

DETECCIÓN MOLECULAR DE SEIS VIRUS DE ARN EN BROTES DE TUBÉRCULOS DE PAPA CRIOLLA (*Solanum phureja*) EN ANTIOQUIA, COLOMBIA

Andrea Sierra Mejía¹, Yuliana Gallo García^{1,2}, Meike Estrada Arteaga¹,
Pablo Andrés Gutiérrez² y Mauricio Marín Montoya³

RESUMEN

El cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*) es una de las alternativas productivas más prometedoras para las regiones alto-andinas de suramérica gracias a su alta demanda interna y potencial de exportación. En Antioquia, Colombia, el cultivo se ve afectado por un complejo de virus que reducen su rendimiento y afectan la calidad de los tubérculos-semilla. En este trabajo se evaluó la incidencia de seis virus de ARN (PLRV, PVS, PVV, PVX, PVY y PYVV) en brotes de tubérculos utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo-real (RT-qPCR). Se encontraron muy altos niveles de infección de los virus: PVS y PYVV fueron detectados en el 100 % de las muestras, PLRV y PVY en el 46,66 %, y PVX y PVV en el 40 %. La circulación de los seis virus en el oriente de Antioquia se confirmó mediante secuenciación de nueva generación (NGS), obteniéndose los genomas completos para todos los virus con excepción del PYVV, del que sólo fue posible el ensamblaje parcial de sus tres segmentos genómicos. El análisis de NGS registró la presencia del bell pepper alphaendornavirus (BPEV), lo que representa el primer registro de este virus en papa en Colombia. Los análisis filogenéticos realizados con secuencias NGS y amplicones de la cápside ubicaron a los seis virus en clados que en su mayoría estuvieron conformados por aislamientos colombianos, con niveles de identidad superiores al 95 %. Estos resultados indican la alta necesidad de establecer un programa de certificación de tubérculos-semilla de papa criolla en Colombia. **Palabras clave adicionales:** *Carlavirus*, *crinivirus*, *potexvirus*, *potyvirus*, RT-PCR en tiempo-real, secuenciación de nueva generación

ABSTRACT

Molecular detection of six RNA viruses in tuber sprouts of potato (*Solanum phureja*) in Antioquia, Colombia

Due to its high internal demand and export potential, potato (*Solanum phureja*) has become one of the most promising crops for the high Andean region of South America. In Antioquia, Colombia, the *S. phureja* crop is affected by a complex of viruses that have a very significant effect on yield and tuber-seed quality. In this work, we have investigated the incidence of six RNA viruses (PLRV, PVS, PVV, PVX, PVY and PYVV) in sprouts from the tuber-seeds used by farmers to start their new crop cycles. Detection of these viruses by real-time RT-PCR (RT-qPCR) revealed 100 % incidence of PVS and PYVV and intermediate levels for PLRV (46.66 %), PVY (46.66 %), PVX (40.0 %) and PVV (40.0 %). The circulation of these viruses in eastern Antioquia was confirmed by Next-generation sequencing (NGS) of bulked leaf samples. Complete genome sequences were obtained for all viruses under study with the exception of PYVV, of which only partial segments could be obtained. In addition, NGS also revealed the presence of bell pepper alphaendornavirus (BPEV), which is the first report for this virus infecting potato in Colombia. Phylogenetic analyses on sequences derived from NGS and RT-qPCR demonstrated that PLRV, PVS, PVV, PVX, PVY and PYVV are all related to Colombian isolates sharing nucleotide sequence identities above 95 %. These results reveal an urgent need to establish a tuber-seed certification program for *S. phureja* in Colombia.

Additional keywords: *Carlavirus*, *crinivirus*, *polerovirus*, *potexvirus*, *potyvirus*, real-time RT-PCR, next generation sequencing

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. y

Solanum phureja Juz. & Bukasov) ocupa el quinto lugar en producción mundial de bienes agrícolas con un rendimiento estimado para el año 2016 de

Recibido: Noviembre 16, 2018

Aceptado: Agosto 19, 2019

¹ Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Colombia. e-mail: asierram@unal.edu.co; mmestradaa@unal.edu.co

² Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia. e-mail: ygallo@ces.edu.co; paguties@unal.edu.co

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

19,5 Mg·ha⁻¹ (Faostat, 2018). Colombia, a pesar de presentar un área de siembra (149.426 ha) similar al de Holanda y Reino Unido, tan sólo reportó rendimiento promedio de 16,08 Mg·ha⁻¹ (Agronet, 2018), es decir cerca del 40 % con respecto a dichos países y tan sólo de la tercera parte sí se compara con el rendimiento promedio alcanzado en Estados Unidos (49,02 Mg·ha⁻¹). Aunque las causas que explican dichas diferencias son diversas e incluyen no sólo aspectos agronómicos, sino también variables socio-económicas y agroambientales, no hay duda que un factor determinante corresponde al uso de tubérculo-semilla certificada, que en dichos países es la norma generalizada, mientras que en Colombia tan sólo representa el 2-10 % del material de siembra empleado (Frost et al., 2013; Thomas et al., 2016).

Las estimaciones realizadas sobre el efecto en el rendimiento de los cultivos de papa cuando se utiliza semilla certificada, varían entre países e incluso provincias y municipios, pero en general indican que su empleo puede representar un incremento del rendimiento cercano al 30 %, e incluso existen reportes que señalan que el uso continuado de semilla de alta calidad puede significar aumentos del 70 al 100 % (Thomas et al., 2016). Aunque las bacterias, nematodos, hongos e insectos pueden ser agentes causales del deterioro de la semilla vegetativa (Thomas et al., 2016), se considera que los virus son la principal causa de degeneración de los tubérculos-semilla de papa. En el mundo se han encontrado unas 53 especies de virus en este cultivo, siendo los más limitantes el potato virus Y (PVY), potato leafroll virus (PLRV), potato virus A (PVA), potato virus S (PVS) y potato virus X (PVX) (Salazar, 2006; Thomas et al., 2016).

De la superficie total cultivada con papa en Colombia, cerca del 10 % corresponde a papa criolla (*Solanum phureja*), una especie diploide ($2n=2x=24$) que se caracteriza por su ciclo corto de cultivo (4 meses) en las regiones andinas de suramérica ubicadas entre 2300 y 2800 msnm, un muy corto período de dormancia de sus tubérculos y por sus excelentes características organolépticas y nutricionales (Seminario et al., 2018).

