 2011), el tymovirus: passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) (Jaramillo et al., 2019); y una nueva especie de badnavirus denominada: Gulupa bacilliform virus A (GBVA) (Sepúlveda et al., 2021).

La propagación de la gulupa en Colombia se realiza, principalmente, mediante semilla sexual. Esta práctica de propagación ha resultado en libre comercialización de plántulas por viveros que las distribuyen sin ningún tipo de restricción entre diferentes regiones. Lo anterior ha resultado en una alta variabilidad genética dentro de las plantaciones y especialmente la posible dispersión de plagas y fitopatógenos, particularmente de virus como el SMV y PFYMV, que dada su condición sistémica y asintomática, sólo pueden ser detectados mediante técnicas moleculares altamente sensibles como RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), o secuenciación Sanger y de nueva generación (NGS) (Jaramillo et al., 2018; Sepúlveda et al., 2021; Cardona et al., 2021).

El cultivo *in vitro* surge como herramienta biotecnológica para la propagación masiva de material vegetal y juega un papel importante en la clonación de individuos "élite" con desempeño agronómico destacado. Además, permite obtener material de siembra libre de patógenos y enfermedades. El establecimiento de algunas pasifloras a través de técnicas de cultivo *in vitro* ha sido posible utilizando embriones cigóticos, yemas axilares, ápices, segmentos nodales, discos foliares y meristemas (Flores y Brenes, 2004; Miranda et al., 2009; Otahola y Díaz, 2010; Parra et al., 2011; Ortiz, 2019), sin embargo; el potencial regenerativo de las plantas depende fundamentalmente de la especie y variedad vegetal, la edad fisiológica de la planta madre, del explante empleado y de las condiciones de cultivo (Apezato Da Gloria et al., 1999; Passos y Bernacci, 2005). El cultivo *in vitro* de la gulupa es relativamente nuevo y son pocas las investigaciones que se han desarrollado sobre este aspecto. En 2004, Isutsa evaluó la micropropagación *in vitro* de gulupa a partir de segmentos nodales y apicales indicando que esta especie

únicamente creció en un medio de cultivo MS, suplementado con 5 mg/L BAP y 4 mg/L de GA₃ con crecimiento reducido y baja supervivencia; los mismos autores demostraron que la estrategia de propagación *ex vitro* fue más efectiva (66% de enraizamiento, dos raíces por brote, 60% de supervivencia) que el enraizamiento *in vitro* (47% de enraizamiento, una raíz por brote, 32% de supervivencia). Por otra parte, Manjarrés y Perea (2012) evaluaron la germinación *in vitro* de embriones cigóticos a partir de semillas de gulupa tratadas con frío durante 10 días para romper la dormancia, adicional a un proceso de imbibición durante 24 h en GA₃ (1,5 mg/L), los embriones se sembraron en medio de cultivo MS suplementado con BAP (1,5 mg/L), obteniendo porcentajes de germinación hasta del 80%. Otro estudio indicó formación de callos por organogénesis a partir de segmentos de hojas cultivados en medio MS suplementado con 1 mg/L BAP y 2 mg/L 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) después de seis semanas de cultivo, con una tasa de supervivencia del 85,1%. Las plantas se regeneraron en un medio suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de GA₃ vía embriogénesis somática después de 10 semanas y posteriormente los brotes desarrollados fueron subcultivados en un medio de cultivo que contenía 1 mg/L de IAA (Acido indolacético) para su elongación y enraizamiento después de 14 semanas de cultivo (Huh et al., 2017). Un caso contrario fue reportado por Tuhaise et al. (2019) en Uganda, donde evaluaron la regeneración *in vitro* de cultivares de *P. edulis* f. *edulis* a partir de discos foliares bajo diferentes concentraciones de BAP (1,6; 1,8; 2,0 y 2,2 mg/L) sin inducción exitosa de brotes o callos, pues los discos foliares se necrosaron después de 12 semanas, concluyendo que esta especie es recalcitrante al cultivo de tejidos.

Debido al bajo número de estudios realizados en el cultivo de tejidos de gulupa y a su relativo bajo rendimiento de propagación por semilla sexual, este trabajo tuvo como objetivo estandarizar un procedimiento eficiente para el establecimiento bajo condiciones *in vitro* de plántulas de gulupa, utilizando segmentos nodales y apicales en seis medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y obtención de explantes

Los explantes (segmentos nodales) de gulupa fueron obtenidos a partir de 50 plantas de 3 a 4 meses de crecimiento después de su germinación, procedentes de cinco viveros ubicados en el oriente de Antioquia (Colombia). Las plantas fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y permanecieron en casa malla con el fin de protegerlas de ataques de plagas y vectores de fitopatógenos. Los primeros tres o cuatro segmentos nodales consecutivos, incluyendo el ápice fueron extraídos de las plantas madre como fuente de material vegetal para la micropropagación, las hojas fueron retiradas y el tallo se fraccionó en segmentos de 1 a 1,5 cm, cada uno con al menos un nudo, para permitir la brotación de la yema axilar.

Limpieza y desinfección de material vegetal

Los explantes fueron sumergidos en una solución del fungicida sistémico de amplio espectro Score 250 EC (Difenoconazole) con una gota de Tween-80 durante 20 min en agitación constante y se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril. Luego se aplicó una solución de hipoclorito al 1% con una gota de Tween-80, hasta cubrirlos completamente, en agitación continua durante 20 min. Finalmente se realizaron de cuatro a cinco lavados con agua destilada estéril para eliminar posibles trazas de los desinfectantes. Este protocolo se llevó a cabo en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar.

Preparación de los medios de cultivo

Para la multiplicación *in vitro* de gulupa, se evaluaron diferentes medios de cultivo reportados en la literatura para diferentes especies de pasifloras, en los cuales se indica el desarrollo de las yemas apicales, axilares y formación de raíz. La composición de los medios evaluados en esta investigación se indica a continuación:

Medio 1: Sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) 4,43 mg/L, suplementado con 20 g/L de sacarosa, 2 g/L de phytigel y tiosulfato de plata (STS) como inhibidor de etileno.

Medio 2: Sales minerales MS 4,43 mg/L, suplementado con 20 g/L de sacarosa, se evaluaron como reguladores de crecimiento vegetal, diferentes concentraciones de

6-bencilaminopurina (BAP) (0,1; 0,6 y 1,2 mg/L) y de ácido indolbutírico (IBA) (0,2, 1,0 y 1,5 mg/L); como agente gelificante se utilizó phytigel 2 g/L.

Medio 3: Sales minerales MS 4,43 mg/L, suplementado con 20g/L de sacarosa, se evaluaron como reguladores de crecimiento vegetal, diferentes concentraciones de BAP (0,1; 0,6 y 1,2 mg/L) y concentraciones (0,2; 1,0 y 1,5 mg/L) de ácido α -naftalenacético (ANA); como agente gelificante se utilizó phytigel 2 g/L.

Medio 4: Sales minerales White (1963) suplementado con vitaminas B5, phytigel 2 g/L y 20g/L de sacarosa.

Medio 5: Sales minerales WPM (Lloyd y McCown, 1980) suplementado con vitaminas B5, phytigel 2 g/L y 20g/L de sacarosa.

Medio 6: Sales minerales MS, vitaminas Gamborg (ácido nicotídico 1.000 μ L/L, piridoxina 1.000 μ L/L y tiamina 10.000 μ L/L), 20 g/L de sacarosa, 200 mg/L de caseína hidrolizada, 5 g/L de carbón activado, 0,5 mg/L de GA3 y 4,5 g/L de gelrite como agente gelificante (Ávila et al., 2016).

En todos los casos el pH se ajustó a 5,8 con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl), antes de agregar el agente gelificante. Posteriormente, los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 20 psi durante 15 min. Los explantes se mantuvieron en cuarto de cultivo a una temperatura de 21°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Análisis estadístico

La evaluación del mejor medio de cultivo para gulupa se realizó en un diseño completamente al azar con seis tratamientos (medios) y tres repeticiones por tratamiento. Las variables respuesta evaluadas correspondieron a: número de yemas formadas, número de hojas nuevas, tiempo de brotación y viabilidad del explante. Ya que en ninguno de los medios se presentó enraizamiento, esta variable no se incluyó en las evaluaciones. Estas variables fueron evaluadas 45 días después del inicio de la brotación, es decir el momento en el cual comenzó el crecimiento de las yemas axilares o apicales; estos datos se estudiaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) y la prueba

de Tukey de diferencia de medias entre tratamientos con un nivel de significancia del 95% ($P < 0,05$). Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico R. Adicionalmente, para determinar la mejor concentración de hormonas en los medios 2 y 3, inicialmente se realizó un ANOVA para la selección de la dosis en dichos medios.

Detección de virus de RNA en plantas madre

Se obtuvo el RNA total de 26 plantas madre de gulupa (3-4 meses de edad) utilizadas para su posterior propagación *in vitro*, la extracción se realizó a partir de 100 mg del tejido foliar macerado con nitrógeno líquido, siguiendo el protocolo de extracción GeneJET Plant Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, EEUU), las muestras fueron eluidas en 40 μ L de agua tratada con DEPC, se determinó su concentración y pureza por lecturas a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (ThermoFisher Scientific).

Virus	Primers	Secuencia	Fuente
SMV	SMV_qRT-F	5' CAGATGGGCGTGGTTATGA 3'	Gao et al. (2015)
	SMV_qRT-R	5' ACA ATG GGT TTC AGC GGA TA 3'	
PFYMV	Tymo_F_CP	5' AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG 3'	Jaramillo et al. (2019)
	qTymo_R_CP	5' GCG ACG AGA GAG GTG AGT CG 3'	
CMV	CMV-R	5' CGA CTT CAA CAG GCG AGC 3'	Cuspoca (2007)
	CMVdo1244b	5' TGC TCR AYG TCR ACA TGA AG 3'	Xanthis et al. (2015)
	CMV_qRT_R	5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3'	Feng et al. (2006)

A partir del RNA obtenido, se realizaron reacciones de retrotranscripción para cada muestra en un volumen de 20 μ L utilizando 200 U de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de RiboLock, 50-100 ng de ARN total y 20 pmol de los “primers reverse”: oligo(dT) para SMV, Tymo R-CP para PFYMV y una mezcla equimolar de CMV-R, CMV-do1244b y CMV-qRT-R para CMV (Tabla 1). Para determinar la presencia de virus de RNA, las muestras fueron analizadas por RT-qPCR para la detección de SMV, PFYMV y CMV,

previamente reportados en cultivos de este frutal en Antioquia (Jaramillo et al., 2018, 2019; Sepúlveda et al., 2021).

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados en este estudio.

Las reacciones de qPCR se realizaron en 14 μ L de volumen, conteniendo 6,25 μ L del kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 4 μ L de agua estéril tratada con DEPC, 50-100 ng de DNA copia (cDNA) y 0,375 μ L de los primers específicos (SMV_qRT_F y SMV_qRT_R; Tymo_F_CP y qTymo_R_CP; CMV_qRT_F y CMV_qRT_R) (Tabla 1). Se incluyó un control positivo y un control negativo en todas las reacciones.

Adicionalmente, se preparó un *bulk* de RNA total procedente de cinco plantas establecidas en cultivo *in vitro* seleccionadas al azar, para su análisis mediante secuenciación de nueva generación (NGS). El RNA total fue utilizado para la generación de librerías de cDNA usando el kit TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep (Illumina, EEUU) y eliminación previa del RNA ribosomal (RNAr) con el kit Ribo-Zero Plant kit (Illumina). La secuenciación masiva de nueva generación fue realizada en un equipo Illumina NovaSeq en la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias virales fueron identificadas utilizando el programa PVDP (Gutiérrez et al., 2021)

RESULTADOS

Protocolo de desinfección

Los segmentos nodales y apicales introducidos a los medios de cultivo no presentaron contaminación en la fase inicial de establecimiento *in vitro*. En algunos casos, se presentó contaminación después de 3 o 4 meses, debido a patógenos endófitos comunes en esta especie. Dichos patógenos habitan en las plantas durante un periodo de su ciclo de vida colonizando algunos tejidos sin generar síntomas aparentes de enfermedad, pero pueden manifestarse como saprófitos o fitopatógenos en condiciones de estrés de las plantas (Sánchez-Fernández et al., 2013; Hurtado, 2020). En este caso los explantes contaminados fueron descartados y reemplazados.

Estandarización de medios de cultivo *in vitro*

El ANOVA realizado para evaluar el efecto de las concentraciones de las hormonas BAP e IBA en el medio 2 y BAP y ANA en el medio 3, indicó que no había diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las concentraciones de hormonas utilizadas en cada medio de cultivo con respecto a las variables respuesta, por lo cual, se eligieron aquellas concentraciones en las cuales se obtuvo mayor número de explantes viables. La concentración elegida para el medio 2 fue 0,6 mg/L BAP y 0,2 mg/L IBA, mientras que para el medio 3 se utilizó 0,1 mg/L BAP y 0,2 mg/L de ANA; en ambas concentraciones se obtuvo un 66,7% de supervivencia en los explantes durante la fase de establecimiento, mientras que en las demás combinaciones hormonales tan sólo sobrevivió el 33,3% de los explantes en el mejor de los casos.

En la tabla 2 se indican los valores promedio obtenidos en cada uno de los tratamientos para las variables analizadas: número de yemas/brote, número de hojas formadas, tiempo requerido para la aparición de brotes en las yemas axilares o apicales y el porcentaje de viabilidad.

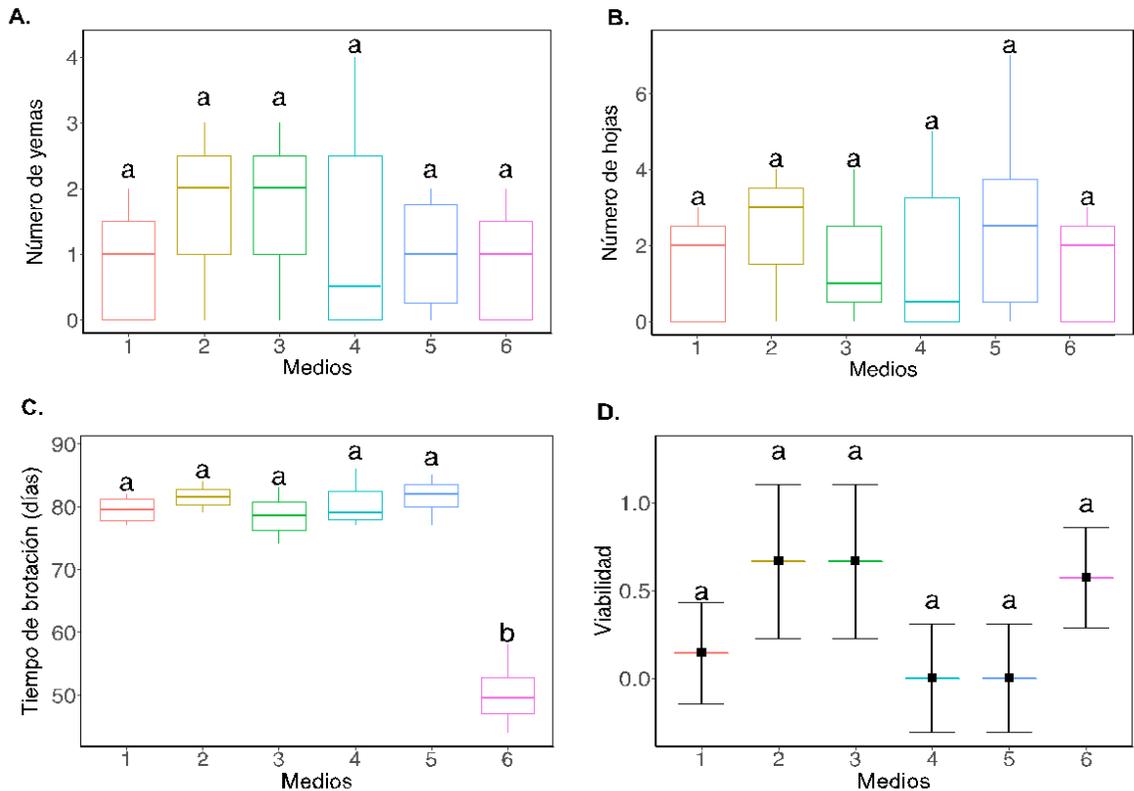
Tabla-2. Valores promedio obtenidos para cada variable respuesta de acuerdo con el tratamiento hormonal *in vitro* aplicado a los explantes de gulupa.

