

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / ORIGINAL RESEARCH PAPER

ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y VARIABILIDAD MOLECULAR DEL *Potato virus X* (PVX) EN CULTIVOS DE PAPA DE ANTIOQUIA

Phylogenetic Analysis and Molecular Variability of *Potato virus X* (PVX) in Potato Crops of Antioquia

Daniela GARCÍA RUÍZ¹, Pablo GUTIÉRREZ SÁNCHEZ¹, Mauricio MARÍN MONTOYA².

¹Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Calle 59A n.º 63-20, Bloque 19A-312. Medellín, Colombia.

²Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Calle 59A n.º 63-20, Bloque 19A-310. Medellín, Colombia.

For correspondence. mamarinm@unal.edu.co

Received: 19th June 2015, **Returned for revision:** 14th July 2015, **Accepted:** 21st August 2015.

Associate Editor: Geraldo Mäder.

Citation / Citar este artículo como: García Ruíz D, Gutiérrez Sánchez PA, Marín Montoya MA. Análisis filogenético y variabilidad molecular del *Potato virus X* (PVX) en cultivos de papa de Antioquia. Acta biol. Colomb. 2016;21(1):111-122. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1.51398>

RESUMEN

En este estudio se determinaron las relaciones filogenéticas y los niveles de variación de aislamientos de PVX obtenidos en tejidos foliares de plantas de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* var. Diacol-Capiro y *S. phureja* var. Criolla Colombia en Antioquia, utilizando métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) y de Sanger. Inicialmente, se detectó el PVX mediante DAS-ELISA (Agdia-PSA10000), confirmando su presencia en ocho de las muestras por Inmuncaptura-RT-PCR en tiempo real (IC-RT-qPCR). Los resultados de las pruebas serológicas indicaron la infección de PVX en 14,7 % y 13,3 % de las muestras de Diacol-Capiro y Criolla Colombia, respectivamente. Su identidad fue confirmada por IC-RT-qPCR, con valores de ciclo umbral (Ct) de 15,04 a 27,59 y dos temperaturas de fusión (Tm) (Tm₁ = 80,3 °C ± 0,5 y Tm₂ = 83,3 °C ± 0,5), encontrándose así dos variantes de PVX en Antioquia. Utilizando NGS se detectó el PVX en bajos niveles de infección en las muestras de Criolla Colombia, siendo posible obtener *contigs* parciales para todos los ORFs del genoma viral. Con NGS no se detectó el virus en las muestras de Diacol-Capiro evaluadas. Los análisis filogenéticos realizados con base en secuencias de cápside y replicasa viral separaron los aislamientos de PVX de Antioquia en dos grupos, relacionados con el clado Eurasiático (I) de este virus. Los altos niveles de infección de PVX detectados en los cultivos de papa de Antioquia y la ocurrencia de al menos dos variantes, enfatizan en la necesidad de fortalecer los programas de certificación de tubérculos-semilla de papa, como principal herramienta para el control de este virus.

Palabras clave: DAS-ELISA, NGS, *Potexvirus*, RT-qPCR, *Solanum* spp, variantes.

ABSTRACT

In this study, the phylogenetic relationships and molecular variability of PVX isolates from leaf samples of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* var. Diacol-Capiro and *S. phureja* var. Criolla Colombia in Antioquia were analyzed. Sequences were obtained using Next Generation Sequencing (NGS) of bulk samples and Sanger sequencing. DAS-ELISA (Agdia-PSA10000) revealed infection levels of 14.7 % and 13.3 % leaf samples of Diacol-Capiro and Criolla Colombia, respectively. The presence of PVX was further confirmed by IC-RT-qPCR in eight samples, which resulted in Ct values in the 15.04-27.59 range and two melting temperatures (Tm₁ = 80.3 °C ± 0.5 and Tm₂ = 83.3 °C ± 0.5). These results suggest the presence of at least two PVX variants in Antioquia. Using NGS, PVX was detected at low levels in leaf samples of Criolla Colombia, which resulted in *contigs* for most ORFs of the viral genome; NGS did not detect PVX in Diacol-Capiro samples. Phylogenetic analysis using capsid and replicase sequences separated PVX isolates into two groups within the Eurasian class (I). The high levels of PVX infection detected in potato crops in Antioquia and the presence of at least two variants highlight the need to strengthen current tuber seed certification programs aimed at controlling the spread of this virus.

Keywords: DAS-ELISA, NGS, *Potexvirus*, RT-qPCR, *Solanum* spp, variants.



INTRODUCCIÓN

El *Potato virus X* (PVX), la especie tipo del género *Potexvirus* (Familia *Alphaflexiviridae*), es uno de los virus prevalentes en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) de todo el mundo (Kerlan, 2008). Aunque causa síntomas moderados en las plantas (mosaicos suaves, amarillamiento intervenal) que generalmente no superan el 15-20 % en la reducción de los rendimientos (Cox y Jones, 2010), presenta sinergismo con potyvirus como el *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus A* (PVA) y con carlavirus como el *Potato virus S* (PVS), cuyas infecciones mixtas pueden ocasionar enfermedades severas caracterizadas por mosaicos rugosos, enanismos y reducciones en la producción de tubérculos de hasta 30-50 % (Wang *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2009; Nie y Singh, 2013).