Entre las principales limitantes del cultivo de la papa criolla en Colombia se encuentran las enfermedades virales, siendo hasta ahora identificados como los virus más incidentes el

PVY (Sánchez et al., 1991; Villamil et al., 2014); PVS (Sánchez et al., 1991; Franco et al., 2009), PVV (Gutiérrez et al., 2014; Alvarez et al., 2016; Gutiérrez et al., 2016) PLRV (Sánchez et al., 1991; Gil et al., 2011a), PVX (Sánchez et al., 1991; Gil et al., 2012), Potato mop-top virus (PMTV) (Gil et al., 2011b; García et al., 2013); y el potato yellow vein virus (PYVV) (Guzmán et al., 2012; 2013; Gil et al., 2013). Para este último virus, se ha estimado el efecto de su infección sobre los rendimientos del cultivo de papa criolla en un rango del 33 al 48 % (Guzmán et al., 2012); y aunque desafortunadamente estos efectos no se han establecido aún para los demás virus, reportes en *S. tuberosum* indican pérdidas de hasta 80 % por causa de PVY, de hasta 90 % por PLRV y de hasta 50 % por la infección mixta de PVX y potyvirus (tales como PVY o PVA) (Salazar, 2006; Frost et al., 2013).

En los últimos años se ha realizado una serie de estudios en Colombia tendientes a evaluar la incidencia individual de algunos de estos virus en tubérculos-semilla de papa criolla utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo-real (RT-qPCR); en dichos reportes se registran niveles de infección de 66,6; 91,6; 60 y 93,7 % para PVY (Medina et al., 2015), PLRV (Mesa et al., 2016), PVS (Vallejo et al., 2016) y PVX (García et al., 2016), lo que representa una situación alarmante para el gremio productor de papa en Colombia; más aún cuando a diferencia de lo que ocurre con algunas variedades de *S. tuberosum*, en este país no existe un programa bien establecido y continuo de certificación de semilla de papa criolla.

Para darle continuidad a los estudios de detección de virus en tubérculos-semilla de papa criolla en Colombia, se planteó el presente estudio tendiente a evaluar mediante pruebas de RT-qPCR los niveles de incidencia de seis virus de ARN sobre muestras de tubérculos-semilla de papa comercializados en el departamento de Antioquia. Adicionalmente, se evaluó la circulación de dichos virus directamente en cultivos del oriente de Antioquia, utilizando las metodologías de secuenciación de nueva generación (NGS) y de RT-PCR convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 10 muestras de tubérculos-semilla de papa criolla en estado de brotación

procedentes de material de siembra obtenido directamente de los agricultores en sus fincas o en mercados locales. Cada muestra consistió de tres tubérculos obtenidos al azar del lote de semillas respectivo y para la extracción de ácidos nucleicos se utilizaron los dos centímetros superiores de los brotes hasta completar 100 mg de tejido. Por otra parte, en cuatro lotes de cultivo de papa criolla ubicados en los municipios de La Unión (2 lotes) y Marinilla (2 lotes) del Oriente de Antioquia, se tomó una muestra compuesta (10x) de tejido foliar con síntomas de enfermedades virales (por ejemplo: mosaicos, amarillamiento de venas, enrollamiento foliar) para su utilización en la evaluación de los virus que circulan en esta subregión mediante análisis de NGS y RT-PCR/ secuenciación Sanger.

Detección de virus por RT-qPCR. En cada una

de las muestras de brotes de tubérculos se procedió a la extracción del ARN total utilizando el método del Trizol (Chomczynski y Sacchi, 1987). La concentración y pureza del ARN fue determinada por lecturas a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se realizó la síntesis del ADN copia (ADNc) con tres repeticiones por muestra, en reacciones de 20 µL a 65 °C por 5 min seguido de 42 °C por 1 h, utilizando 200 U de la enzima reverso-transcriptasa RevertAid (Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de inhibidor de ARNasa RiboLock, 50-100 ng de ARN total y 100 pmol de cada cebador reverso, que para PVY, PVV, PVS y PVX correspondió al Oligo-(dT)18; mientras que para PYVV al PYVV_R_CP y para PLRV al cebador PLRV-R (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la detección molecular de virus de ARN en tubérculos-semilla de papa criolla en Antioquia, Colombia

Cebador	Secuencia	Referencia
PYVV_R_CP	AGT TGC TGC ATT CTT GAA CAG G	Álvarez et al., 2017
PYVV_F_CP	TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG	Álvarez et al., 2017
qPYVV_R_CP	AGG TCT CAG GAT CTG GAT CAA CT	Álvarez et al., 2017
PLRV-R	GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT	Singh et al., 1995
PLRV-F	CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC 3	Singh et al., 1995
PLRV-Sense	GCT CAA GCG AGA CAT TCG TG	Yang et al., 2014
PLRV-Antisense	TTG AAT GCC GGA CAG TCT GA	Yang et al., 2014
PVY-F	ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC	Nie y Singh, 2001
PVY-R	TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT	Nie y Singh, 2001
PVY-1_FP	CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA C	Singh et al., 2013
PVY-1_RP	ATA TAC GCT TCT GCA ACA TCT GAG A	Singh et al., 2013
PVS_gen_F	ATG CCG CCY AAA CCA GAT CC	Vallejo et al., 2016
PVS_gen_R	ACC TTC ART ATG ACK CCA AGC AAC ATG C	Vallejo et al., 2016
qPVS_gen_R	AGC ATK GCT TCY TCA TTT TGC CCT G	Vallejo et al., 2016
PVV_phu_F	ATG CTG GAA AAG ATC CAG C	Álvarez et al., 2016
PVV_phu_R	TGA AAG TGG GCT TTG CG	Álvarez et al., 2016
qPVV_phu_R	CAT CCC GCT CCT CAA C	Álvarez et al., 2016
PVXF	TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG	Nie y Singh, 2001
PVXR	GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC	Nie y Singh, 2001
PVX_101-2_FP	AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC	Agindotan et al., 2007
PVX_101-2_RP	GCT TCA GAC GGT GGC CG	Agindotan et al., 2007

Para la amplificación mediante PCR en tiempo real (qPCR) se empleó el kit Maxima SYBR Green/ROX (Thermo Fisher Scientific) con 50-100 ng de ADNc y 0,3 µM de los cebadores específicos PVY-1_FP y PVY-1_RP, PYVV_F_CP y qPYVV_R_CP, PVS_gen_F y qPVS_gen_R, PLRV-Sense y PLRV-Antisense, PVV_phu_F y qPVV_phu_R, PVX_101-2_FP y PVX_101-2_RP (Cuadro 1).