Medio de cultivo	Número de explantes totales	Explantes sobrevivientes	Número de yemas promedio	Número de hojas promedio	Tiempo promedio de brotación (días)	Viabilidad* (%)
1	7	1	1,5	2,5	79,5	14,3
2	3	2	2,5	3,5	81,5	66,7
3	3	2	2,5	2,5	78,5	66,7
4	6	0	2,7	3,3	80,7	0,0
5	6	0	1,5	4,0	81,5	0,0
6	7	4	1,5	2,5	50,3	57,1

*Los porcentajes de viabilidad presentados hacen referencia a los datos obtenidos durante la etapa inicial de establecimiento *in vitro*, es decir en los primeros dos meses del explante en medio de cultivo después de iniciar la brotación.

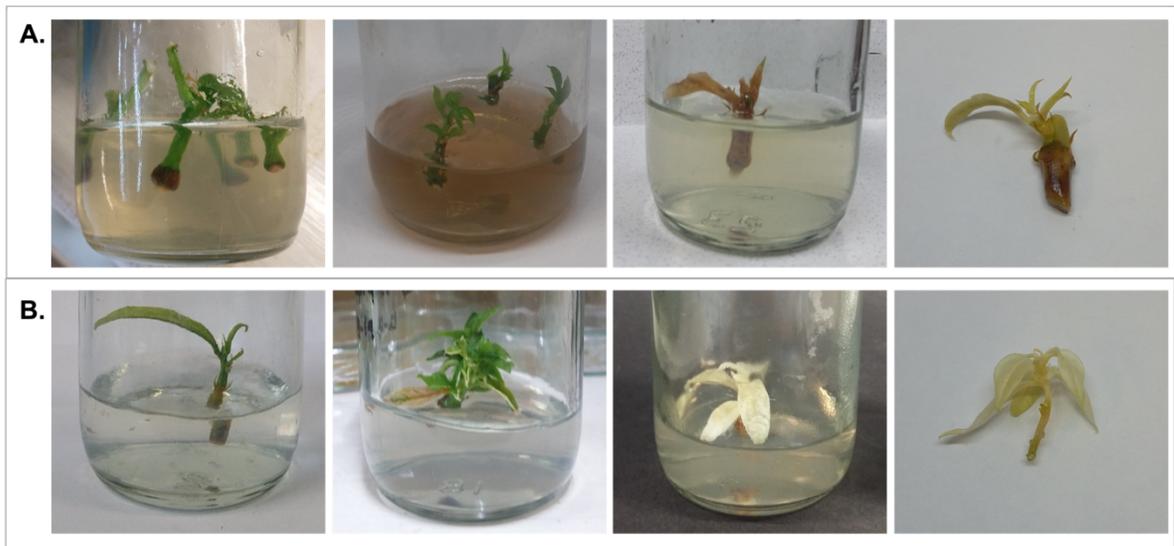
Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre los medios 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respecto a cada una de las variables respuesta; sin embargo, dicho análisis y la prueba de Tukey determinaron que el número de yemas, número de hojas y viabilidad de los explantes no presentaban una diferencia significativa respecto al efecto de los tratamientos evaluados (medios de cultivo) (Figura 1A, B, D). Por el contrario, los análisis sugirieron que el tiempo requerido para que los explantes inicien la brotación una vez son propagados *in vitro*, sí presentaba diferencias significativas según el medio de cultivo empleado (Figura 1C). En este caso, el medio 6 presentó menores tiempos de brotación con diferencias superiores a 33 días respecto a los otros medios de cultivo evaluados.

Figura 1. Análisis de varianza y prueba de medias de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los medios de cultivo evaluados y las variables respuesta para el establecimiento de plantas *in vitro* de gulupa: (A) Número de yemas, (B) Número de hojas (C) Tiempo de brotación (D) Viabilidad de los explantes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias estadísticas significativas al nivel del 95%.



Adicionalmente, se observaron algunas características morfológicas en los explantes como respuesta a la composición de cada medio de cultivo. El 100% de los explantes en los medios 1, 2 y 3 presentaron hiperhidricidad y necrosis en el tallo, e incluso en algunos casos se observó oxidación en el medio de cultivo (Figura 2A). Por otro lado, los explantes propagados en el medio basal White y WPM (medio 4 y 5), presentaron acortamiento de entrenudos y/o clorosis severa en todo el explante induciendo la muerte del tejido vegetal (Figura 2B). En general, los explantes procedentes de los medios 1, 2, 3, 4 y 5 no se encontraron en condiciones morfológicas favorables para su supervivencia después de un periodo de cuatro meses en medio de cultivo *in vitro*, ya que, aunque algunos brotes desarrollaron yemas y hojas nuevas en las primeras etapas de cultivo, su estado morfológico especialmente la necrosis en base del tallo generó la muerte del 52,6% de las plantas en etapas posteriores.

Figura 2. Respuestas morfológicas de explantes de gulupa en diferentes medios de cultivo bajo condiciones *in vitro*. (A). Hiperhidricidad, oxidación y necrosis del tejido en explantes procedentes de los medios 1, 2 y 3 (B). Oxidación sin hiperhidricidad, acortamiento de entrenudos y clorosis severa de los explantes en los medios 4 y 5.



Finalmente, el medio 6 permitió reducir la oxidación en el tallo y el efecto de hiperhidricidad en este tejido (Figura 3), con menores tiempos de crecimiento, buen desarrollo foliar y asegurando la viabilidad de los explantes en tiempos superiores a los siete meses bajo condiciones *in vitro*.

Figura 3. Crecimiento y desarrollo *in vitro* de explantes de gulupa en medio de cultivo 6 (Parte superior) y sus respuestas morfológicas: sin hiperhidricidad, baja oxidación y/o necrosis del tejido vegetal, formación de yemas y hojas nuevas completamente extendidas (Parte inferior).



Enraizamiento (*in vitro*)

Aunque los medios de cultivo seleccionados en este estudio han favorecido la rizogénesis en otras especies de passifloras, ninguna de las plantas de gulupa propagadas *in vitro* presentaron formación de raíz en un período evaluado de cinco meses. Sin embargo, debido a que el medio 6 presentó las mejores respuestas en la apariencia de las plántulas (Figura 3), se evaluó preliminarmente el efecto de las hormonas TDZ, Kinetina y Zeatina, con el fin de disminuir el tiempo de crecimiento en los brotes y observar posibles efectos en el enraizamiento de los explantes.

Las citoquininas thidiazuron (TDZ), kinetina (KIN) y Zeatina (ZEA) han sido reportadas como fuertes inductores de brotes debido a que promueven la división celular en el tejido meristemático, activando el crecimiento de yemas laterales y el movimiento de nutrientes

(Roca y Mroginski, 1991; Chamorro et al., 2007), además estas citoquininas son más efectivas en el cultivo de tejidos de plantas leñosas facilitando la micropropagación de especies recalcitrantes (Huetteman y Preece, 1993). La composición del medio 6 fue el medio de cultivo básico (MS) para la introducción del material vegetal adicionando por separado las citoquininas correspondientes (Tabla 3), los medios de cultivo se probaron en tres plántulas con dos repeticiones por tratamiento.

Tabla 3. Evaluación de tres citoquininas diferentes en el cultivo *in vitro* de explantes de gulupa utilizando como base el medio de cultivo 6.

Hormonas	Medio 7	Medio 8	Medio 9	Número de explantes enraizados
TDZ	0,25 mg/L	-	-	2/6
Kinetina	-	0,05 mg/L	-	2/6
Zeatina	-	-	0,1 mg/L	3/6

Dichos materiales se mantuvieron en medio de cultivo *in vitro* y solo después de un periodo de siete meses, el 33,3% de las plantas presentaron enraizamiento (Figura suplementaria 1), lo que indicó que no representa una solución práctica para el éxito de la propagación *in vitro* de gulupa. Por esta razón se decidió complementar este trabajo con un proceso de enraizamiento *ex vitro*.

Enraizamiento *ex vitro*

Se utilizaron 20 plántulas obtenidas del mejor medio seleccionado inicialmente (Medio 6). Los explantes fueron lavados con agua corriente para eliminar el agar adherido (Figura 4A), luego la base fue impregnada con un enraizador comercial hormonagro® (i.a. ANA 0,4%) (Colinagro) como estimulante radicular. Posteriormente fueron sembrados en recipientes plásticos con turba estéril (Anasac) previamente humedecida para su endurecimiento. Los recipientes estuvieron completamente cerrados formando una cámara húmeda durante 15 días para simular las condiciones *in vitro*, posteriormente se hicieron pequeñas perforaciones en la parte superior para permitir el intercambio de aire hasta completar el periodo de aclimatación.

Luego de 45 días de evaluación, se encontró enraizamiento y desarrollo aéreo adecuado en el 80% de las plantas, tal como se observa en la figura 4B, lo que en promedio representó plántulas con 4,6 cm de altura, 3 raíces/brote de 2,8 cm de longitud aproximadamente y 5 hojas completamente extendidas. De 20 explantes llevados a turba, 4 plántulas no lograron sobrevivir (20%) durante el proceso de enraizamiento *ex vitro*, posiblemente por la necrosis que presentaba el tejido en la base del tallo inicialmente; impidiendo la formación de raíz y consecuentemente evitando la absorción de nutrientes del suelo.

Figura 4. Inducción de enraizamiento *ex vitro* en explantes de *P. edulis f. edulis* procedentes del medio de cultivo 6. (A) Estado inicial de los segmentos nodales trasladados de cultivo *in vitro* a sustrato. (B) Estacas enraizadas *ex vitro* luego de 45 días en turba estéril. (C) Plántulas de gulupa a los 60 días de endurecimiento.



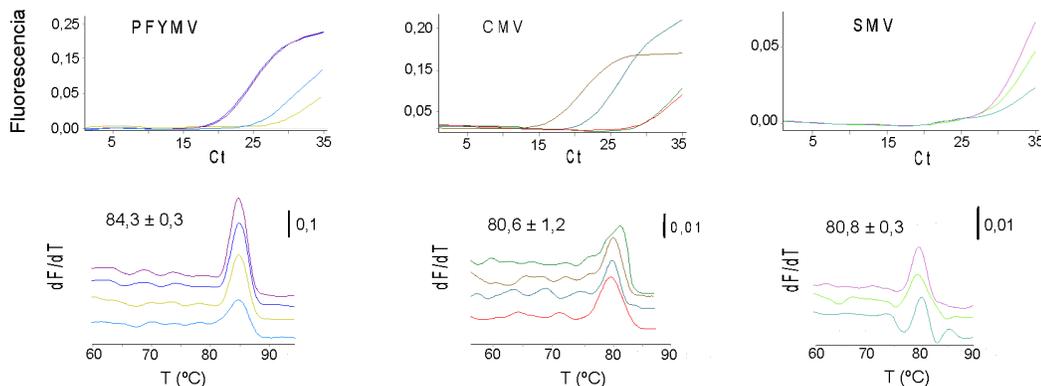
Los resultados indicaron que el 94% de las plantas permanecieron viables después de 60 días de evaluación en turba (Figura 4C), la altura promedio alcanzada por las plántulas durante este tiempo fue de 7,5 cm (SD =1,98).

Detección viral por RT-qPCR y NGS

En las evaluaciones realizadas mediante RT-qPCR en las muestras foliares obtenidas de las plantas madre se detectaron los tres virus de RNA; PFYMV fue el virus con mayor prevalencia al encontrarse en el 92,3% de las muestras, seguido por CMV y SMV, en el 23,1% y 15,4%, respectivamente.

Los valores de Ct para PFYMV en general oscilaron entre los ciclos 28 y 34, con excepción de cuatro muestras, donde este valor se ubicó entre los ciclos 17 y 19; mientras que para SMV las cuatro muestras positivas se encontraban alrededor del ciclo 33, sugiriendo las cargas virales más bajas detectadas en este estudio. Por otra parte, CMV presentó cinco muestras positivas, cuatro de ellas ubicadas entre los ciclos 21 a 28 y una muestra en el ciclo 13,48, lo que indica un valor extremadamente alto de título para este virus. Los valores de Tm para cada virus se encontraron en el rango de temperatura esperado, de acuerdo con lo reportado previamente por Jaramillo et al. (2018; 2019) y Sepúlveda et al. (2021), con valores promedio de Tm de 80,8°C (SD=0,30) para SMV, 84,3°C (SD=0,38) para PFYMV y 80,6°C (SD=1,20) para CMV (Figura 5).

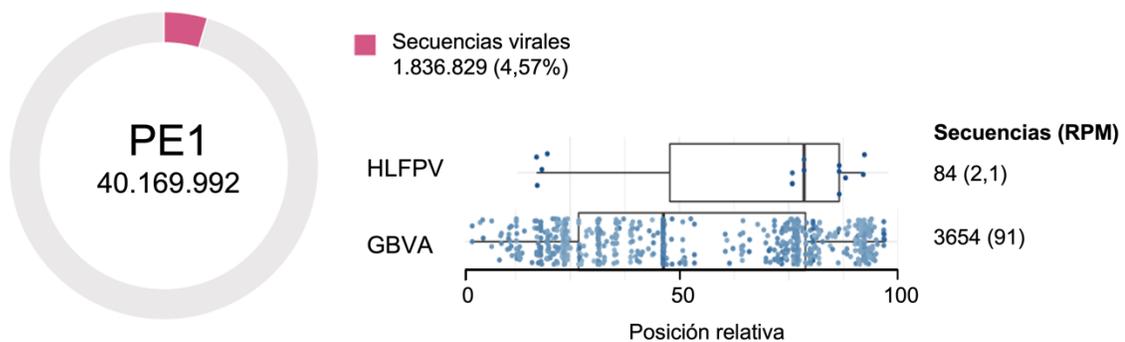
Figura 5. Detección molecular de PFYMV, CMV y SMV a partir de plantas madre de gulupa mediante RT-qPCR. Las gráficas superiores representan los valores de Ct para algunas muestras representativas. En la parte inferior se muestran las curvas de desnaturalización, indicando el Tm promedio para cada virus.