Las partículas virales del PVX consisten en varillas flexuosas con longitud de 470–580 nm y diámetros promedio de 13 nm, que presentan en su interior un genoma de RNA de cadena sencilla positiva (ssRNA+) de 6435 nt, con caperuza m7G en su extremo 5' y cola de poli-A en el 3' (Sonenberg *et al.*, 1978; Morozov *et al.*, 1987; King *et al.*, 2011). El genoma se divide en cinco marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para una replicasa viral de 165,7 kDa (ORF1) con sus dominios funcionales de metil-transferasa, unión a nucleótidos, helicasa y RdRp (*RNA dependent RNA polymerase*); tres proteínas de movimiento viral célula a célula, TGBp1, TGBp2 y TGBp3 (ORFs 2 a 4), y para la cápside viral (CP) de 25 kDa (ORF5); que también actúa como elicitador de la respuesta hipersensible en plantas con genes específicos de resistencia a PVX (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Kutnjak *et al.*, 2014). El producto del ORF1 contiene dominios que presentan homologías con las proteínas 126K y 183K del *Tobacco mosaic virus* (TMV); mientras que los productos de los ORFs 2 y 3 son similares a las proteínas 58K y 14K del *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) y 42K y 13K del *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) (Huisman *et al.*, 1988). El ORF1 es traducido directamente por los ribosomas citoplasmáticos a partir del RNA genómico, mientras que los ORFs 2 a 5 lo hacen a través de la síntesis de RNAs subgenómicos (sgRNAs) con extremos 3' co-terminales (King *et al.*, 2011).

Existen numerosas variantes biológicas de PVX divididas en cuatro grupos según la respuesta de resistencia de las plantas en la interacción gen por gen con el virus; de esta forma, las cepas del grupo 1 inducen respuestas de hipersensibilidad (HR) en plantas con los genes *Nb* o *Nx*; las del grupo 2 inducen HR en presencia de *Nb*; las del grupo 3 inducen HR en plantas con *Nx* y las del grupo 4 no reaccionan con *Nb* ni con *Nx* (Malcuit *et al.*, 2000). Adicionalmente, con base en secuencias que codifican para CP, los análisis filogenéticos han encontrado dos clados principales en esta especie viral, llamados I (Eurasia) y II (América); dichas denominaciones se refieren a la predominancia de cepas de estos orígenes geográficos, pero no excluyen la ocurrencia de aislamientos de otras regiones, tal como ocurre con el subclado II-1 que siendo

de origen "Americano", presenta aislamientos de Inglaterra (Cox y Jones, 2010; Mandal *et al.*, 2012). Las subdivisiones de los clados principales (Ej. II-1 y II-2) han sido validadas en los últimos años con base en análisis filogenéticos de todo el genoma de cepas obtenidas en diferentes países y hospedantes (Yu *et al.*, 2008; Esfandiari *et al.*, 2009; Mandal *et al.*, 2012). Recientemente, dos nuevos sublinajes fueron reportados a partir del análisis de genomas de PVX por secuenciación de nueva generación (NGS) en plantas de papa de Perú (II-3) (Kutnjak *et al.*, 2014) y de uchuva (*Physalis peruviana*) en Colombia (I-2) (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Las metodologías de secuenciación masiva, en paralelo o de NGS, han estado disponibles comercialmente desde 2005, modificando completamente los esquemas de detección de patógenos y en particular de virus en la fitopatología y en la medicina veterinaria y humana (Kreuze *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Roossinck *et al.*, 2015). Los sistemas NGS más utilizados en la actualidad incluyen las plataformas 454 GS FLX+ (Roche), SOLiD (ABI), MiSeq y HiSeq2000/2500 (Illumina). Estas últimas generan secuencias pareadas (*mate-paired-end*) que facilitan los análisis bioinformáticos de ensamblaje *de novo*, con *reads* de 100 a 300 pb y hasta 1 Tb de información por corrido (Adams *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2015).

Utilizando estos sistemas NGS, en el último lustro se han descubierto al menos 49 virus de plantas con genomas tanto de RNA como de DNA; 36 de los cuales fueron clasificados en 16 familias virales y nueve se constituyeron en las especies tipo de igual número de nuevos géneros. Además, se han encontrado al menos cuatro nuevos virus que no presentan niveles de identidad suficientes para asociarlos con alguno de los taxa hasta ahora definidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Wu *et al.*, 2015).