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 50 °C por 45 s, en un equipo Rotor-Gene Q-5plex (Qiagen); obteniéndose al final de las reacciones 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 y un control negativo, procedentes de tejidos foliares infectados (+) o

libres (-) de cada virus evaluado.

Secuenciación de nueva generación (NGS). A partir del tejido foliar de los cuatro lotes de cultivo se realizó una mezcla de submuestras para proceder a la extracción del ARN de doble cadena (ARNdc) que representa una fracción enriquecida con genomas e intermediarios replicativos de virus de ARN, siguiendo el procedimiento de Valverde et al. (1990); pero en este caso utilizando columnas de celulosa de fibra media (C6288 Medium) (Merck KGaA).

La presencia de bandas de ARNdc se visualizó en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con GelRed (Biotium) y una vez confirmada su presencia, se procedió a la desnaturalización de 20 µL a 98 °C por 5 min. La concentración e integridad del ARN se evaluó en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) mediante el método del RIN (*RNA Integrity Number*); la librería de ADNc se obtuvo con el kit TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep con eliminación del ARN ribosomal (ARNr) con el kit Ribo-Zero (Illumina) y finalmente se procedió a la secuenciación en un equipo Illumina NovaSeq de la compañía Macrogen.

Una vez obtenidas las secuencias, se removieron las bases con baja calidad (Phred <30) con el programa SeqTK (<https://github.com/lh3/seqtk>) y se procedió a la búsqueda de las lecturas de secuencias o *reads* de posible origen viral por comparación con la base de datos de referencia de virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/>) del NCBI utilizando Blastn local. Posteriormente, para cada uno de los virus detectados, se obtuvieron del GenBank genomas completos de referencia y se procedió a su ensamblaje por mapeo utilizando el programa Magic-Blast (<https://ncbi.github.io/magicblast/>). Los alineamientos generados fueron visualizados con el programa IGV (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>), obteniéndose las secuencias consenso para cada genoma viral. Luego se identificaron los marcos abiertos de lectura (ORF) mediante BlastX y ORF finder (Gish y States, 1993), ubicándose la secuencia correspondiente a la región que codifica para la cápside proteica (CP), para su utilización en análisis filogenéticos por el método de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución LG+G+I. Los alineamientos fueron realizados con el programa Muscle y los árboles filogenéticos con el software Mega6 con 1000 réplicas de

bootstrap (Tamura et al., 2013).

RT-PCR / Secuenciación Sanger. Además de la secuenciación NGS se evaluó la circulación en la zona de cultivo de papa criolla del Oriente de Antioquia, de los seis virus detectados en tubérculos mediante RT-PCR/secuenciación Sanger. Para esto se procedió a la desnaturalización a 98 °C por 5 min de 20 µL del ARNdc extraído de las plantas de cada lote, para proceder a realizar la síntesis de ADNc para cada virus, tal como se indicó anteriormente. En las reacciones de PCR convencional se utilizaron los cebadores específicos dirigidos a la región de CP: PVY-F y PVY-R, PYVV_F_CP y PYVV_R_CP, PVS_gen_F y PVS_gen_R, PLRV-F y PLRV-R, PVV_phu_F y PVV_phu_R, PVXF y PVXR (Cuadro 1), siguiendo las condiciones descritas por Riascos et al. (2018).

Los amplicones del tamaño esperado fueron purificados directamente del gel usando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) para ser secuenciados por el método de Sanger en un equipo Applied Biosystems 3730XL en la compañía Macrogen. Las secuencias obtenidas fueron incluidas en los análisis filogenéticos para la región CP, según se indicó anteriormente.

RESULTADOS

Detección de virus por RT-qPCR. Utilizando pruebas de RT-qPCR se detectó la presencia de los virus PLRV, PVS, PVV, PVX, PVY y PYVV en al menos una de las tres repeticiones de ADNc de las 10 muestras de tubérculos-semilla de papa criolla evaluadas. PVS y PYVV fueron detectados en la totalidad de las muestras, mientras que el PLRV y PVY se encontraron en el 46,66 % de los brotes de tubérculos y los virus PVX y PVV en el 40 % de las muestras (Figura 1).

Los valores de Ct encontrados en las pruebas de RT-qPCR presentaron grandes variaciones entre los seis virus, lo que refleja diferentes niveles de título viral en los materiales evaluados (Cuadro 2) siendo el PVS el que se detectó en los menores valores de Ct (desde 10,6), pero fue igualmente el que presentó mayores niveles de variación, mientras que para PLRV el menor ciclo de detección fue de 27,2. Los valores promedio de Ct para las muestras positivas encontradas para los demás virus (PVV, PVX,

PYVV y PVY) se presentaron en el rango de 26,10 a 29,13 (Cuadro 2).

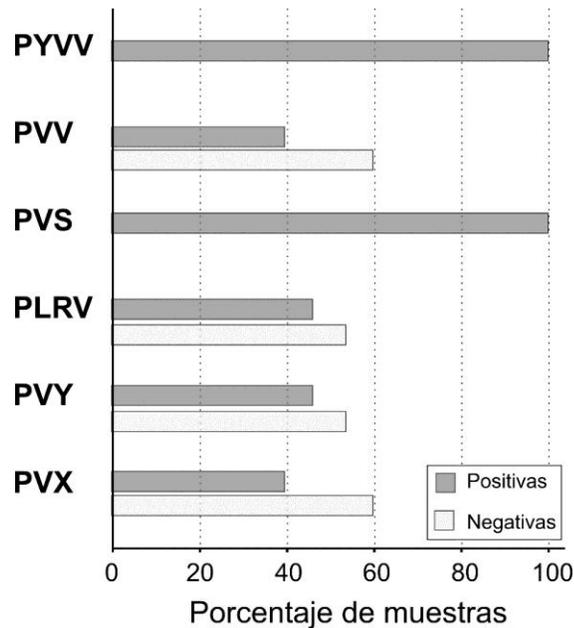


Figura 1. Detección mediante pruebas de RT-qPCR de seis virus de ARN en tubérculos-semilla de papa criolla en Antioquia, Colombia