La secuenciación de nueva generación para las cinco muestras aleatorias procedentes de cultivo *in vitro* generó 40.169.992 de *reads* pareados y un total de 8.114.338.384 nt. Los resultados obtenidos por la plataforma PVDP identificaron que aproximadamente el 4,57% de los *reads* detectados en el *bulk* corresponden a secuencias asociadas a virus

en plantas. El virus más abundante encontrado en el set de datos fue el badnavirus: Gulupa bacilliform virus A (GBVA) con 3654 *reads* y niveles de abundancia de 91 *reads* por millón (RPM), además se detectó con bajos niveles de abundancia (2,1 RPM) el HLFPV (Hibiscus latent fort pierce virus) un miembro del género *Tobamovirus* (Figura 6).

Figura 6. Detección de virus en plantas de *P. edulis* f. *edulis* mediante HTS utilizando la plataforma PVDP. El diagrama circular indica el porcentaje de secuencias virales detectadas en el *bulk* de plantas madre (PE1) respecto al total de reads pareados obtenidos por secuenciación NGS. Los diagramas de barras indican la posición relativa en el genoma de los reads mapeados y su distribución indica la profundidad a lo largo del genoma. Mayor intensidad en el color representa niveles superiores de identidad respecto a las secuencias de referencia.



DISCUSIÓN

El cultivo *in vitro* de gulupa está determinado por diferentes factores como la edad de las plantas madre, la composición del medio de cultivo y las concentraciones utilizadas de los reguladores de crecimiento; aspectos fundamentales en el desarrollo y crecimiento del explante y en su respuesta morfológica. Dichas condiciones están directamente relacionadas con la viabilidad del explante en la etapa de endurecimiento *ex vitro* y determinan el éxito de esta técnica de propagación vegetativa.

Los medios de cultivo probados en este estudio fueron seleccionados a partir de resultados obtenidos en otras especies de pasifloras cultivadas y silvestres publicadas en la literatura; no obstante, la extrapolación al cultivo *in vitro* de *P. edulis* f. *edulis*, permitió

comprobar que la respuesta tanto del crecimiento y desarrollo del explante como del enraizamiento, son particulares y específicas en cada especie del género *Passiflora*, incluso cuando se utilizan las mismas concentraciones hormonales (Loaiza, 2013), confirmando la importancia de adelantar investigaciones más detalladas para cada especie e incluso variedad, en el cultivo de tejidos vegetales.

Para el crecimiento tanto de yemas axilares como apicales *in vitro* de gulupa, se utilizaron explantes procedentes de plantas jóvenes (3-4 meses de edad) debido a que se ha observado que la edad de la planta madre a partir de la cual se obtienen los explantes para la micropropagación, afecta el desarrollo del segmento vegetal, principalmente por la susceptibilidad de los cultivos a la contaminación exógena y endógena que pueden presentar los explantes primarios y por la escasa respuesta a la proliferación *in vitro* de los tejidos adultos (Pierik, 1990; Roca y Mroginski, 1997). Esta respuesta es común en el cultivo *in vitro* de varias especies vegetales entre las que se incluyen las passifloras. Drew (1991) reportó que la regeneración a partir de tejidos adultos de passifloras disminuye la producción, dificulta el crecimiento del explante y aumenta el proceso de senescencia, mientras que los tejidos de explantes jóvenes responden favorablemente a la acción de los reguladores de crecimiento, debido a su alta actividad meristemática; además según Ozarowski y Thiem (2013), tienden a mostrar mayor plasticidad que los tejidos adultos. Probablemente este hecho confirme la razón por la cual los tejidos juveniles suelen regenerar raíces más rápidamente que un tejido adulto (Beyl, 2005).

De todos los medios disponibles para cultivo *in vitro* de plantas, Murashige y Skoog (MS) es el medio basal más adecuado y comúnmente utilizado para la regeneración a partir de tejidos vegetales; algunos reportes han demostrado que segmentos internodales de maracuyá, han enraizado en este medio sin necesidad de adicionar reguladores de crecimiento (Biasi et al., 2000); sin embargo, los ensayos realizados en explantes de gulupa no presentaron un desarrollo activo, ni enraizamiento, contrario a esto se observó un aumento en la oxidación del tallo ocasionando la necrosis basal de este tejido, causando en la mayoría de los casos (85,7%) la muerte del explante. El oscurecimiento de los tejidos es con frecuencia menor en un medio diluido que en uno alto en sales, como es el MS, debido al contenido de K y N, razón por la cual algunas especies pueden

reaccionar desfavorablemente bajo esta condición (George, 1996; Cassells y Curry, 2001). Adicionalmente, la ausencia de crecimiento y desarrollo de los esquejes podría estar relacionada con la baja concentración de reguladores de crecimiento endógenos, por lo cual en algunos casos se hace necesaria la adición exógena de hormonas para lograr la respuesta deseada en el tejido de la planta.

Las combinaciones y concentraciones hormonales fueron las principales diferencias entre los medios de cultivo evaluados. Estudios publicados anteriormente, han demostrado que en proporciones adecuadas, la adición de auxinas y citoquininas en conjunto promueven el desarrollo radicular y estimulan el crecimiento de los brotes (Córdoba et al., 2010), en este caso se evaluó la combinación de BAP-IBA y BAP-ANA en un rango de concentraciones desde 0,1 hasta 1,5 mg/L. Estudios realizados en *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* en los cuales se probaron diferentes dosis de BAP, han confirmado que adicionando 0,6 mg/L de éste al medio se logran mejores resultados para la formación de brotes (Otahola, 2000), coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación, en donde esta misma concentración de BAP, permitió además del desarrollo del explante una tasa mayor de viabilidad (66,7%) en la etapa inicial de establecimiento. Además, Scorza y Janick (1978) reportaron que la combinación de BAP-ANA estimula la formación de las partes aéreas en segmentos nodales de varias especies de passifloras.

Aunque mediante los análisis estadísticos no se encontraron diferencias significativas atribuibles a ninguna de las concentraciones utilizadas de BAP (0,1; 0,6 y 1,2 mg/L), IBA (0,2, 1,0 y 1,5 mg/L) y BAP (0,1; 0,6 y 1,2 mg/L), ANA (0,2; 1,0 y 1,5 mg/L), algunas respuestas morfológicas observadas como hiperhidricidad, necrosis en el tallo y oxidación en el medio de cultivo, fueron fundamentales para determinar el mejor medio de cultivo; ya que aun cuando el explante generaba tejido foliar nuevo, desarrollo de yemas y porcentajes de viabilidad cercanos al 65% durante los primeros meses de cultivo, dichas características morfológicas en el explante conllevaron al aumento de mortalidad después del cuarto mes en el medio de cultivo del 31,25% de los explantes viables. Tal comportamiento posiblemente se generó por la incapacidad del explante para absorber los nutrientes a partir de un tejido muerto. En general cuando las concentraciones de los reguladores de crecimiento eran altas, la respuesta en el explante

fue menos favorable, esto se explica debido a que elevadas concentraciones de auxinas y citoquininas pueden causar efectos colaterales indeseables como inhibición del crecimiento de raíces, disminución en el crecimiento de la planta y crecimiento de brotes pequeños que fallan en el desarrollo del explante o simplemente fitotoxicidad.

Los medios de cultivo White (W) y WPM (Woody Plant Medium) se utilizaron para evaluar la respuesta de los explantes a bajas concentraciones de sales, con relación al medio MS. El medio de cultivo W es uno de los medios más diluidos de los que se dispone, y por lo tanto de uso complementario al MS. WPM se elaboró especialmente para el cultivo de tallos de plantas leñosas y arbustivas, para contrarrestar la sensibilidad a las sales de algunas especies. Según George (1996), se ha encontrado que este último medio reduce el oscurecimiento de los explantes, comparado a otros. La respuesta obtenida en los esquejes de gulupa contradice esta idea, ya que los explantes presentaron necrosis del tallo, sin embargo; no hubo hiperhidricidad en ninguno de los segmentos nodales y apicales evaluados; además el crecimiento fue menor que en el medio MS. Al parecer la concentración de macro y micronutrientes retrasa el daño del tallo por hiperhidricidad pero no por necrosis, mientras que otros componentes pueden estar generando una deficiencia en el desarrollo de la planta, inhibiendo el crecimiento, generando acortamiento de entrenudos, poco desarrollo foliar y causando clorosis severa en el explante.

Finalmente, se evaluó el medio 6 como alternativa para evitar los procesos de oxidación, permitiendo además el desarrollo del explante, en el cual los reguladores de crecimiento, los compuestos orgánicos y el agente gelificante cambiaron con relación a los medios anteriores. Los análisis estadísticos determinaron diferencias significativas respecto al tiempo de brotación de los explantes (50 días), además las respuestas morfológicas fueron favorables en cuanto a la formación de nuevo tejido foliar y brotación de yemas con una viabilidad del 57% de los explantes en la etapa inicial de establecimiento. Adicionalmente, la ausencia de hiperhidricidad en el tejido y los bajos niveles de oxidación y necrosis permitieron la supervivencia del 90% de los explantes.

La adición de carbón activado (CA) al medio permite una rápida adsorción de reguladores de crecimiento endógenos y exógenos (Ozarowski y Thiem, 2013), además

tiene la capacidad de absorber las sustancias fenólicas excretadas por el explante, evitando o disminuyendo la pérdida del material vegetal por la oxidación del tejido. De acuerdo con Roca y Mroginski (1993), la oxidación de algunos compuestos químicos como taninos, fenoles y polifenoles es uno de los aspectos de más difícil manejo en cultivos *in vitro* y es causal de la inhibición de las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de proteínas, suprimiendo la respuesta de los tejidos a las diferentes fitohormonas (Pedroza-Manrique, 2007; 2009). Por tanto, la presencia del CA es importante para garantizar un buen desarrollo fisiológico de las plántulas de gulupa y de esta forma contribuir a su viabilidad. Por otro lado, la adición de la giberelina GA₃ produjo elongación en los entrenudos generando un mejor desarrollo de los explantes.

Con el fin de estimular el enraizamiento *in vitro* de gulupa se realizaron ensayos posteriores, adicionando al medio 6 citoquininas como kinetina, zeatina y TDZ en concentraciones de 0,05; 0,10 y 0,25 mg/L, respectivamente; en el 33,3 % de los explantes se logró la formación de raíces bajo estas condiciones después de siete meses de cultivo, sin embargo; debido a los largos tiempos de enraizamiento requeridos, se implementó el enraizamiento *ex vitro* como una alternativa eficiente y exitosa para establecer y endurecer las plántulas de gulupa procedentes de cultivo *in vitro*. En este caso un hallazgo clave fue que el enraizamiento *ex vitro* es posible y significativamente mejor (enraizamiento del 80% en 45 días) que el enraizamiento *in vitro* donde los explantes enraizados representaron el 33,3% en siete meses de cultivo. Isutsa (2003) obtuvo resultados similares en brotes de maracuyá procedentes de cultivo *in vitro* en donde se lograron enraizar *ex vitro* el 96% de las plantas respecto a un 62% utilizando técnicas *in vitro*.

El suministro exógeno de la auxina ácido naftaleacético (ANA) al material propagado favoreció la inducción de raíces adventicias en las estacas, garantizando una mayor probabilidad de adaptación de los esquejes en el suelo y mejor tolerancia al estrés ambiental. Este método de enraizamiento *ex vitro* ha sido probado con éxito en especies como *Ceropegia bulbosa*, *Leptadenia reticulata*, *Caralluma edulis*, *Aniba* spp, entre otras (Phulwaria et al., 2013; Rathore et al., 2013; Patel et al., 2014).

Por otra parte, los resultados obtenidos por RT-qPCR indicaron la presencia de PFYMV, CMV y SMV en 25 de las 26 plantas madre de gulupa evaluadas, con una prevalencia alta (>90%) de PFYMV, media (>20%) para SMV y baja (<16%) de CMV. En general los valores de Ct promedio para PFYMV, CMV y SMV fueron altos (29,1; 24,0 y 33,3 respectivamente), indicando bajas cargas virales, con algunas excepciones para PFYMV donde cuatro muestras se encontraron entre el ciclo 17,5 a 19,8 y para CMV donde una muestra presentó un valor de Ct de 13,5. Por otra parte, los análisis realizados por NGS en plantas establecidas en cultivo *in vitro* sugieren la presencia en dicho material, del virus de RNA HLFPV, miembro del género *Tobamovirus* y del badnavirus GBVA (Sepúlveda et al., 2020) con altos niveles de abundancia y secuencias distribuidas a lo largo del genoma. Los virus de RNA detectados por tiempo real posiblemente no fueron detectados por HTS debido al bajo título viral presente en el tejido foliar de las plántulas evaluadas, además como se mencionó anteriormente el *bulk* secuenciado por NGS estaba conformado por cinco plantas elegidas al azar de las 25 líneas con presencia de virus. La detección de virus en el material primario utilizado para la micropropagación a través de técnicas moleculares y secuenciación de nueva generación resaltan la importancia de implementar programas de certificación de material de siembra en esta especie frutal. De igual forma, las evaluaciones posteriores sobre el material vegetal establecido *in vitro* indican que no es suficiente sólo con la micropropagación *in vitro* para asegurar la limpieza del material vegetal de fitopatógenos, especialmente de virus.

Se espera que los resultados de este trabajo, incentiven al gremio fruticultor del país al desarrollo de metodologías de limpieza *in vitro* de virus y de otros fitopatógenos utilizando diferentes metodologías como termoterapia, crioterapia, cultivo de meristemas y/o quimioterapia, de manera que se establezcan bancos de planta madre que sirvan de base para el desarrollo de programas de certificación de semilla de gulupa, lo que cada día cobra más importancia para soportar los programas de expansión de este cultivo en la región andina de Colombia, dados los aumentos en niveles de incidencia y severidad de las enfermedades virales.

CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de gulupa podría estar determinado, fundamentalmente, por factores como la edad de la planta madre, la composición del medio de cultivo y las concentraciones utilizadas de los reguladores de crecimiento; aspectos fundamentales en el desarrollo y crecimiento de los explantes y en su respuesta morfológica. En este estudio el medio 6 con suplementos de sales minerales MS, vitaminas Gamborg, 20 g/L de sacarosa, 200 mg/L de caseína hidrolizada, 5 g/L de carbón activado, 0,5 mg/L de GA3 y 4,5 g/L de gelrite, fue el más adecuado para el establecimiento de plántulas de gulupa bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, no se presentó enraizamiento y por esto se recomienda que este proceso se realice en sustrato de turba estéril bajo condiciones *ex vitro*.

La adición de carbón activado al medio de cultivo 6 favoreció los procesos de crecimiento de explantes de gulupa y disminuyó la oxidación tanto en el medio de cultivo como en el tejido vegetal, reduciendo considerablemente la pérdida de material vegetal por necrosis causada por la oxidación.

Se recomienda realizar evaluaciones posteriores con diferentes concentraciones de TDZ, kinetina y zeatina utilizando el medio basal de carbón activado y/o realizando subcultivos frecuentes que puedan disminuir el tiempo de enraizamiento de la gulupa bajo condiciones *in vitro*.

REFERENCIAS

Agronet. 2020. Área, producción y rendimiento de Gulupa en Colombia. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> (Consulta del 15/11/2021).

Appezato-da-Glória, B.; Vieira, M.L. y Dornelas, M. (1999). Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34, 2007-2013.

Avila, T.; de la Barra, S.; Coca, N.; Aguilar, N. y Cespedes, J. (2016). Cultivo *in vitro* de pasifloras. Aguirre, G.; Villarroel, J. P., Leigue; L. (Eds). Aplicación del Cultivo de Tejidos

en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de ciencias agrícolas, pecuarias, forestales y veterinarias. Cochabamba, Bolivia. 240 p.

Beyl, C.A (2005). Getting started with tissue culture: Media preparation, sterie technique, and laboratory equipment. Triago, R. N. y Gray, D. J. Plant development and biotechnology. USA: CRC Press.

Biasi, L., Falco, M., Rodriguez, A. y Mendes, B. (2000). Organogenesis from intermodal segments of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Scientia Agricola, 57, 661-665.

Camelo, V. (2010). Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región de Sumapaz (Cundinamarca). Trabajo de grado de maestría en Fitopatología. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/6860>

Cardona, D., Gallo, Y., Higueta, M., Hoyos, R., Gutiérrez, P. A. y Marín, M.(2021). Detección molecular de virus en cultivos, plántulas y semillas de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) en el oriente de Antioquia. Bioagro, número del manuscrito: ms_2176

Cassells, A. y Curry, R. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant cell, tissue and organ culture, 64, 145-157.

Castilla, J. (2019). Agronegocios. Recuperado el 5 de Julio de 2019 de <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-exportacion-de-gulupa-supero-las-8109-toneladas-2881324>

Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J. C. y Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de Limonium var. Misty blue. Agronomía Colombiana, 25(1), 47-53.

Córdoba, S., Guzmán, J. R., Pérez, B. A., Zúñiga, P. A. y Pacheco, R. (2010). Propagación de especies nativas de la región andina, Bogotá, Jardín botánico de Bogotá José Celestino Mutis.

Cuspoa, J. 2007. Evaluación de virus de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 31 p.

Cutler, J., Langer, J., Von Bargaen, S., Acosta-Losada, O., Casierra-Posada, F., Castañeda-Cárdenas, A., Betancourt-Vásquez, M., Cuellar, W., Arvydas-Stasiukynas, E., Altenbach, D. y Büttner, C. (2018). Preliminary evaluation of associated viruses in production systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12(2): 390-396.

Dhawan, K., Dhawan, S. y Sharma, K. (2004). *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23.

Drew, R. A. (1997). Micropropagation of *Passiflora* species (passionfruit). In *High-tech and micropropagation* (pp. 135-149). Berlin, Springer.

Feng, J.L., Chen, S. N., Tang, X. S., Ding, X. F., Du, Z. Y. y Chen, J. S. (2006). Quantitative determination of cucumber mosaic virus genome RNAs in virions by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(10): 669-676. doi: 10.1111/j.1745-7270.2006.00216.x

Flores, D. M. y Brenes, J. (2004). Establecimiento, micropropagación y enraizamiento *in vitro* de granadilla (*Passiflora ligularis*, Juss). Instituto tecnológico de Costa Rica, centro de investigación en biotecnología.

Gao, L., Ding, X., Li, K., Liao, W., Zhong, Y., Ren, R., Liu, Z., Adhimoolam, K. y Zhi, H. (2015). Characterization of Soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 128: 1489-1505. doi: 10.1007/s00122-015-2522-0

George, E. (1996). Plant propagation by tissue culture. Part 2. in practice. Ed. 2 Exegetics Limited. England, pp. 1361.

Gordillo, L. A. (2011). Incidencia del Soybean mosaic virus en cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Gutiérrez, P., Rivillas, A., Tejada, D., Giraldo, S., Restrepo, A., Ospina, M., Cadavid, S., Gallo, Y. y Marín, M. (2021). PVDP: A portable open source pipeline for detection of plant viruses in RNAseq data. A case study on potato viruses in Antioquia (Colombia). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113: 101604.

Huh, Y. S., Lee, J. K. y Nam, S. Y. (2017). Effect of plant growth regulators and antioxidants on in vitro plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Plant Biotechnology*, 44(3), 335-342.

Huetteman, C. A, Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 105-119.

Hurtado S. (2020). Aislamiento de endófitos en gulupa (*Passiflora edulis* Sims f.) y su potencial para promoción de crecimiento de la planta y control del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Isutsa, D. K. (2004). Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. *Scientia Horticulturae*, 99(3-4), 395-400.

Jaramillo, H., Marín, M. y Gutiérrez, P. (2018). Molecular characterization of Soybean mosaic virus (SMV) infecting Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia, Colombia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(11-12): 617-636.

Jaramillo, H., Marín, M. y Gutiérrez, P. A. (2019). Complete genome sequence of a *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(1), 8643-8654.

Jiménez, Y., Carranza, C. y Rodríguez, M. (2009). Manejo integrado del cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W. y Flórez, L. E. (Eds.) Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. (pp. 159 – 187) Bogotá, Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Joy, P. P. y Sherin, C. G. (2016). Diseases of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) and their Management. Insect Pests Management of Fruit Crops. Biotech, New Delhi. pp. 453-470.

Leal Acosta, A. C. (2020). *Agronegocios*. Recuperado el 9 de Enero de 2020 de <https://www.agronegocios.co/agricultura/colombia-exporto-us743-millones-de-frutas-exoticas-en-2019-6-mas-que-en-2018-2950228>

Lloyd, G. y McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, 30, 421-427.

Loaiza, C. (2013). Propagación vegetativa de la gulupa para la multiplicación clonal de plantas élite (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) Tesis de pregrado. Universidad de Caldas, Manizales.

Manjarrés-Hernández, E., y Perea-Dallos, M. (2012). Establecimiento de un protocolo de propagación de Gulupa (*Passiflora edulis* SIMS.) a partir de embriones cigóticos y yemas axilares. *Agronomía*, 20(2), 53-64.

Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W. y Flórez, L. E. (2009). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tohaoco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Ocampo, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., y Jarvis, A. (2010). Distribution of the genus *Passiflora* L. diversity in Colombia and its potential as an indicator for diversity management in the coffee growing zone. *Diversity*, 2, 1158-1180.

Ocampo, J. y Wyckhuys, K. (2012). Tecnología para el cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) en Colombia. Centro de Bio-sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, República de Colombia. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13557>

Ortiz, E. y Hoyos, L. (2012). Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 6(1), 110–116. <https://doi.org/10.17584/rcch.2012v6i1.1277>

Ortiz, L. P. (2019). Evaluación del crecimiento *in vitro* de maracuyá amarilla (*Passiflora edulis* Sims forma *flavicarpa*) a partir de segmentos nodales mediante la técnica de organogénesis. Tesis de pregrado en microbiología industrial. Universidad de Santander, Bucaramanga.

Otahola, V. (2000). Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. *Bioagro*, 12(3), 71-74.

Otahola, V. A. y Díaz, M. J. (2010). Regeneración *in vitro* de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* y *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y bencilaminopurina. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 23-28.

Ozarowski, M. y Thiem, B. (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(6), 937-947.

Parra, M., Sarkis, S. y Ocampo, J. (2011). Micropropagación *in vitro* de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) a partir de yemas apicales. Informe final proyecto aprovechamiento de la diversidad del maracuyá amarillo (*P. edulis flavicarpa* Degener), la

gulupa (*P. edulis* f. *edulis* Sims) y la granadilla (*P. ligularis* Juss.) para mejorar y diversificar los sistemas de producción en Colombia. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Bio-sistemas, pp. 48-51.

Passos, I. R. S. y Bernacci, L. C. (2005). Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma in vitro e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa, Cerrados, Brasil, 361-383.

Patel, A. K., Phulwaria, M., Rai, M. K., Gupta, A. K., Shekhawat, S. y Shekhawat, N. S. (2014). In vitro propagation and ex vitro rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. y Hook.

Pedroza-Manrique, J. A., González-Molina, S. R. y Téllez-Ortiz, D. C. (2007). Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. Revista Colombiana de Biotecnología, 9(2), 33-44.

Pedroza-Manrique, J. A. (2009). Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. Revista Colombiana de Biotecnología, 11(1), 17-32.

Pierik, R. (1990). Rejuvenation and micropropagation. In Progress in plant cellular and molecular biology (pp. 91-101). Springer, Dordrecht.

Phulwaria, M., & Shekhawat, N. S. (2013). An efficient in vitro shoot regeneration from immature inflorescence and ex vitro rooting of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC.-A red dye (Alkannin) yielding plant. Physiology and Molecular Biology of Plants, 19(3), 435-441.

Rathore, M. S., Rathore, M. S. y Shekhawat, N. S. (2013). Ex vivo implications of phytohormones on various in vitro responses in *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight. & Arn.—an endangered plant. Environmental and Experimental Botany, 86, 86-93.

Roca, W. M. y Mroginski, I. A. (Ed). (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT.

Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C. y Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.

Sepúlveda, M. (2020). Identificación molecular de virus que infectan gulupa (*Passiflora edulis sims*) en cultivos asintomáticos y material de siembra en antioquia. Tesis Ingeniería Biológica. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 26 p.

Tuhaise, S., Nakavuma, J. L., Adriko, J., Ssekatawa, K. y Kiggundu, A. (2019). In vitro regeneration of Ugandan passion fruit cultivars from leaf discs. *BMC research notes*, 12(1), 1-7.

White P. (1963). *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press. New York, USA. 228 p.

Xanthis, C.K., Maliogka, V.I. Lecoq, H., Dezbiez, C., Tsvetkov, I. y Katis, N.I. (2015). First report of cucumber mosaic virus infecting watermelon in Greece and Bulgaria. *Journal of Plant Pathology* 97(2), 391-403.

Yockteng, R., d'Eeckenbrugge, G. C., Souza-Chies, T. T. (2011). *Passiflora*. Kole, C. (Ed). *Parientes de cultivos silvestres: recursos genómicos y de reproducción*. Berlín, Springer.

D. Anexos: Capítulo 4

Anexo D-1: Muestras de *Passiflora edulis f. edulis* (PE) evaluadas por RT-qPCR indicando el código de la muestra, los valores de Tm y Ct para los virus SMV, CMV y PFYMV.

Muestra	SMV		CMV		PFYMV	
	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct

PEA	-	>35	83,0	20,99	84,0	29,77
PEB	-	>35	80,0	25,50	83,8	31,90
PEC	81,0	34,50	80,0	28,32	84,2	29,46
PED	81,0	33,30	-	>35	84,3	30,01
PEE	-	>35	-	>35	84,8	17,52
PEF	-	>35	-	>35	84,0	28,16
PEG	-	>35	80,0	27,45	84,0	33,59
PEH	-	>35	80,0	28,20	84,0	30,33
PEI	-	>35	-	>35	83,8	32,58
PEJ	-	>35	-	>35	84,2	33,02
PEK	-	>35	-	>35	83,8	28,77
PEL	-	>35	-	>35	84,8	17,70
PEM	-	>35	-	>35	85,2	33,41
PEN	81,0	33,32	-	>35	-	>35
PEÑ	-	>35	-	>35	84,7	19,82
PEO	-	>35	-	>35	84,3	33,43
PEP	80,3	32,10	-	>35	84,5	30,84
PEQ	-	>35	-	>35	84,3	34,31
PER	-	>35	-	>35	84,8	18,26
PES	-	>35	80,0	13,48	84,7	19,26
PET	-	>35	-	>35	-	>35
PEU	-	>35	-	>35	84,2	33,02
PEV	-	>35	-	>35	84,3	32,87
PEW	-	>35	-	>35	84,0	33,21
PEX	-	>35	-	>35	83,8	33,94
PEY	-	>35	-	>35	84,3	33,23

Anexo D-2: Enraizamiento *in vitro* en plántulas de gulupa en medio de cultivo 6 después de 7 meses de cultivo, suplementado con (A) 0,25 mg/L de TDZ, (B) 0,05 mg/L Kinetina y (C y D) 0,1 mg/L Zeatina



Capítulo 5.

Evaluación de termoterapia y quimioterapia *ex vitro* en plántulas de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) como tratamientos de limpieza viral.

Daniela Cardona

Laboratorio de Microbiología industrial. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Calle 59 A N 63-20. Medellín. Colombia

Anny Martínez

Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Calle 59 A N 63-20. Medellín. Colombia

Rodrigo Hoyos

Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Calle 59 A N 63-20. Medellín. Colombia

Guillermo Correa

Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Calle 59 A N 63-20. Medellín. Colombia

Yuliana Gallo

Facultad de Medicina. Universidad CES. Cl. 10a #22 - 04. Medellín. Colombia

Pablo Gutiérrez

Laboratorio de Microbiología industrial. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Calle 59 A N 63-20. Medellín. Colombia

Mauricio Marín

Laboratorio de Biología celular y molecular. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Calle 59 A N 63-20. Medellín. Colombia

RESUMEN

La gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) conocida como maracuyá morado, es la segunda fruta exótica más ampliamente exportada en Colombia después de la uchuva (*Physalis peruviana*). La comercialización de sus frutos representa uno de los mayores potenciales económicos para la agronomía del país. A pesar de su importancia, la producción de gulupa se ve restringida significativamente por diferentes enfermedades, especialmente aquellas de origen viral, conllevando a importantes pérdidas en los rendimientos en los cultivos, situación que se ve agravada por la ausencia de material de siembra certificado por su sanidad vegetal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de la termoterapia y la quimioterapia como tratamientos en la eliminación viral del tymovirus PFYMV en plántulas de gulupa, además de determinar los efectos de cada tratamiento sobre variables fenotípicas como altura de la planta, número de nudos, número de hojas y porcentaje de defoliación. Para esto, un grupo de plántulas se sometieron a temperaturas de 36°C, 38°C y 40°C y otra parte del material vegetal se evaluó bajo diferentes concentraciones de ribavirina (150, 200 y 250 mg/L) en tres tiempos de inmersión radicular (1, 2 y 3 h). Los resultados obtenidos indicaron que las plantas tratadas con temperaturas de 36°C lograron una eliminación viral del PFYMV en el 71,4% de las muestras, aunque con bajos porcentajes de supervivencia (36%). Este tratamiento también permitió disminuir la carga viral en un 22% para las plantas positivas para este virus. Por otra parte, en la quimioterapia, la mejor dosis de ribavirina fue 250 mg/L con tiempos de inmersión radicular de 3 horas; sin embargo, para esta misma concentración durante dos horas de inmersión, se obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia en las plantas tratadas, aunque con un menor porcentaje de eliminación viral.

Palabras Clave: Eliminación viral, Passifloraceae, PFYMV, ribavirina, sanidad vegetal

INTRODUCCIÓN

La agricultura colombiana es uno de los sectores más influyentes en la economía del país. Según cifras del DANE se han reportado exportaciones de US\$37,8 millones en frutas exóticas entre enero y abril del 2021; 27,5% más de lo registrado en el mismo periodo del año anterior (ProColombia, 2021). El cultivo y la exportación de gulupa ha

encabezado este mercado durante los últimos años, contribuyendo significativamente al sector hortofrutícola del país (Ocampo y Wyckhuys, 2012; Analdex, 2020); su cultivo se extiende a cerca de 1.500 ha que producen alrededor de 25.000 t de fruta al año, principalmente en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Santander y Cauca (Castilla, 2019; Agronet, 2020). Además de su contribución económica, la gulupa también es valorada por sus excelentes características medicinales, nutricionales y ornamentales (Jiménez et al., 2009; Dhawan et al., 2004; Yockteng et al., 2011).