Cuadro 2. Valores de ciclo umbral (Ct) y de temperaturas de fusión (Tm) en pruebas de RT-qPCR para seis virus de ARN detectados en tubérculos-semilla de papa criolla en Antioquia, Colombia

Virus	Ciclo umbral (Ct) promedio	Rango de temperaturas de fusión (Tm)	Referencias de temperaturas de fusión (Tm)
PVS	21,00 (SD = 7,28)	86,51 ± 1 °C	86,96 ± 1,0 °C (Vallejo et al., 2016)
PLRV	31,48 (SD = 2,32)	82,19 ± 1 °C	81,80 ± 0,3 °C (Mesa et al., 2016)
PVV	26,10 (SD = 3,42)	80,02 ± 0,5 °C	79,50 ± 0,75 °C (Álvarez et al., 2016)
PVX	26,79 (SD = 3,41)	84,64 ± 1 °C	83,70 ± 1,0 °C (García et al., 2016)
PYVV	26,98 (SD = 1,94)	77,50 ± 1,5 °C	77,28 ± 0,6 °C (Álvarez et al., 2017)
PVY	29,13 (SD = 1,95)	77,67 ± 0,5 °C	ND

La validez de las pruebas de RT-qPCR fue confirmada por análisis de las curvas de desnaturalización utilizando la herramienta HRM (*High Resolution Melting*). De esta forma, los valores de Tm de cinco de los virus detectados (PYVV, PVV, PLRV, PVS y PVX) se presentaron cercanos a los rangos de variación previamente reportados en plantas solanáceas en Colombia (Cuadro 2). Para el caso de PVY, el valor promedio de Tm fue de 77,67 ± 0,5 °C. Ya que no existen reportes previos de dichos valores, en este trabajo se confirmó la naturaleza viral de tres de estos amplicones obtenidos mediante RT-qPCR, al presentar 97-100 % de identidad (valor e = 4e-15) con secuencias de este virus previamente

depositadas en GenBank (por ejemplo: MF176828, KY711363, MG460470). Todos los controles positivos empleados en el estudio, resultaron en amplificaciones efectivas con valores de Ct inferiores a 25 y de Tm en los rangos antes indicados, mientras que en los controles negativos no se detectó amplificación para ninguno de los virus.

Secuenciación de nueva generación (NGS). A partir de la secuenciación NGS de la mezcla de muestras foliares de papa criolla, se obtuvieron 9.592.732 *reads* pareados y un total de 1.937.731.864 nt. Los análisis bioinformáticos identificaron que 7.670.150 (80 %) de los *reads* correspondieron a ARN derivados de genomas

vegetales, y del 20 % restante, 84.870 *reads* equivalentes al 0,85 % del total secuenciado (16.462.392 nt), fueron identificados como secuencias de origen viral. La comparación mediante Blastn de estos *reads* virales con respecto a la base de datos del NCBI, permitió identificar la asociación de 41.907 *reads* con

genomas del género *Carlavirus*, 33.710 con *Potyvirus* y 5.150 con *Potexvirus*, mientras que en menores proporciones se detectó la presencia en el transcriptoma bajo análisis de miembros de los géneros *Alphaendornavirus* (395 *reads*), *Polerovirus* (147 *reads*) y *Crinivirus* (61 *reads*) (Figura 2).

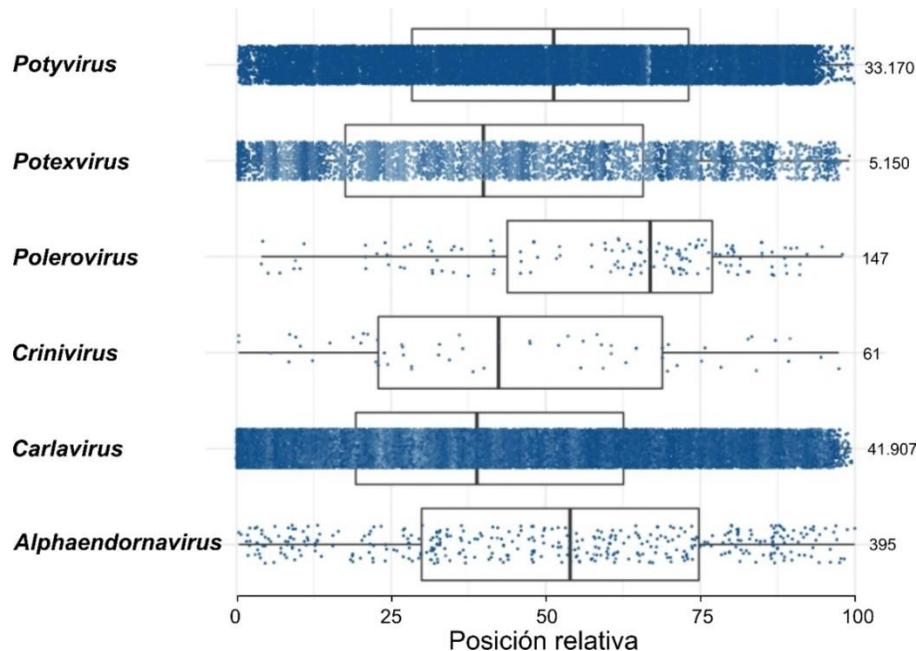


Figura 2. Identificación de virus de ARN mediante NGS en un transcriptoma procedente de tejido foliar de plantas de papa criolla con síntomas de infecciones virales en Antioquia, Colombia. Los puntos representan los *reads*; su densidad indica la profundidad de la secuenciación a lo largo del genoma viral y la intensidad de su color indica el porcentaje de identidad de cada *read* con respecto a las secuencias de los virus identificados

Una vez realizados los ensamblajes, se identificaron los genomas completos de cinco de los seis virus de ARN detectados: PVY (9.663 nt), PVS (8.497 nt), PLRV (5.850 nt), PVV (9.823 nt), PVX (6.423 nt), así como las secuencias parciales de los tres segmentos del genoma de PYVV (ARN1: 7.542 nt, ARN2: 5.289 nt y ARN3: 3.546 nt). Adicionalmente, el análisis de NGS permitió obtener el genoma completo de 14.673 nt del Bell pepper alphaendornavirus (BPEV). El genoma de este virus compartió un 99 % de identidad con cepas de BPEV (NC_039216, KX977569) obtenidas en pimentón (*Capsicum annum*) en Antioquia y depositadas en GenBank por Muñoz et al. (2017). Las secuencias de los siete genomas virales detectados en el presente estudio fueron depositadas en GenBank con los números de

accesión MK116548 - MK116556.