El cultivo de gulupa presenta diferentes enfermedades que limitan su productividad, incluyendo aquellas de origen viral, que vienen incrementándose en los últimos años con una evidente disminución de los rendimientos y provocan el abandono y/o cambio de este frutal por parte de los agricultores (Guerrero et al., 2011, Jaramillo, 2017). Entre las enfermedades virales reportadas en Colombia en gulupa se encuentran especies del género potyvirus como soybean mosaic virus (SMV) (Cutler et al., 2018; Jaramillo et al., 2018; Sepúlveda et al., 2021) y cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV) (Camelo, 2010), el cucumovirus cucumber mosaic virus (CMV) (Camelo, 2010; Gordillo, 2011, Cardona et al, 2021), el tymovirus passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) (Jaramillo et al., 2019), además de un nuevo tymoviridae (purple passionfruit leaf deformation virus -PpLDV), recientemente reportado en el suroeste de Antioquia (Cardona et al., 2021) y una nueva especie de badnavirus denominada: gulupa bacilliform virus A (GBVA) (Sepúlveda et al., 2020). La presencia de estas enfermedades ha requerido la investigación de otros enfoques alternativos que permitan generar material vegetal sano, como lo es el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, apoyado en técnicas de limpieza viral tales como cultivo de meristemas, termoterapia, quimioterapia, crioterapia o combinaciones entre ellas (Petri y Burgos, 2005). No obstante, la implementación del cultivo *in vitro* para la micropropagación de una especie vegetal requiere de un sistema de regeneración eficiente y reproducible para su éxito. *Passiflora* es un género muy diverso con aproximadamente 520 especies; esta alta heterogeneidad hace que la aplicación de la tecnología de cultivo de tejidos requiera de evaluaciones específicas. Así, por ejemplo, para *P. edulis* se recomienda el enraizamiento *ex vitro* para reducir tiempos de propagación y aumentar porcentajes de supervivencia (MacDougal y Feuillet, 2004).

El principal método de propagación de la gulupa en Colombia es a través de semilla sexual y la comercialización posterior de las plántulas derivadas de éstas, lo que puede conducir a la distribución de virus como SMV, PFYMV y CMV entre diferentes regiones de cultivo (Jaramillo et al., 2018; Sepúlveda et al., 2021). Con el fin de contribuir a la obtención de material de siembra de gulupa libre de virus, en este trabajo se evaluó la efectividad de las técnicas de eliminación viral: termoterapia y quimioterapia en plántulas de gulupa obtenidas de viveros locales de Antioquia, utilizando pruebas de RT-qPCR para la detección de virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se obtuvieron 300 plántulas de gulupa de viveros del oriente de Antioquia (Colombia) con 2 a 3 meses de edad. Las plántulas se trasladaron al laboratorio de microbiología industrial de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín donde fueron trasplantadas a vasos plásticos con turba estéril y se mantuvieron en casa malla para evitar el contacto con posibles insectos vectores y fitopatógenos. Las plantas fueron enumeradas del 1 al 100 por triplicado; cada código representó una unidad experimental.

Extracción de ácidos nucleicos

El RNA total fue extraído con el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher Scientific) a partir de 100 mg de tejido foliar, preparando una mezcla (*bulk*) de las tres muestras individuales que conformaban la unidad experimental, el tejido foliar fue macerado con nitrógeno líquido siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue eluido en 40 μ L de agua estéril tratada con DEPC. La concentración y pureza del RNA fue evaluada por lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific). La síntesis de cDNA se realizó para los tres virus

reportados en Antioquia infectando este frutal: soybean mosaic virus (SMV), passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) y cucumber mosaic virus (CMV). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 μ l, incluyendo 200 U de transcriptasa inversa RevertAid (Thermo Fisher Scientific), 1X buffer RT, 0,5 mM dNTPs, 20 unidades de RiboLock, 50-100 ng de RNA total y 20 pmol de los primers reverse para cada virus, oligo(dT) para SMV, Tymo R-CP para PFYMV y una mezcla equimolar de CMV-R, CMV-do1244b y CMV-qRT-R para CMV (Tabla 1). Las reacciones se incubaron a 42°C por 1 hora, seguidos por la inactivación de la enzima durante 10 min a 70°C.

Detección de virus por RT-qPCR

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se realizaron en un volumen final de 14 μ l, utilizando 6,5 μ l del kit Maxima SYBR Green/ROX (Thermo Fisher Scientific), 50-100 ng de cDNA y 0,3 μ M de los primers específicos (Tabla 1). Todas las reacciones tuvieron un control positivo con tejido foliar en el que previamente se identificó el virus y un control negativo, donde se incluyeron todos los reactivos excepto el ADNc, el cual fue reemplazado por agua. La amplificación se realizó en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen) iniciando con la activación de la Taq polimerasa por 10 min a 95°C, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s y 52°C a 60 s. Al final de las reacciones se obtuvieron los valores de ciclo umbral (*cycle threshold* -Ct) y de temperatura de fusión (*melting temperature* -Tm)

Tabla 1. Secuencias de los *primers* utilizados en este estudio para la síntesis de cDNA y RT-qPCR.

Virus	Primers	Secuencia	Fuente
SMV	SMV_qRT-F	5' CAGATGGGCGTGGTTATGA 3'	Gao et al. (2015)
	SMV_qRT-R	5' ACA ATG GGT TTC AGC GGA TA 3'	
PFYMV	Tymo_F_CP	5' AGT CTC CGA CTC AAT CAG CG 3'	Jaramillo et al. (2019)
	qTymo_R_CP	5' GCG ACG AGA GAG GTG AGT CG 3'	

CMV	CMV-R	5' CGA CTT CAA CAG GCG AGC 3'	Cuspoca (2007)
	CMVdo1244b	5' TGC TCR AYG TCR ACA TGA AG 3'	Xanthis et al. (2015)
	CMV_qRT_R	5' GGA TGC TGC ATA CTG ACA AAC C 3'	Feng et al. (2006)

A partir de la detección viral inicial se determinó la presencia PFYMV en 32 unidades experimentales y una infección mixta de PFYMV y CMV en 68 unidades experimentales. De esta forma, las plantas infectadas fueron distribuidas equitativamente en los dos tratamientos de eliminación viral (termoterapia y quimioterapia). Por otro lado, SMV no se detectó en ninguna de las muestras evaluadas por RT-qPCR.

Termoterapia

Para el tratamiento térmico se utilizaron 52 unidades experimentales, cada una de ellas compuesta por tres plántulas. El material vegetal fue trasladado a incubadoras con temperaturas de 36, 38 y 40°C y un fotoperiodo de 12 horas luz durante 3 semanas. Al interior de las cámaras se ubicó un termómetro para monitorear la temperatura; las plántulas se regaron periódicamente de acuerdo con sus necesidades hídricas para evitar la desecación. Las plantas control se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C) en casa malla. Después de 45 días de recuperación, las plantas fueron indexadas nuevamente por RT-qPCR para determinar el efecto del tratamiento en la eliminación viral, utilizando la metodología descrita anteriormente.

Quimioterapia

El tratamiento de quimioterapia se realizó en 48 unidades experimentales utilizando ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) (Sigma -Aldrich, EEUU) como compuesto antiviral. Para la aplicación de ribavirina *ex vitro*, cada una de las plantas fue retirada de la turba estéril y las raíces fueron lavadas con abundante agua corriente hasta retirar completamente la turba. Posteriormente, se prepararon las soluciones madre de ribavirina en concentraciones de 150, 200 y 250 mg/L en agua y se evaluaron tres

tiempos de inmersión radicular 1, 2 y 3 horas. Las raíces fueron sumergidas en la solución a temperatura ambiente. Después del tratamiento químico, las raíces fueron nuevamente lavadas con agua corriente y sembradas en vasos plásticos con turba estéril. A las plántulas utilizadas como control del tratamiento se les realizó el mismo procedimiento, pero en este caso las raíces se sumergieron en agua durante los mismos tiempos (1, 2 y 3 h). Las plantas se ubicaron en casa malla y después de 45 días se evaluaron por RT-qPCR para la detección de los virus PFYMV y CMV.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento de termoterapia tuvo cuatro niveles de temperaturas: 25, 36, 38 y 40°C. Se conformaron cuatro bloques de unidades experimentales homogéneas a partir de los valores de Ct iniciales para PFYMV y CMV. Para tal efecto, se tuvieron en cuenta las similitudes entre unidades experimentales a partir de sus distancias euclídeas. Adicionalmente, se tuvo en cuenta la detección/no detección del CMV. Por las condiciones iniciales, dos de los bloques tuvieron una única réplica de cada tratamiento, mientras que en otros se evaluaron varias réplicas (bloques al azar generalizados). En total, cada temperatura contó con 13 unidades experimentales, cada una de ellas compuesta por 3 plántulas de gulupa. En cada tratamiento se incluyeron 2 unidades experimentales infectadas únicamente con PFYMV y 11 unidades experimentales con infección conjunta PFYMV-CMV. En total se emplearon 156 plantas individuales para todos los tratamientos de temperatura.

El experimento de quimioterapia tuvo 12 tratamientos, compuestos por la combinación de cuatro concentraciones de ribavirina (0, 150, 200 y 250 mg/L) y tres tiempos de inmersión radicular (1, 2 y 3 horas). Se conformaron cuatro bloques de unidades experimentales homogéneas a partir de los valores de Ct iniciales para PFYMV y CMV, teniendo en cuenta las similitudes entre unidades experimentales a partir de sus distancias euclídeas y la detección/no detección del CMV. Cada tratamiento tuvo una réplica dentro de cada bloque (DBA): dos de ellas con presencia de PFYMV y otras dos con infección mixta

(PFYMV-CMV). En total se utilizaron 144 plántulas de gulupa en los tratamientos de quimioterapia.

En ambos ensayos, únicamente las plantas viables se sometieron a detección viral por RT-qPCR. El porcentaje de eliminación viral se expresó como: número de plantas libres de virus/plantas sobrevivientes x 100 y la disminución de carga viral se calculó como: $((Ct_{\text{final}} - Ct_{\text{inicial}})/Ct_{\text{inicial}}) \times 100$. Se analizaron los efectos de cada tratamiento a partir de variables fenotípicas como: supervivencia, viabilidad, altura de la planta, número de nodos, número de hojas nuevas y porcentaje de defoliación. Los datos de cada variable fueron tomados 45 días después del tratamiento con el fin de ofrecer un tiempo de recuperación a las plantas y observar la influencia de cada tratamiento en su desarrollo. Los datos de altura, número de nudos, número de hojas nuevas y defoliación se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% y posterior aplicación de la prueba DSH de Tukey para la comparación de medias. Las proporciones de supervivencia y viabilidad se compararon mediante el método del score híbrido de Newcome, con corrección de Holm para controlar la tasa de error por familia. La normalidad de los residuales se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En los casos en los que no se satisfizo el supuesto de normalidad ni aún sobre las respuestas transformadas, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para diferir efectos entre tratamientos, con posterior aplicación de la prueba de Dunn, con corrección de Holm para controlar la tasa de error por familia. En la totalidad de los procedimientos descritos se utilizó un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Todos los análisis se realizaron usando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2021).

RESULTADOS Y DISCUSION

Detección de CMV por RT-qPCR

Las evaluaciones finales del cucumovirus CMV por RT-qPCR en las 68 unidades experimentales en las que se detectó inicialmente este virus, indicaron que no fue posible

detectarlo durante los 35 ciclos de la prueba. La ausencia de este virus fue evidente tanto en las plantas sometidas a los dos tratamientos empleados (termoterapia y quimioterapia) como en las plantas control, por lo cual dichos datos no se incluyeron en los análisis estadísticos. El CMV es un virus con un amplio rango de hospedantes (alrededor de 1240) generando grandes pérdidas en la agricultura (Jacquemond, 2012); sin embargo, las interacciones entre este virus y *P. edulis* han sido poco estudiadas hasta ahora. El primer registro de CMV en esta especie fue en Taiwán en 1981, posteriormente se detectó en Brasil en 1986 y 10 años después en Fujian, China (Lan et al., 2020). Estudios más recientes reportan la infección por CMV en plantas de gulupa en el departamento de Cundinamarca (Colombia), detectado por PCR convencional (Camelo, 2010); lo que se suma al primer reporte formal utilizando RT-qPCR de este virus en material de siembra y plantas en producción (sintomáticas y asintomáticas) de gulupa en Antioquia (Cardona et al., 2021).

Existen reportes que indican que los efectos individuales de CMV en los cultivos de pasifloras generalmente son marginales debido a que las plantas se recuperan rápidamente después de su infección (Kitajima et al., 2018). Lan et al. (2020) confirmaron que la resistencia que ejerce *P. edulis* al estrés por CMV es modulada por un aumento en los niveles de metabolitos secundarios y por la actividad de enzimas antioxidantes. Lo anterior ofrece elementos a ser considerados sobre las posibles razones por las cuales no se logró detectar CMV en ninguna de las plantas de gulupa tres meses después de su detección inicial en la presente investigación.

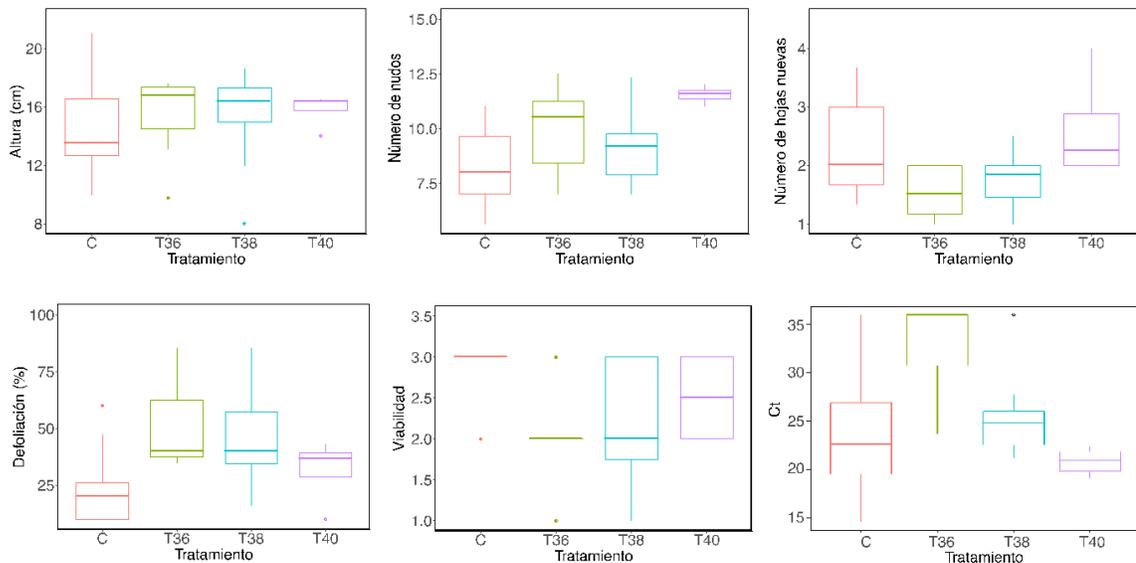
Efecto del tratamiento de termoterapia *ex vitro* en plántulas de gulupa

Las plantas sometidas al tratamiento de termoterapia tuvieron diferentes respuestas tanto en la supervivencia y eliminación viral, como en las variables fenotípicas observadas. Los resultados indicaron que en los tratamientos térmicos la única variable fenotípica que no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$) fue la altura de la planta, es decir que las plantas con tratamiento a 36, 38 y 40°C presentaron un crecimiento normal respecto a las plantas control; la altura promedio en las plantas tratadas fue de 15,4 cm para las

plantas sometidas a 36°C; 15,6 cm para las plantas a 38°C y 15,8 cm para las plantas a 40°C, mientras que en las plantas control, éstas tuvieron 14,8 cm en promedio. Por otra parte, la termoterapia sí tuvo diferencias significativas sobre el número de nudos generados en las plantas en la temperatura de 40°C, pues se presentaron 11,5 nudos en comparación con los tratamientos a 36 y 38°C (9,9 y 9,2 nudos) y en las plantas control (8,2 nudos). Este hecho podría ser explicado debido a que en las plantas tratadas a 40°C se pudiera presentar quemadura en el ápice, causando la muerte de este tejido y dando paso a la formación de nuevos nudos y a la brotación de las yemas axilares (Figura 1).