Al realizar las comparaciones de estos genomas completos con aquellos depositados en las bases de datos moleculares, se encontraron muy altos niveles de identidad con respecto a diferentes aislamientos colombianos de estos virus; para el caso de PVY se encontraron niveles de identidad del 99 % (valor $e = 0,0$; Cobertura: 99 %) con aislamientos de la raza PVY^{NTN} (MF176827, KR149260), previamente depositados en Genbank por Riascos et al. (2018) y Muñoz et al. (2016) a partir de plantas de *S. tuberosum* infectadas con este virus. En forma similar, las secuencias de PVV tuvieron 99 % de identidad (valor $e = 0,0$; Cobertura: 99 %) con cepas de este virus obtenidas en *S. phureja* en Antioquia (KP849483 y KT985458) reportadas

por Álvarez et al. (2016); así como también sucedió para el caso de PVS con cepas de esta región (KR152654, JX419379), pero con un nivel de identidad del 97 % (valor $e = 0,0$; Cobertura: 100 %) (Vallejo et al., 2016).

Para el caso del PLRV, la secuencia del genoma compartió el 98 % de identidad con cepas provenientes de papa en Egipto (AY138970) y Polonia (X74789), y finalmente el genoma de PVX fue el más divergente con respecto a las secuencias reportadas en GenBank, al presentar

93 % de identidad con respecto a dos cepas de Perú obtenidas en papa (KJ534603 y KJ534601) (Kutnjak et al., 2014).

Confirmación de virus por RT-PCR/Sanger. A partir de los extractos de ARNdc se obtuvieron amplicones de la región CP para PVY (480 pb), PLRV (330 pb), PVS (421 pb) y PVV (459 pb) en los cuatro lotes de cultivo de papa criolla evaluados, mientras que PYVV (495 pb) y PVX (562 pb) sólo se detectaron en las plantas de los dos lotes del municipio de Marinilla (Cuadro 3).

Cuadro 3. Detección de seis virus de ARN en tejidos foliares de plantas de papa criolla de Antioquia, Colombia, mediante RT-PCR convencional de extractos de ARNdc

Muestra	Procedencia (municipio, vereda)	PVY	PYVV	PLRV	PVS	PVX	PVV
MPH1	Marinilla, Santa Cruz	+	+	+	+	+	+
MPH2	Marinilla, El Rosario	+	+	+	+	+	+
MPH5	La Unión, San Juan	+	-	+	+	-	+
MPH6	La Unión, Piedra Blanca	+	-	+	+	-	+

+/-: corresponde a muestras en las que se obtuvo (+) o no (-) el amplicon del tamaño esperado en las reacciones de RT-PCR convencional

Los análisis filogenéticos realizados con dichas secuencias y con aquellas derivadas del ensamblaje de las secuencias NGS para la región CP confirmaron la ubicación de los aislamientos de PVY en el clado que representa la raza PVY^{NTN} con niveles de identidad superiores al 99 % con respecto a cepas de este virus obtenidas en papa en diferentes continentes, incluyendo aislamientos del Norte y Oriente de Antioquia, Colombia (Figura 3).

El análisis para la especie PVV ubicó las secuencias obtenidas en el clado PVV^{Phu}, conformado principalmente por aislamientos procedentes de *S. phureja* y *Physalis peruviana* en Colombia y que claramente los separa del grupo procedente de *S. tuberosum*. Para el caso de PYVV, las secuencias obtenidas compartieron 99 % de identidad para la región CP e hicieron parte del clado principal que agrupó los aislamientos reportados en diferentes departamentos de Colombia y Perú, tanto sobre *S. tuberosum* como en *S. phureja*.

El análisis para PVS ubicó tres de las secuencias obtenidas en el clado correspondiente al linaje Andino de este virus (PVS^A) y que incluye la secuencia de la cepa RL5, cuyo genoma fue secuenciado a partir de muestras foliares de *S.*

phureja var. Criolla Colombia en el municipio de La Unión (Antioquia) (Gutiérrez et al., 2012); mientras que las otras dos secuencias se ubicaron en el clado que representa el linaje Phureja (PVS^P) recientemente propuesto por Vallejo et al. (2016). Los niveles de identidad entre las cinco secuencias de PVS aquí obtenidas variaron del 81 al 83 % entre clados y del 95 al 99 % dentro de cada linaje. El árbol filogenético para PLRV agrupó las secuencias de este trabajo en un subclado con cepas de los departamentos de Colombia obtenidas tanto en papa como en tomate de árbol (*S. betaceum*), siendo los niveles de identidad entre éstas superiores al 99 %. Finalmente, el análisis realizado para PVX indicó la ubicación de la cepa secuenciada en el clado americano de este virus, en conjunto con aislamientos obtenidos sobre papa en el sur de Colombia y Perú (Figura 3).

DISCUSIÓN

La utilización de tubérculos-semilla certificados por su sanidad viral es uno de los aspectos fundamentales para el establecimiento de programas de manejo integrado de enfermedades en los cultivos de papa de todo el mundo (Halterman et al., 2012; Frost et al., 2013).

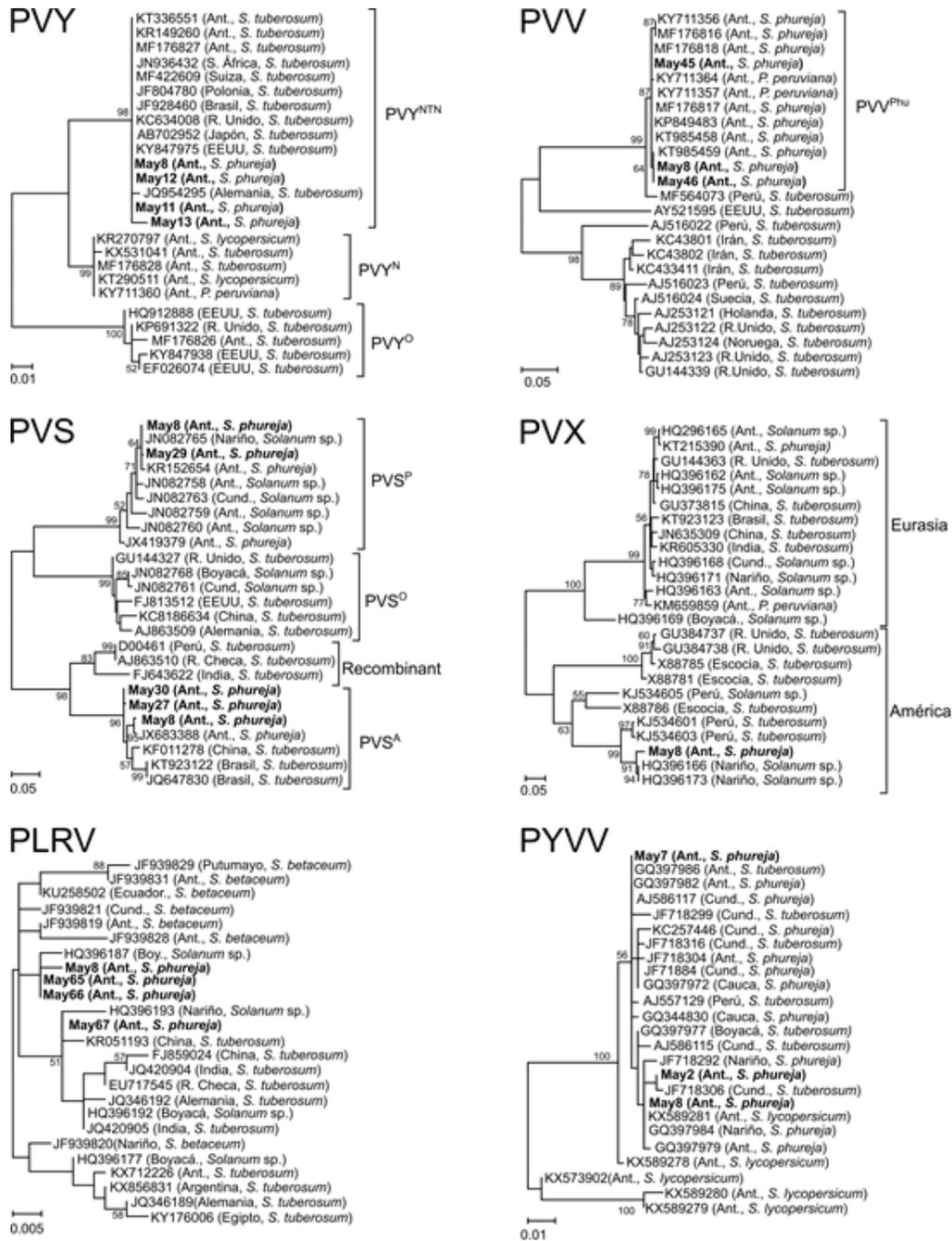


Figura 3. Árboles filogenéticos basados en secuencias de las regiones que codifican para la cápside viral (CP) de aislamientos de seis virus de ARN procedentes de tejido foliar de plantas de papa criolla con síntomas de infecciones virales en Antioquia, Colombia. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap* y los nombres en la derecha corresponden a las variantes y/o linajes principales identificados para cada especie viral

El objetivo principal de la certificación es limitar la incidencia de los agentes causales del proceso de degeneración de tubérculos-semilla a niveles inferiores a umbrales de daño económico preestablecidos (Frost et al., 2013; Thomas et al.,

2016); y aunque además de los virus se han identificado diferentes hongos, bacterias, nematodos e incluso insectos, el efecto más detrimental sobre los rendimientos y la calidad de los tubérculos, se ha asociado con las infecciones

virales, dada su alta sistemicidad desde las plantas progenitoras al material de siembra, especialmente luego de varios ciclos sucesivos de propagación vegetativa (Thomas et al., 2016). Ya que en Colombia se estima que tan solo el 2-10 % de los agricultores utilizan semilla certificada de papa para establecer sus cultivos (Thomas et al., 2016) y que la infección viral en dichos materiales solo se evalúa generalmente por observaciones visuales de síntomas y eventualmente por pruebas de ELISA, en este trabajo se estudiaron los niveles de incidencia de seis virus de importancia económica directamente sobre brotes de tubérculos de papa criolla, utilizando RT-qPCR. Diversos trabajos en el mundo han indicado que esta técnica molecular puede presentar niveles de sensibilidad superiores a las pruebas de ELISA de entre 3 y 8 órdenes de magnitud, según el virus, tejido y variedad de papa evaluada (Kogovsek et al., 2008; Stammeler et al., 2018); e incluso en Colombia trabajos previos utilizando los mismos cebadores empleados en el presente estudio, detectaron dichos virus sobre tubérculos de papa (*S. tuberosum*) en valores superiores al 25, 80,2 y 87,6 % para los virus PVY, PLRV y PVX con respecto a los niveles de incidencia detectados por pruebas comerciales de ELISA (Medina et al., 2015; García et al., 2016; Mesa et al., 2016).

Los análisis de incidencia para los 10 lotes de semilla aquí evaluados arrojaron altos valores de infección de los seis virus en los brotes de tubérculos (>40 %) llegando incluso a la detección de PVS y PVV en el 100 % de éstos. Aunque estos valores resultan alarmantes para la agroindustria de papa en Colombia no son sorprendidos, pues en trabajos previos sobre tubérculos de este mismo hospedante se encontraron niveles de infección que variaron del 60 al 93,75 % (Medina et al., 2015; García et al., 2016; Mesa et al., 2016; Vallejo et al., 2016), mientras que utilizando RT-qPCR con sonda Taqman, Guzmán et al. (2013) encontraron niveles de incidencia de PVV en brotes de tubérculos que variaron del 11 % para plantas asintomáticas al 100 % para aquellas sintomáticas. Para el caso de PVV, su detección en el 40 % de las muestras corresponde al primer reporte de este virus en brotes de tubérculos de papa criolla, aunque Álvarez et al. (2016) ya habían encontrado a partir de análisis en tejido foliar de lotes de papa criolla del Oriente de Antioquia, niveles de

incidencia de este virus que variaron del 6,7 al 86 % entre lotes de cultivo. Estos hallazgos en su conjunto deben llamar la atención de los organismos de sanidad vegetal del país, así como de los gremios de productores de papa y semilleros, para emprender acciones inmediatas que permitan retomar el programa de certificación de semilla de papa criolla en Colombia, pues en la actualidad es prácticamente inoperante.