En cuanto a la formación de nuevo tejido foliar, la temperatura tuvo un efecto únicamente entre el tratamiento de 36°C y 40°C con un promedio de 1,6 y 2,6 hojas nuevas respectivamente. Para esta variable, las plantas control no presentaron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos de temperatura. Por otro lado, la defoliación fue probablemente la respuesta más evidente después de someter las plántulas a los tratamientos evaluados; de esta forma, las plantas control presentaron un 23,7% de defoliación, mientras que los tratamientos a 36, 38 y 40°C presentaron porcentajes de defoliación de 51,4%; 46,5% y 31,5%, respectivamente. Curiosamente se observó que a temperaturas inferiores (36°C) las hojas de las plantas se tornaron cloróticas y se cayeron con mayor facilidad que a altas temperaturas (40°C). También se observó que la defoliación y el número de hojas nuevas fueron variables cuyas respuestas en todos los tratamientos estuvieron correlacionadas negativamente; es decir, un aumento en la defoliación provocó una disminución en el número de hojas nuevas. Así, las plantas procedentes del tratamiento a 36°C presentaron mayor porcentaje de defoliación y menor número de hojas nuevas, mientras que en el tratamiento a 40°C los valores bajos de defoliación permitieron la mayor respuesta en la formación de nuevo tejido foliar (Figura 1).

Figura 1. Análisis de varianza y prueba de medias de Tukey para determinar los efectos entre las temperaturas y las variables fenotípicas de plántulas de gulupa: altura de las plantas, número de nudos, número de hojas nuevas, porcentaje de defoliación, viabilidad de las plantas y valores de Ct promedio para cada temperatura. Todas las variables representan la respuesta de las plantas 45 días después del tratamiento.



Los resultados entre los valores de temperatura evaluados y el porcentaje de supervivencia indicaron diferencias significativas del tratamiento a 36°C respecto al control ($p < 0,05$) aunque también se observaron diferencias entre los tratamientos de 36, 38 y 40°C. La supervivencia a 38°C fue significativamente superior (64,1%) a la obtenida en el tratamiento de 36°C (35,9%) y 40°C (25,6%) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de plantas de gulupa sometidas a termoterapia *ex vitro* después de 45 días de tratamiento.

Tratamiento	Número de plantas en tratamiento	Número de plantas viables	Supervivencia (%)
Control	39	38	97,4
36°C	39	14	35,9
38°C	39	25	64,1
40°C	39	10	25,6

Para el caso de la evaluación de limpieza viral para PFYMV, los resultados obtenidos mostraron que en las plantas tratadas a 36°C se logró la eliminación del virus en 5 de las 7 unidades experimentales sobrevivientes; mientras que en las plantas tratadas a 38°C se eliminó el virus en tan sólo 1 unidad experimental de las 12 evaluadas. En aquellas plantas sometidas a la mayor temperatura (40°C) no se observó la eliminación de este virus. Adicionalmente, se encontró que la termoterapia favoreció la disminución de carga viral, definida en términos de valores Ct en las pruebas de RT-qPCR. De esta forma, en el tratamiento a 36°C se obtuvo una disminución de carga viral del 22,1%, mientras que en el tratamiento a 38°C este valor fue del 18,4%. Por el contrario, en las plantas tratadas a 40°C se aumentó la carga viral en un 1,1% respecto a los valores de Ct promedio obtenidos en la detección viral inicial (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de disminución de carga viral y eliminación de PFYMV en plantas de gulupa después de tratamiento de termoterapia.

Temperaturas	Unidades experimentales totales (und. exp.)	Disminución de carga viral (%)	Und. Exp libres de virus/ total und. exp. evaluadas	Eliminación viral de PFYMV (%)
Control	13	9,6	2/13	15,4
36°C	13	22,1	5/7	71,4
38°C	13	18,4	1/12	8,3
40°C	13	NA	0/4	0

Como se esperaba, las plantas utilizadas como control mostraron resultados favorables en todas las respuestas fenotípicas evaluadas y el mayor porcentaje de supervivencia (97,4%). El tratamiento a 36°C presentó respuestas similares respecto a los controles en las variables altura, número de nudos y número de hojas nuevas; sin embargo, por los altos niveles de defoliación se observó pérdida de vigor en las plántulas, lo cual posiblemente también ocurrió como respuesta al proceso de eliminación viral. El tratamiento térmico de 36°C fue el más promisorio en la eliminación del tymovirus PFYMV en el 71,4% del material evaluado, además contribuyó a la disminución de carga viral con valores Ct promedio de 20,1 antes del tratamiento a 24,6 después del

tratamiento. El tratamiento a 38°C presentó respuestas fenotípicas muy similares a las obtenidas a 36°C, pero difirió en cuanto a la supervivencia y a la eliminación viral. En este tratamiento las plantas fueron más tolerantes a la temperatura pero menos eficientes en la eliminación viral (8,3%), este hecho fue similar en cuanto la carga viral presente antes y después del tratamiento (20,4 a 24,1, respectivamente). Finalmente, el tratamiento a 40°C fue el menos promisorio ya que además de presentar altas tasas de mortalidad (74,4%), la carga viral aumento en las plantas sobrevivientes (Ct de 21,1 a Ct de 20,8); es posible que el estrés al cual son sometidas las plantas por altas temperaturas disminuya sus respuestas intrínsecas de defensa a los fitopatógenos y de esta forma se favorezca la multiplicación del virus.

Aunque la termoterapia para limpieza viral se utiliza usualmente como tratamiento en plantas cultivadas *in vitro* y en combinación con otras técnicas, se ha demostrado la efectividad del tratamiento *ex vitro* con temperaturas de 35° a 45° durante 45 días, con intermitencias de temperatura entre el día y la noche, para la eliminación del potyvirus CABMV en maracuyá (*P. edulis* f. *flavicarpa*). En dicho reporte, los tratamientos lograron eliminar el virus en 2 de las 5 líneas utilizadas; sin embargo, este estudio no precisa cual temperatura presentó los mejores resultados de eliminación viral (Andrade et al., 2010).

Efecto del tratamiento de quimioterapia *ex vitro* en plántulas de gulupa

Las plantas de gulupa que sobrevivieron al tratamiento con ribavirina presentaron respuestas diferentes que fueron o no significativas, de acuerdo con la concentración utilizada, al tiempo de inmersión radicular o a la interacción entre estos dos factores. La altura de las plantas varió significativamente dependiendo de los tiempos de inmersión utilizados, sin importar la concentración de ribavirina a la cual eran sometidas. El crecimiento de las plantas fue reducido al sumergir las raíces durante 1 y 3 horas en la solución del antiviral, con alturas promedio de 11,1 cm y 11,5 cm, respectivamente; mientras que tiempos de inmersión de 2 horas en todas las concentraciones evaluadas generaron un mayor crecimiento promedio (14,5 cm). Contrario a esto, el número de hojas nuevas fluctuó de acuerdo con las concentraciones aplicadas de ribavirina,

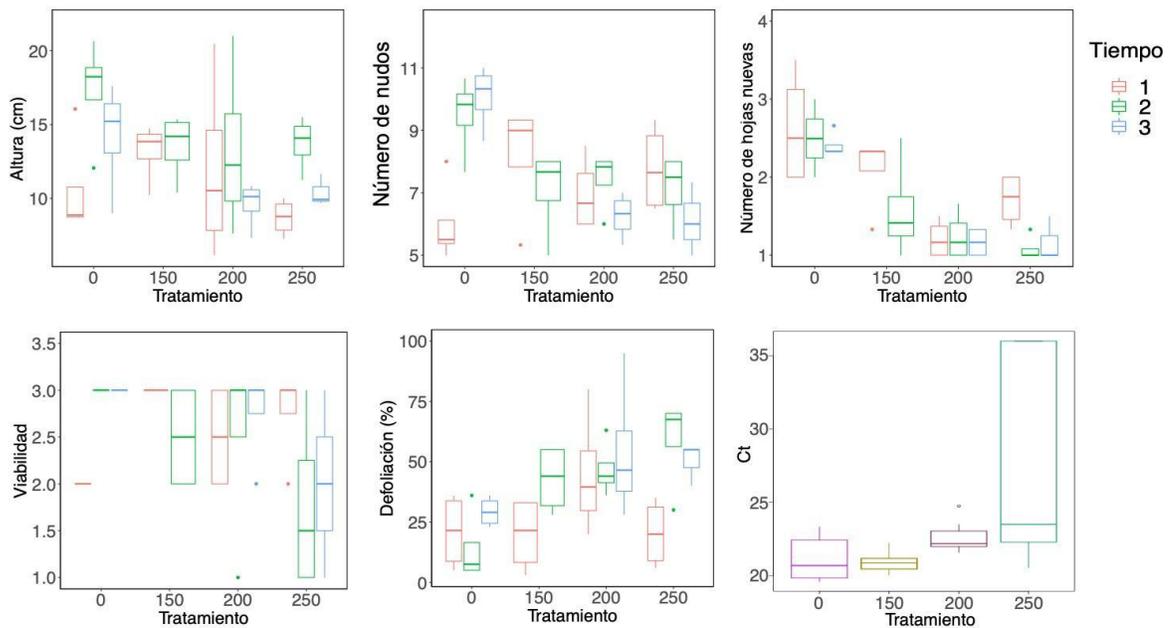
independientemente del tiempo en el cual se dejaron sumergidas las raíces. Todas las dosis de ribavirina afectaron significativamente el número de hojas nuevas en las plantas de gulupa con respecto al tratamiento control (2,5 hojas nuevas), así en los tratamientos de 150 mg/L y 250 mg/L se generaron 1,8 y 1,3 hojas nuevas en las plantas, mientras que bajo la dosis de 200 mg/L de ribavirina, sólo se presentaron 1,2 hojas nuevas en promedio (Figura 2).

Algunas variables fenotípicas como el número de nudos y la defoliación causada por el tratamiento, tuvieron efectos tanto por la dosis de ribavirina empleada como por los tiempos de inmersión radicular. Concentraciones de 200 mg/L y 250 mg/L tuvieron un menor número de nudos (6,87 y 7,08) en comparación con el control, donde en promedio se presentaron 8,52 nudos. El análisis realizado sobre las concentraciones en cada uno de los tiempos indicó que no hay diferencias significativas entre tratamientos al dejar las raíces sumergidas 1 hora, pero al someter las plantas a 2 horas de tratamiento si difiere significativamente la cantidad de nudos generados por la concentración de 200 mg/L de ribavirina (7,41) con respecto al tratamiento control (9,45). Igualmente, para aquellas plantas tratadas durante 3 horas, la cantidad de nudos disminuyó; así, en el tratamiento de 200 mg/L en promedio las plantas tuvieron 6,24 nudos y para 250 mg/L este valor fue de 6,11 nudos. En general, altas concentraciones de ribavirina sumado a largos tiempos de inmersión radicular en la solución del antiviral causan que las plantas de gulupa tengan menor cantidad de nudos, lo que implica indirectamente menos sitios de desarrollo foliar (Figura 2).

La defoliación también se vio afectada por el tratamiento químico utilizado y por el tiempo de inmersión; en este caso la concentración de 150 mg/L de ribavirina no presentó diferencias significativas respecto al control, con valores bajos en esta variable respuesta (0,3); mientras que las concentraciones superiores (200 mg/L y 250 mg/L) presentaron porcentajes de defoliación cercanos al 48 y 42%, respectivamente. La caída prematura de las hojas también aumentó con el tiempo de exposición de las raíces al agente químico; al dejar las plantas 3 horas en la solución la defoliación promedio para todas las

concentraciones fue de 43%, mientras que bajo 1 hora de exposición la defoliación se redujo al 26% (Figura 2).

Figura 2. Análisis de varianza entre las concentraciones de ribavirina en diferentes tiempos de inmersión radicular de gulupa respecto a las variables fenotípicas: altura de las plantas, número de nudos, número de hojas nuevas, porcentaje de defoliación, viabilidad de las plantas y valores de Ct promedio para cada concentración de ribavirina empleada. Todas las variables representan la respuesta de las plantas 45 días después del tratamiento.



El porcentaje de supervivencia de las plántulas tratadas con respecto al control, presentó diferencias significativas en dos casos: cuando las raíces de las plantas fueron sumergidas por 2 horas en la dosis de ribavirina de 250 mg/L, éstas sobrevivieron menos (58,3%) respecto al control (100%), y cuando las raíces fueron sumergidas por 3 horas en las plantas tratadas con 250 mg/L de ribavirina (50%). Estos resultados permiten concluir que cuando se utiliza la misma dosis de ribavirina, la cantidad de tiempo al cual las raíces están expuestas al tratamiento influye en la supervivencia de las plantas, de

igual modo cuando se utiliza el mismo tiempo de inmersión radicular pero bajo el incremento de las concentraciones de ribavirina, el porcentaje de plantas sobrevivientes también disminuye (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de supervivencia de plantas de gulupa sometidas a tratamiento con quimioterapia *ex vitro* después de 45 días.

Concentración Ribavirina (mg/L)	Tiempos de inmersión (horas)	Número de plantas en tratamiento	Número de plantas viables	Supervivencia (%)
0	1	12	8	66,7
	2	12	12	100
	3	12	12	100
150	1	12	12	100
	2	12	10	83,3
	3	12	0	0
200	1	12	10	83,3
	2	12	10	83,3
	3	12	11	91,7
250	1	12	11	91,7
	2	12	7	58,3
	3	12	6	50,0

Los resultados obtenidos en cuanto a la eliminación viral al utilizar concentraciones de 250 mg/L de ribavirina dependieron de los tiempos de inmersión, así al tratar las plantas durante 1 o 2 horas se logró eliminar el virus en el 25% de muestras analizadas. Aquellas plantas tratadas con ribavirina durante 3 horas presentaron mayor eliminación viral (66,7%), sin embargo, tiempos superiores de tratamiento incrementaron la muerte del material vegetal en un 25% (Tabla 5). Finalmente, se observó que todas las concentraciones de ribavirina utilizadas (150, 200 y 250 mg/L) y los diferentes tiempos de tratamiento ayudaron a disminuir la carga viral presente en las plantas entre un 6% y un 19%. El tratamiento que mayor disminución de carga viral indujo fue 200 mg/L durante 2 horas (19,1%) y el menos efectivo fue aquel de 150 mg/L de ribavirina durante 2 horas.