La expansión del uso de semilla certificada de papa criolla en el país es un aspecto clave para mejorar la competitividad de este cultivo en Colombia, por cuanto en muchos estudios se ha demostrado que con sólo la incorporación de esta variable en el proceso productivo de la papa se obtienen mejoras cercanas al 30 % en los rendimientos y fuertes disminuciones en la incidencia viral; e incluso si el empleo de material certificado se mantiene en el tiempo en una región de cultivo pueden lograrse aumentos en la productividad en niveles de 70-100 %, tal como se ha demostrado en EEUU, Canadá y en diferentes países de Europa occidental (Halterman et al., 2012; Frost et al., 2013; Thomas et al., 2016).

Adicionalmente, se recomienda complementar el programa de certificación de semilla de papa con un proceso de selección positiva de plantas en el campo; dicho sistema ha sido establecido con mucho éxito en diferentes países y es especialmente útil para pequeños agricultores, que no siempre pueden acceder al material certificado y que dada la extensión de sus cultivos pueden hacer el registro detallado de las plantas. En este sentido, cerca del 80 % de los cultivos de papa criolla en Colombia se realiza en extensiones inferiores a 3 ha y por tanto dicho sistema podría ser muy útil de adoptar en este país. Este proceso consiste en la ubicación y marcaje de plantas asintomáticas y con excelente desarrollo fisiológico para su seguimiento hasta el momento de la cosecha, de manera que sus tubérculos sean los utilizados en el siguiente ciclo de siembra (Gildemacher et al., 2011). Se ha reportado que su correcta utilización puede representar aumentos del 30 al 50 % en los rendimientos si la práctica se mantiene en el tiempo y con ingresos progresivos de material certificado luego de varios ciclos de cultivo (Gildemacher et al., 2011).

La otra parte del presente estudio consistió en evaluar la ocurrencia de los virus detectados en los tubérculos-semilla, directamente en los

campos del Oriente de Antioquia, la principal región donde se cultiva papa criolla en este departamento. Los resultados de las pruebas de RT-PCR y secuenciación Sanger confirmaron la infección de los seis virus en plantas en estado de floración. Adicionalmente, la secuenciación NGS que se realizó a partir de una mezcla de muestras foliares confirmó la presencia de los seis virus en el transcriptoma analizado y se identificó también la infección del BPEV, un alphaendornavirus previamente reportado por Muñoz et al. (2017) sobre cultivos de pimentón de esta misma región, pero que dada su capacidad de infectar tanto plantas como hongos y oomycetes (Okada et al., 2011), su reporte en papa criolla requiere ser evaluado con más detalle, pues este virus se ha reportado sobre fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora* spp. (Okada et al., 2011), ambos presentes en cultivos de papa criolla de esta región. Para seis de los siete virus detectados por NGS (BPEV, PLRV, PVS, PVV, PVX y PVY) fue posible obtener sus genomas completos, aumentando así las secuencias reportadas en GenBank para aislamientos colombianos de dichas especies virales. Finalmente, los análisis filogenéticos realizados para la región CP permitieron confirmar que todos los aislamientos encontrados corresponden a variantes y/o linajes previamente identificados en cultivos de papa de Colombia como por ejemplo la raza necrosante de PVY^{NTN}, los linajes Phureja (PVS^P) y Andino (PVS^A) de PVS, Americano de PVX y Phureja de PVV, además de los genotipos principales de PLRV y PYVV.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican altos niveles de incidencia (>40 %) de los virus PLRV, PVS, PVV, PVX, PVY y PYVV en el material de siembra de papa criolla, y por consiguiente la necesidad apremiante de retomar el proceso de producción de semilla certificada en este cultivo.

Al utilizar la secuenciación de nueva generación (NGS) del transcriptoma de una mezcla de tejido foliar de plantas de papa criolla con síntomas de infecciones virales de cuatro lotes de cultivo del Oriente de Antioquia se confirmó la circulación, en esta región, de los seis virus detectados en tubérculos y adicionalmente del BPEV, un alphaendornavirus que tiene genoma de

ARNdc. Los análisis bioinformáticos permitieron ensamblar los genomas completos de seis de los siete virus, pues para el PYVV sólo fue posible obtener genomas parciales de sus tres segmentos genómicos.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia.

LITERATURA CITADA

1. Agindotan, B.O., P.J. Shiel y P.H. Berger. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142(1-2): 1-9.
2. Agronet. 2018. Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano. <http://www.agronet.gov.co/estadistica> (consulta de Sep 15, 2018).
3. Álvarez, D., P. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Caracterización molecular del Potato virus V (PVV) infectando *Solanum phureja* mediante secuenciación de nueva generación. *Acta Biológica Colombiana* 21(3): 521-531.
4. Álvarez, D., P. Gutiérrez y M. Marín. 2017. Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PYVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro* 29(1): 3-14.
5. 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.
6. Faostat. 2018. Food and agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (consulta del 15/09/2018).
7. Franco, L., C. Soto y M. Guzmán. 2009. Detección de los virus PVX, PVS, PVY y PLRV en la Colección Central Colombiana de papa por medio de la técnica de inmunopresión (IMI). *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 5: 130-139.
8. Frost, K.E., R.L. Groves y A.O. Charkowski. 2013. Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision

- of clean seed potatoes. *Plant Disease* 97(10): 1268-1280.
9. García, N.A., P.A. Gutiérrez y M.A. Marín. 2013. Detección y cuantificación del Potato mop-top virus (PMTV) en Colombia mediante qRT-PCR. *Acta Agronómica* 62(2): 120- 128.
 10. García, D., M.A. Olarte, P. Gutiérrez y M.A. Marín. 2016. Detección serológica y molecular del Potato virus X (PVX) en tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. y Bukasov) en Antioquia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18(1): 104-111.
 11. Gil, J., J. Cotes y M. Marín. 2011a. Incidencia y caracterización molecular del Potato leafroll virus (PLRV) en las principales regiones productoras de papa de Colombia. *Fitosanidad* 15(1): 17-24.
 12. Gil, J., J. Cotes, E. González y M. Marín. 2011b. Caracterización genotípica de aislamientos colombianos del potato mop-top virus (PMTV, Pomovirus). *Actualidades Biológicas* 33(94): 69-84.
 13. Gil, J., J. Cotes y M. Marín. 2012. Detección y caracterización molecular del virus X de la Papa (PVX) en regiones productoras de papa de Colombia. *Revista Protección Vegetal* 27(2): 69-76.
 14. Gil, J., J. Cotes y M. Marín. 2013. Incidencia visual de síntomas asociados a enfermedades virales en cultivos de papa de Colombia. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 11(2): 101-110.
 15. Gildemacher, P., E. Schulte-Geldermann, D. Borus, P. Demo, P. Kinyae, P. Mundia y P. Struik. 2011. Seed potato quality improvement through positive selection by smallholder farmers in Kenya. *Potato Research* 54: 253.
 16. Gish, W. y D. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3: 266-272.
 17. Gutiérrez P.A., Alzate, J.F. y M. Marín. 2012. Pirosecuenciación del genoma de una cepa Andina de potato virus S (PVS, *Carlavirus*) infectando *Solanum Phureja* (Solanaceae) en Colombia. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 8(1): 84 - 93.
 18. Gutiérrez, P.A., J.F. Alzate y M. Marín. 2014. Caracterización del viroma de ARN de tejido radical de *Solanum phureja* mediante pirosecuenciación 454 GS-FLX. *Bioagro* 26(2): 89-98.
 19. Gutiérrez P.A., Mesa, H. y M. Marín. 2016. Genome sequence of a divergent Colombian isolate of potato virus V (PVV) infecting *Solanum phureja*. *Acta Virologica* 60(1): 49-54.
 20. Guzmán, M., L. Franco, D. Rodríguez, L. Vargas y J.E. Fierro. 2012. Yield losses in *Solanum tuberosum* group Phureja cultivar Criolla Colombia in plants with symptoms of PVV in field trials. *American Journal Potato Research* 89: 438-447.
 21. Guzmán, M., A. Hernández y L. Franco. 2013. Tracking foliar symptoms caused by tuber-borne *Potato yellow vein virus* (PYVV) in *Solanum phureja* (Juz et Buk) cultivar “Criolla Colombia”. *American Journal Potato Research* 90: 284-293.
 22. Halterman, D., A. Charkowski y J. Verchot. 2012. Potato viruses and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Technology* 6(1): 1-14.
 23. Kogovsek P., L. Gow, M. Pompe-Novak, K. Gruden, G.D. Foster, N. Boonham y M. Ravnikar. 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological Methods* 149(1): 1-11.
 24. Kutnjak, D., R. Silvestre, W. Cuellar, W. Pérez, G. Müller, M. Ravnikar y J. Kreuze. 2014. Complete genome sequences of new divergent potato virus X isolates and discrimination between strains in a mixed infection using small RNAs sequencing approach. *Virus Research* 191(1): 45-50.
 25. Medina, H, P. Gutiérrez y M. Marín. 2015. Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS-ELISA y qRT-PCR en Antioquia (Colombia). *Bioagro* 27(2): 83-92.
 26. Mesa, M.E., M.I. González, P.A. Gutiérrez y M.A. Marín. 2016. Diagnóstico serológico y molecular del Potato leafroll virus (PLRV) en tubérculos-semilla de papa en Antioquia. *Acta Agronómica* 65(2): 204-210.
 27. Muñoz, D., P. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Detection and genome characterization of

- Potato virus Y isolates infecting potato (*Solanum tuberosum* L.) in La Union Antioquia, Colombia. *Agronomía Colombiana* 34(3): 317-328.
28. Muñoz, L., M. Marín y P.A. Gutiérrez. 2017. Genome sequencing of two Bell pepper endornavirus (BPEV) variants infecting *Capsicum annuum* in Colombia. *Agronomía Colombiana*. 35(1): 44-52.
29. Nie, X. y R. Singh. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *Journal of Virological Methods* 91(1): 37-49.
30. Okada, R., E. Kiyota, S. Sabanadzovic, H. Moriyama, T. Fukuhara, P. Saha, M.J. Roossinck, A. Severin y R.A. Valverde. 2011. Bell pepper endornavirus: molecular and biological properties, and occurrence in the genus *Capsicum*. *Journal of General Virology* 92(11): 2664-2273.
31. Riascos, M., P.A. Gutiérrez y M.A. Marín. 2018. Identificación molecular de Potyvirus infectando cultivos de papa en el oriente de Antioquia (Colombia). *Acta biológica Colombiana* 23(1): 39-50.
32. Salazar, L. 2006. Emerging and re-emerging potato diseases. *Potato Research* 49: 43-47.
33. Sánchez de Luque, C., P. Corzo y O. Pérez. 1991. Incidencia de virus de papa y su efecto sobre el rendimiento en tres zonas agroecológicas de Colombia. *Revista ALAP* 4: 36-51.
34. Seminario, J.F., R. Villanueva-Guevara y M.H. Valdez-Yopla. 2018. Rendimiento de cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) amarillos precoces del grupo Phureja. *Agronomía Mesoamericana* 29(3): 639-653.
35. Singh, R., J. Kurz, G. Boiteau y G. Bernard. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *Journal of Virological Methods* 55(1): 133-143.
36. Singh, M., R.P. Singh, M.S. Fageria, X. Nie, R. Coffin y G. Hawkins. 2013. Optimization of a Real-Time RT-PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of Potato virus Y in dormant potato tubers. *American Journal of Potato Research* 90(1): 43-50.
37. Stammler, J., A. Oberneder, A. Kellermann y J. Hadersdorfer. 2018. Detecting potato viruses using direct reverse transcription quantitative PCR (DiRT-qPCR) without RNA purification: an alternative to DAS-ELISA. *European Journal of Plant Pathology* 152(1): 237-248.
38. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
39. Thomas-Sharma, S., A. Abdurahman, S. Ali, J.L. Andrade-Piedra, S. Bao, A.O. Charkowski et al. 2016. Seed degeneration in potato: the need for an integrated seed health strategy to mitigate the problem in developing countries. *Plant Pathology* 65(1): 3-16.
40. Vallejo, D., P.A. Gutiérrez y M. Marín. 2016. Genome characterization of a *Potato virus S* (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. *Agronomía Colombiana* 34: 51-60.
41. Valverde, R.A., S.T. Nameth y R.L. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74(3): 255-258.
42. Villamil, A., W.J. Cuellar y M. Guzmán. 2014. Natural co-infection of *Solanum tuberosum* crops by the *Potato yellow vein virus* and potyvirus in Colombia. *Agronomía Colombiana* 32: 213-223.
43. Yang, L., B. Nie, J. Liu y B. Song. 2014. A reexamination of the effectiveness of ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets *in vitro* using ELISA and quantitative RT-PCR. *American Journal of Potato Research* 91(3): 304-311.