Tabla 5. Porcentaje de disminución de carga viral y eliminación de PFYMV en plantas de gulupa después de tratamiento de quimioterapia con ribavirina.

Concentración Ribavirina (mg/L)	Tiempos de inmersión (horas)	Unidades experimentales totales (und. exp.)	Disminución de carga viral (%)	Und. Exp libres de virus/ total und. exp. evaluadas	Eliminación de PFYMV (%)
0	1	4	12,2	0/4	0
	2	4	0,4	0/4	0
	3	4	10,0	0/4	0
150	1	4	10,7	0/4	0
	2	4	5,7	0/4	0
	3	4	-	-	-
200	1	4	12,8	0/4	0
	2	4	19,1	0/4	0
	3	4	12,9	0/4	0
250	1	4	6,0	1/4	25,0
	2	4	18,7	1/4	25,0
	3	4	14,2	2/3	66,7

El tratamiento de quimioterapia con ribavirina *ex vitro* ha sido poco utilizado de acuerdo con lo reportado en la literatura; sin embargo, un ensayo desarrollado por Hansen en 1979 utiliza este método como tratamiento para la eliminación del apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) en plántulas de *Chenopodium quinua*. En este estudio se evaluó la efectividad de esta metodología, al utilizar tres tipos de aplicaciones: directamente en el suelo (*drench*), aspersion en las hojas y por inmersión radicular. Los resultados obtenidos indicaron que no había diferencias significativas entre la aspersion de la ribavirina en el tejido foliar y la aplicación directa en el suelo, además la eliminación de síntomas virales en las plantas tratadas no fue efectiva; contrario a lo ocurrido en las plantas sometidas al tratamiento químico por inmersión de las raíces en la solución de ribavirina. El estudio evaluó diferentes concentraciones (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 1000 mg/L) y diferentes tiempos de inmersión (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 horas), los resultados indicaron que en concentraciones iguales o superiores a 300 mg/L, las plántulas presentaron fitotoxicidad, al igual que al sumergir las raíces durante 4 horas o más en la solución de ribavirina.

Aunque se han utilizado varios métodos para eliminar virus en plantas (cultivo de meristemos, termoterapia, quimioterapia, crioterapia y combinaciones entre ellas) (Wang y Volkonen, 2008; Yang et al., 2013; Waswa et al., 2017; Kushnarenko et al., 2017) algunos reportes indican que la termoterapia y la quimioterapia han resultado ser los tratamientos más importantes y efectivos en la eliminación de virus en especies como la papa (Bamberg et al., 2016). Utilizar productos químicos antivirales resulta ser una técnica importante para la producción de plántulas libres de virus (Khurana, 2004) por su fácil manejo y la posibilidad de combinarse con otras técnicas de rutina como el cultivo de meristemas (Cassells y Long, 1982). La ribavirina es utilizada usualmente por su capacidad de eliminar virus utilizando bajas dosis (25 mg/L), permitir el crecimiento y la regeneración del tejido vegetal, por su capacidad para moverse sistémicamente en las plantas, por su rápida eliminación y porque sus efectos fitotóxicos son menores en comparación con otros productos antivirales (Cordeiro, 2003). No obstante, su uso bajo condiciones *ex vitro* requiere dosis más elevadas, pero tiempos muy cortos de tratamiento, lo que representa una ventaja respecto a su uso bajo condiciones *in vitro*.

La presente investigación representa una evaluación inicial sobre la efectividad de tratamientos como termoterapia y quimioterapia bajo condiciones *ex vitro* en plántulas de gulupa. Se recomienda continuar con estudios posteriores en los cuales se evalúen otros rangos de temperaturas inferiores a 40°C, concentraciones de ribavirina intermedias entre 200 mg/L y 250 mg/L o mayores tiempos de inmersión radicular al utilizar bajas concentraciones de ribavirina (150 mg/L).

CONCLUSIONES

El tratamiento de termoterapia de plántulas de gulupa, indicó que a la temperatura de 36°C se obtuvieron los porcentajes de eliminación de PFYMV más promisorios, presentando eliminación en el 71,4 % de las muestras evaluadas. Además, esta temperatura favoreció la disminución de carga viral (22,1%) en las dos unidades

experimentales restantes en las cuales no se eliminó el virus. Sin embargo, las plantas bajo estas condiciones térmicas presentaron niveles de supervivencia relativamente bajos (36%). Por otra parte, el tratamiento a 40°C tuvo una alta tasa de mortalidad (74,4%), además de no ser efectivo en la eliminación o disminución de carga viral para ninguna de las muestras analizadas.

El tratamiento de quimioterapia de plántulas de gulupa a partir de la aplicación de ribavirina como agente antiviral, mostró que únicamente la concentración de 250 mg/L fue efectiva para eliminar el PFYMV, cuando las plantas fueron sumergidas durante 1 o 2 horas se presentó una eliminación viral en el 25% de las muestras. Bajo esta misma concentración pero aumentando el tiempo de inmersión a 3 horas, el porcentaje de eliminación del PFYMV aumentó (66,7%) pero la supervivencia disminuyó con respecto a los tiempos de 1 y 2 horas. Las plantas tratadas con 150 mg/L de ribavirina no tuvieron efectos significativos en las variables de interés, pues su comportamiento fue muy similar al control y no se presentó eliminación de PFYMV en ninguna muestra evaluada.

REFERENCIAS

Agronet. (2020). Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano. Recuperado el 22 de agosto de 2021 de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>

Analdex. (2020). Asociación Nacional de Comercio Exterior. Recuperado el 10 de agosto de 2021 de <https://www.analdex.org/2021/02/25/exportacion-de-gulupa-en-2020/>

Andrade, S., Fonseca, L., Silvia, M., Faleiro, F. y Junqueira N. (2010). Estudios preliminares para el uso de termoterapia ex vitro en maracujazeiro-azedo visando a eliminación de virus-do-endurecimento-dos-frutos- Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Embrapa Cerrados), 267, 1-18.

Camelo, V. (2010). Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región de Sumapaz (Cundinamarca). Trabajo de

grado de maestría en Fitopatología. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/6860>

Cardona D, Gallo Y, Higueta M, Hoyos R, Gutiérrez P, Marín M (2021). Detección molecular de virus en cultivos, plántulas y semillas de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*) en el oriente de Antioquia. *Bioagro. In press*.

Cassells, A. C. y Long, R. D. (1982). The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of Virazole. *Potato Research*, 25(2), 165-173.

Castilla, J. (2019). Agronegocios. Recuperado el 5 de Julio de 2019 de <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-exportacion-de-gulupa-supero-las-8109-toneladas-2881324>

Cordeiro, N. L., Gilvan, P. R., Lilia, W. y Pereira, A. G. (2003). Stock indexing and Potato virus Y elimination from potato plants cultivated in vitro. *Scientia Agricola*.

Cuspoca, J. 2007. Evaluación de virus de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en plantas indicadoras y su detección por PCR. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 31 p.

Cutler, J., J. Langer, S. Von Bargaen, O. Acosta-Losada, F. Casierra-Posada, A. Castañeda-Cárdenas, M. Betancourt-Vásquez, W. Cuellar, E. Arvydas-Stasiukynas, D. Altenbach y C. Büttner. 2018. Preliminary evaluation of associated viruses in production systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12(2), 390-396.

Dhawan, K., Dhawan, S. y Sharma, K. (2004). *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23.

Feng, J. L., Chen, S. N., Tang, X. S., Ding, X. F., Du, Z. Y. y Chen, J. S. (2006). Quantitative determination of cucumber mosaic virus genome RNAs in virions by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(10): 669-676. doi: 10.1111/j.1745-7270.2006.00216.x

Gao, L., X. Ding, K. Li, W. Liao, Y. Zhong, R. Ren, Z. Liu, K. Adhimoolam y H. Zhi. (2015). Characterization of Soybean mosaic virus resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 128, 1489-1505.

Gordillo, L.A. 2011. Incidencia del Soybean mosaic virus en cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en Cundinamarca y estudio de su diversidad en Colombia. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 106 p.

Guerrero, E., Potosí, C., Melgarejo, L.M. y Hoyos, L. (2011). Manejo agronómico de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en el marco de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Melgarejo, L.M. (Ed). *Ecofisiología del cultivo de la gulupa (Passiflora edulis Sims)* (pp. 123). Bogotá, Produmedios.

Kitajima. (2020). An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). *Biota Neotropica* 20(2): e20190932.

Hansen, J. A. (1979). Inhibition of apple chlorotic leaf spot virus in *Chenopodium quinoa* by ribavirin. *Plant Diseases Report*, 63, 17-20.

Hussain, A., Qarshi, I., A., Nazir, H. y Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. Leva, A. y Rinaldi, L. (Ed), *Recent advances in plant invitro culture* (pp, 1-22). In tech. <https://dx.doi.org/10.5772/50568>

Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus, *Advances in virus research*, 84, 439–504.

Jaramillo, H. (2017). Análisis del transcriptoma y viroma de *Passiflora edulis* f. *edulis* en cultivos de Antioquia utilizando métodos de secuenciación de nueva generación. Tesis de Maestría en Ciencias-Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Jaramillo, H., Marín, M. y Gutiérrez, P. A. (2018). Molecular characterization of *Soybean mosaic virus* (SMV) infecting Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Antioquia, Colombia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(11-12), 617-636.

Jaramillo H, Marín M, Gutiérrez P (2019): Complete genome sequence of a Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis* f.

edulis). Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 72, 8643-8654.
<https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n1.69438>

Jiménez, Y.; Carranza, C. y Rodríguez, M. (2009). Manejo integrado del cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra-Posada, F., Piedrahíta, W. y Flórez, L.E. (Ed). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. (pp. 159-187). Bogotá, Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Khurana, S. M. (2004). Potato viruses and their management. In Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II (pp. 389-440). Springer, Dordrecht.

Kushnarenko, S., Romadanova, N., Aralbayeva, M., Zholamanova, S., Alexandrova, A. y Karpova, O. (2017). Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro shoots. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 53(4), 425-432.

Lan, H., Lai, B., Zhao, P., Dong, X., Wei, W., Ye, Y. y Wu, Z. (2020). Cucumber mosaic virus infection modulated the phytochemical contents of *Passiflora edulis*. Microbial pathogenesis, 138, 103828.

MacDougal, J. M. y Feuillet, C. (2004). Systematics. *Passiflora*: passionflowers of the world, 27-31.

Ocampo, J. y Wyckhuys, K. (2012). Tecnología para el cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) en Colombia. Centro de Bio-sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, República de Colombia.
<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13557>

Petri, C. y Burgos, L. (2005). Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect?. Transgenic research, 14(1), 15-26.

Procolombia. (2021). Aumentan los pedidos de frutas colombianas en Europa. Recuperado 21 09 de noviembre de 2021 en <https://procolombia.co/noticias/aumentan-los-pedidos-de-frutas-colombianas-en-europa>

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Sepúlveda, M. 2020. Identificación molecular de virus que infectan gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en cultivos asintomáticos y material de siembra en Antioquia. Tesis Ingeniería Biológica. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 26 p.

Sepúlveda, M., Cardona, D., Gallo, Y., Higuera, M., Gutiérrez, P. y Marín, M. (2021). Virome analysis for identification of viruses associated with asymptomatic infection of purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*) in Colombia, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, In press. doi: 10.1080/14620316.2021.1973583

Wang, Q. C. y Valkonen, J. P. T. (2008). Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods*, 154(1-2), 135-145.

Waswa, M., Kakuhenzire, R. y Ochwo-Ssemakula, M. (2017). Effect of thermotherapy duration, virus type and cultivar interactions on elimination of potato viruses X and S in infected seed stocks. *African Journal of Plant Science*, 11(3), 61-70.

Xanthis, C.K., V.I. Maliogka, H. Lecoq, C. Dezbiez, I. Tsvetkov, N.I. Katis. (2015). First report of cucumber mosaic virus infecting watermelon in Greece and Bulgaria. *Journal of Plant Pathology* 97(2), 391-403.

Yockteng, R., d'Eeckenbrugge, G. C., Souza-Chies, T. T. (2011). *Passiflora*. Kole, C. (Ed). *Parientes de cultivos silvestres: recursos genómicos y de reproducción*. Berlín, Springer.

Zhang, Z., Wang, Q., Spetz, C. y Blystad, D. (2019). In vitro therapies for virus elimination of potato-valuable germplasm in Norway. 249, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.027>

E. Anexos: Capítulo 5

Anexo E-1: Muestras de *Passiflora edulis* f. *edulis* (PE) sometidas a los tratamientos de termoterapia (36°, 38°, 40°C y control) *ex vitro*, indicando el código de la muestra y los valores de Ct inicial (antes del tratamiento) y final (después del tratamiento) para los virus PFYMV y CMV.

Tratamiento	Muestra	PFYMV		CMV	
		Ct inicial	Ct final	Ct inicial	Ct final
Control	1	17,71	22,63	>35	>35
	13	17,03	26,89	14,17	>35
	59	20,29	25,4	19,27	>35
	61	19,52	14,58	20,91	>35
	62	19,37	18,85	21,43	>35
	66	19,45	>35	22,19	>35
	82	21,14	18,8	20,67	>35
	46	21	21,83	>35	>35
	55	19,42	22,88	21,54	>35
	68	19,64	20,15	23,10	>35
	81	22,47	27,33	28,19	>35
	91	20,42	19,52	22,84	>35
	103	20,62	>35	21,45	>35
36°C	19	17,69	25,49	>35	>35
	21	16,56	0	13,83	0
	29	18,48	>35	20,14	>35
	53	20,41	>35	20,11	>35
	83	20,36	>35	21,63	>35
	98	21,2	>35	20,47	>35
	99	19,09	>35	20,96	>35
	57	19,96	0	21	0
	60	21,21	0	21,31	0
	65	19,86	0	21,88	0
	74	24,29	0	26,31	0
	76	22,55	23,64	>35	>35
38°C	93	20,66	0	0	0
	2	16,71	21,15	>35	>35
	12	16,45	>35	13,69	>35
	30	19,12	24,89	19,88	>35

Anexo E-1: (continuación)

Tratamiento	Muestra	PFYMV		CMV	
		Ct inicial	Ct final	Ct inicial	Ct final
38°C	51	20,92	26,05	19,62	>35
	52	20,71	27,72	21,25	>35
	58	19,68	25,98	20,58	>35
	94	20,11	25,38	21,31	>35
	32	19,38	0	23,46	0
	64	20,68	22,43	20,49	>35
	67	21,04	22,67	22,68	>35
	79	23,47	21,69	26,60	>35
	89	19,36	24,81	22,74	>35
	97	22,45	22,77	>35	>35
40°C	4	16,89	0	12,77	0
	20	17,73	0	>35	0
	31	19,7	0	21,49	0
	54	18,85	0	20,36	0
	63	19,72	0	20,64	0
	95	21,88	0	18,47	0
	104	20,97	20,5	20,85	>35
	33	19,6	0	22,94	0
	49	21,6	21,34	>35	>35
	77	21	0	27,54	0
	96	21,96	22,36	20,52	>35
	101	21,43	0	22,29	0
102	19,77	19,15	21,42	>35	

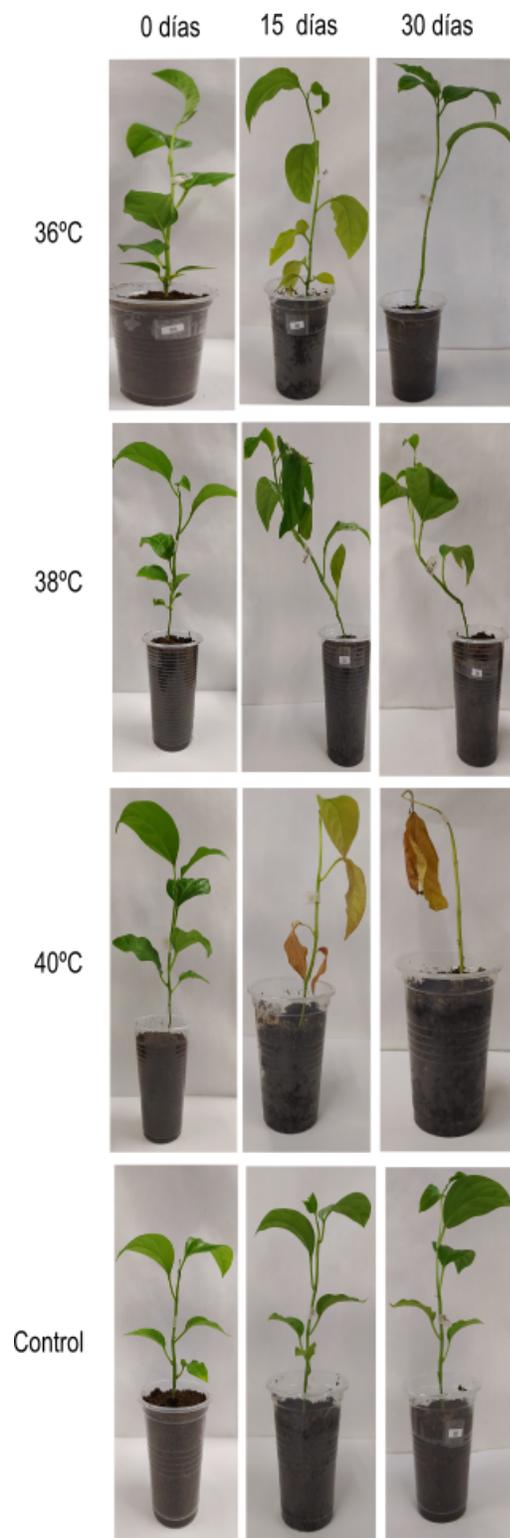
Anexo E-2: Muestras de *Passiflora edulis* f. *edulis* (PE) sometidas a los tratamientos de quimioterapia (150, 200, 250 ml/L y control) *ex vitro*, indicando el código de la muestra y los valores de Ct inicial (antes del tratamiento) y final (después del tratamiento) para los virus PFYMV y CMV.

Tratamiento	Muestra	PFYMV		CMV	
		Ct inicial	Ct final	Ct inicial	Ct final
Control	11	17,05	20,70	14,57	>35
	39	18,32	23,33	>35	>35
	43	19,86	22,32	>35	>35
	72	21,56	19,85	27,04	>35
	9	17,89	19,61	>35	>35
	18	17,98	19,61	13,75	>35
	38	20,78	19,84	>35	>35
	71	22,79	20,70	25,58	>35
	10	18,55	20,75	>35	>35
	17	18,00	22,60	14,31	>35
	34	20,24	22,57	>35	>35
	73	21,50	20,19	26,46	>35
150ppm	3	18,13	21,28	>35	>35
	28	18,61	21,09	15,59	>35
	36	19,58	22,22	>35	>35
	80	20,10	20,05	27,03	>35
	5	19,69	20,78	>35	>35
	14	18,63	20,96	>35	>35
	27	17,37	20,38	16,97	>35
	69	22,54	20,54	24,70	>35
	22	18,42	20,35	>35	>35
	23	20,23	24,25	>35	>35
	40	22,37	22,12	24,80	>35
200ppm	70	24,80	0	22,37	0
	24	20,93	22,14	15,01	>35
	42	19,86	21,58	>35	>35
	47	18,51	22,96	>35	>35
	86	19,92	22,66	25,35	>35
	35	17,87	24,75	>35	>35
	37	19,81	22,24	>35	>35
	84	20,96	22,13	24,33	>35
	88	18,82	23,14	18,82	>35

Anexo E-2: (continuación)

Tratamiento	Muestra	PFYMV		CMV	
		Ct inicial	Ct final	Ct inicial	Ct final
200ppm	6	17,83	22,08	>35	>35
	41	20,20	23,50	>35	>35
	87	19,56	21,90	18,54	>35
	92	21,52	21,83	23,30	>35
	15	18,00	>35	>35	>35
	25	19,84	20,55	15,31	>35
	78	20,39	22,90	>35	>35
	85	21,76	22,21	25,07	>35
250ppm	16	18,62	23,50	>35	>35
	26	19,66	21,57	18,48	>35
	48	20,51	24,70	>35	>35
	75	19,94	>35	26,04	>35
	7	18,39	26,20	>35	>35
	50	19,60	22,38	>35	>35
	90	18,31	>35	17,91	>35
	100	25,99	>35	19,43	>35

Anexo E-3: Plántulas de gulupa en tratamiento de termoterapia a 36, 38 y 40°C, indicando el efecto térmico a los 0, 15 y 30 días del tratamiento respecto a plantas control.



Anexo E-4: Plántulas de gulupa en tratamiento de quimioterapia a 150, 200 y 250 mg/L de ribavirina, con diferentes tiempos de inmersión radicular (1,2 y 3 h) indicando el efecto químico a los 0, 15 y 30 días del tratamiento respecto a plantas control.



Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En el oriente de Antioquia los virus más prevalentes en cultivos de gulupa fueron PFYMV y SMV, con su detección en el 40% y 27% de las plantas en producción evaluadas (sintomáticas y asintomáticas). En brotes de semillas y plántulas, se lograron detectar usando RT-qPCR, tres de los cuatro virus de RNA: PFYMV, SMV y CMV, con una prevalencia de 73,3%; 63,3% y 6,66%, respectivamente; además de un virus de DNA (GBVA) detectado por PCR de RCA en el 73,3% del material de siembra. Utilizando secuenciación masiva fue posible obtener las secuencias completas de PFYMV, SMV y GBVA con altos niveles de identidad (>98%) respecto a secuencias de aislamientos colombianos previamente disponibles en GenBank.

En el suroeste de Antioquia, predominaron los virus PFYMV (95%) y GBVA (92,5%) en las muestras evaluadas, además se detectaron con bajos niveles de prevalencia (15%) el SMV y CMV. A partir de técnicas de secuenciación masiva fue posible detectar la ocurrencia de un nuevo virus miembro de la familia *Tymoviridae*, nombrado tentativamente como purple passion fruit leaf deformation virus (PpLDV). El diseño de primers específicos en esta investigación permitió la confirmación de este virus por RT-qPCR y RT-PCR convencional, indicando que no solo está restringido a la región del suroeste, sino también a otras zonas como el oriente del departamento de Antioquia.

Los resultados de esta investigación indican que posiblemente las semillas de gulupa son una de las principales fuentes de dispersión viral en este cultivo, pues se encontró que virus como PFYMV, SMV, CMV y GBVA se presentaron en este material con niveles de prevalencia de 92%, 28%, 8% y 72%, respectivamente. Igualmente, las plántulas comercializadas en el departamento (provenientes de semilla sexual) presentaron altos niveles de prevalencia (72%, 60%, 16% y 72%) para estos mismos virus.

Hasta el momento se encuentra un viroma relativamente reducido en gulupa en comparación con otros frutales andinos como uchuva y tomate de árbol, pero llama la atención la uniformidad en los virus encontrados en las dos principales subregiones productoras de Antioquia, lo que indica movimiento continuo de material de siembra entre éstas, sin garantizar sus condiciones fitosanitarias. Así mismo, se destaca el hecho que el potyvirus CABMV no se detectó en ninguna muestra de gulupa del departamento, así como tampoco la infección por begomovirus, dos de los agentes causales más limitantes para la producción de pasifloras en Brasil y otros países productores en África y Asia.

Las evaluaciones realizadas en seis medios de cultivo diferentes para el establecimiento *in vitro* de gulupa sugieren que la composición del medio de cultivo y las concentraciones utilizadas de los reguladores de crecimiento son factores fundamentales en el desarrollo y crecimiento del explante y su respuesta morfológica. El medio 6 que tiene como base: sales minerales MS, vitaminas Gamborg, 20 g/L de sacarosa, 200 mg/L de caseína hidrolizada, 5 g/L de carbón activado, 0,5 mg/L de GA3 y 4,5 g/L de gelrite, se seleccionó como el más adecuado para la propagación *in vitro* de este frutal, permitiendo la formación de 1,5 yemas y 2,5 hojas por explante en un tiempo aproximado de 50 días. La presencia de carbón activado en el medio de cultivo redujo significativamente la pérdida de material vegetal por necrosis causada por la oxidación; no obstante, este medio no permitió el desarrollo radicular en cortos periodos de tiempo, por lo cual se estableció una metodología de enraizamiento *ex vitro* en turba estéril como alternativa viable para regenerar plántulas con genotipos deseados de gulupa.

Las evaluaciones preliminares de limpieza viral utilizando técnicas como termoterapia y quimioterapia en plántulas de gulupa, indicaron que estos métodos son promisorios para la eliminación de PFYMV, con un porcentaje de eliminación del 71,4%, utilizando temperaturas de 36°C durante 3 semanas; adicionalmente esta temperatura también favoreció la disminución de carga viral en un 22,1%. El tratamiento de quimioterapia permitió eliminar este virus en el 66,7% de las muestras evaluadas al someter las plántulas a 250 mg/L de ribavirina durante 3 horas de inmersión radicular.

Recomendaciones

Debido a la alta prevalencia de virus en el material de siembra de gulupa es primordial que el establecimiento de cultivos para este frutal se realice a partir de semilla certificada por su sanidad viral, con el fin de reducir el riesgo de transmisión vertical de estos fitopatógenos. Algunas técnicas de limpieza viral como termoterapia, quimioterapia, crioterapia y cultivo de meristemos surgen como alternativas para la obtención de material vegetal certificado, sin embargo; es necesario continuar con la evaluación de estos tratamientos en estudios posteriores para *P. edulis* f. *edulis*.

La implementación de técnicas moleculares como RT-qPCR, RT-PCR convencional, secuenciación Sanger y secuenciación de alto rendimiento, son herramientas fundamentales para el apoyo de programas de certificación de semilla y de vigilancia cuarentenaria de virus. La RT-qPCR es una técnica altamente sensible y específica, que permite detectar de manera asintomática la infección viral en plantas o material de siembra de cualquier edad fisiológica (desde embriones de semilla hasta plantas en producción). Por otra parte; la secuenciación de alto rendimiento (HTS) complementa la detección por PCR, al identificar la posible presencia de nuevos patógenos y variantes virales que circulan en una región determinada. Es por esto, que el uso de HTS representa una metodología molecular con gran utilidad para la identificación temprana de virus emergentes y reemergentes en la agricultura.

Se recomienda incluir en futuros estudios fitopatológicos en especies de pasifloras en Colombia los virus GBVA y PpLDV, utilizando los primers específicos diseñados y validados en esta investigación. En ocasiones, la ausencia de primers dirigidos a regiones específicas limitan una correcta y temprana detección del agente causal, es posible que esta sea una de las razones por la cual algunos virus que circulan en otras regiones del país no puedan ser detectados con facilidad. Adicionalmente, es importante profundizar sobre la biología de estos dos virus, con el fin de identificar los síntomas específicos que causan en plantas de gulupa, sus métodos de transmisión, posibles hospedantes alternos, niveles de variación intraespecífica y su importancia económica.

Es importante realizar estudios posteriores en plantas infectadas por CMV que permitan el diseño de primers específicos para su detección por PCR convencional, acompañado de estudios biológicos que incluyan los síntomas que inducen, los mecanismos de transmisión, las estrategias de expresión genética y las rutas de defensa de la planta ante la infección viral; lo anterior para determinar con certeza sí la presencia de esta especie viral en gulupa causa infecciones severas o sí por el contrario, la respuesta de la planta al virus es suficiente para contener el progreso de la infección, tal como se ha reportado en otros cultivos de pasifloras.

Debido a que la respuesta presentada en plántulas de *P. edulis* f. *edulis* en condiciones de cultivo *in vitro* difieren significativamente respecto a otras pasifloras, es fundamental evaluar medios y condiciones de cultivo alternativas para esta especie, tal como se realizó en esta investigación. No obstante, con la información obtenida hasta ahora, la propagación de material de gulupa *in vitro* para generar material vegetal sano y con características fenotípicas deseadas es viable y se recomienda su endurecimiento bajo condiciones *ex vitro*, seguido por el uso de técnicas de eliminación viral como termoterapia y quimioterapia. Estudios posteriores podrían incluir la evaluación en otros rangos de temperaturas a los aquí reportados, inferiores a 40°C. Para el tratamiento de quimioterapia se sugieren probar concentraciones de ribavirina intermedias entre 200 mg/L y 250 mg/L o mayores tiempos de inmersión radicular, cuando se usan bajas concentraciones de ribavirina (150 mg/L).

Los efectos de las enfermedades virales en la agricultura dependen de una compleja interacción entre los agentes causales, los hospedantes, las condiciones ambientales y las prácticas de manejo implementadas en campo. Para el caso de los cultivos de gulupa en Antioquia, se encontró que los niveles de prevalencia de virus como PFYMV y GBVA son altos, por lo cual una detección temprana de focos de infección, apoyada en observación visual de síntomas y técnicas moleculares, es clave para impedir situaciones epidémicas en este frutal. Finalmente, continuar con el desarrollo de investigaciones en este campo fitopatológico, permitirá además de aumentar el conocimiento sobre los agentes causales y su epidemiología, ajustar con criterios técnicos los programas de

manejo integrado de enfermedades en diferentes cultivos de importancia económica para el país.

Es necesario darle continuidad a proyectos de investigación en esta especie vegetal, donde se utilice como base la información obtenida con este trabajo, con el fin de avanzar en alternativas que mitiguen los impactos generados por enfermedades virales en el cultivo de gulupa.

Se recomienda que investigaciones posteriores profundicen sobre la caracterización biológica de los virus acá mencionados, especialmente para el nuevo virus reportado (PpLDV); donde se incluyan estudios de transmisión, estimaciones sobre las limitaciones de estos virus para este sistema productivo y sus pérdidas asociadas, además de establecer los síntomas que cada uno de ellos causan individualmente y en coinfecciones, dicha información permitirá evaluar y validar las estrategias de manejo más adecuadas de acuerdo con los problemas virales que afectan este cultivo.