En Colombia, el uso de metodologías NGS también ha permitido detectar y caracterizar molecularmente diferentes especies de virus, especialmente de plantas solanáceas (Gutiérrez *et al.*, 2013; Kreuze *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2014a; Gutiérrez *et al.*, 2014b; Villamil-Garzón *et al.*, 2014; Gutiérrez *et al.*, 2015). Vale la pena resaltar que en estos trabajos se han encontrado variantes virales con genomas divergentes de los comúnmente informados en otras latitudes. Así por ejemplo, para el caso de PVX, Gutiérrez *et al.* (2015) utilizando el sistema HiSeq2000 a partir de RNA total de plantas de uchuva con síntomas de amarillamientos, secuenciaron completamente los 6435 nt del genoma viral; mientras que el análisis filogenético de esta cepa la ubicó en un subclado independiente pero asociado al clado I (Eurasia) de este virus.

La presencia generalizada de PVX en los cultivos de Colombia ha sido descrita desde 1980, cuando Guerrero *et al.* (1980), registraron la ocurrencia de infecciones mixtas de este virus con PVY, PVS y PLRV que podrían ocasionar reducciones en el rendimiento de hasta un 61 % en diferentes variedades nacionales de papa. Posteriormente, Guzmán *et al.* (2010) en una evaluación con pruebas de DAS-ELISA

de un grupo de 581 accesiones de papa de la Colección Central Colombiana, encontraron este virus en el 13,9 % de las muestras y Gil *et al.* (2012) en un estudio que incluyó 320 muestras foliares de papa de cuatro departamentos de Colombia (Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño) determinaron mediante DAS-ELISA, niveles de incidencia de PVX del 8 %. En este mismo estudio, pero utilizando RT-PCR convencional y secuenciación de una región de 562 pb de CP, se informó de la ocurrencia de dos variantes principales de PVX en Colombia, las que estuvieron relacionadas con los linajes I y II de este virus y presentaron muy altos niveles de variación genética entre ellas (hasta del 23 %). Más recientemente, utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) se detectó la infección primaria de PVX en el 93,75 % de 32 muestras de tubérculos de papa de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia obtenidas en Antioquia (García-Ruiz *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se evaluaron mediante pruebas de DAS-ELISA los títulos virales de PVX en 68 muestras de tejido foliar de plantas de *S. tuberosum* subsp. *andigena* var. Diacol-Capiro y en 45 de *S. phureja* var. Criolla Colombia obtenidas en diferentes municipios de Antioquia (Colombia); siendo confirmada su presencia con Inmuncaptura-RT-PCR en tiempo real (IC-RT-qPCR). Adicionalmente, se obtuvieron secuencias parciales de la cápside y replicasa viral a partir de secuenciación NGS HiSeq2000 y Sanger, para evaluar sus relaciones filogenéticas con otros aislamientos de este virus reportados en diferentes países del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras vegetales

Se realizaron colectas de tejidos foliares de *S. tuberosum* de papa var. Diacol-Capiro en los municipios de La Unión (05°58'28" N, 75°21'43" W, altitud 2400 m s.n.m.), Santa Rosa de Osos (06°38'51" N, 75°27'37" W, altitud 2550 m s.n.m.) y Yarumal (6°57'0" N, 75°25'1" W, altitud 2100 m s.n.m.); y de *S. phureja* var. Criolla Colombia en La Unión, Entrerriós (6°33'0" N, 75°31'1" W, altura 2380 m s.n.m.) y Marinilla (06°10'36" N, 75°20'21" W, altitud 2120 m s.n.m.). En cada municipio, se obtuvieron por lo menos ocho muestras de folíolos de papa tomadas de manera aleatoria en los lotes de cultivo que se encontraban en estado de floración; por esta razón el número de muestras disponibles para los análisis varió entre localidades, siendo en total obtenidas 68 muestras para la variedad Diacol-Capiro y 45 para Criolla Colombia.

Pruebas de DAS-ELISA

En cada una de las 113 muestras fue evaluada la presencia de PVX mediante pruebas de DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich*) (Agdia-PSA10000, EEUU). Los resultados colorimétricos (densidades ópticas-DO) fueron cuantificados a 405 nm en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia). Cada prueba realizada, incluyó dos controles

positivos, uno comercial consistente de una muestra vegetal liofilizada infectada con PVX (Agdia) y el otro de procedencia local (La Unión, Antioquia), obtenido en tejidos foliares de *S. phureja* infectados con PVX. En todas las pruebas también se incluyó un control negativo correspondiente a una muestra liofilizada de tejido de papa libre de virus (Agdia). Los resultados de las pruebas de ELISA fueron analizados estadísticamente utilizando la definición del punto de corte (*Cut-off*) descrito por la compañía serológica Bioreba (Suiza) (<http://www.bioreba.com>), que utiliza como base de análisis un histograma de distribución de frecuencias de los valores de absorbancia para calcular la fórmula: Punto de corte = (promedio + 3 desviaciones estándar) x 1,1 (Fig.1).

IC-RT-qPCR y secuenciación de amplicones

La naturaleza viral de ocho de las muestras que resultaron positivas en las pruebas de DAS-ELISA, incluyendo los controles positivos, fue confirmada mediante IC-RT-qPCR, a partir de la liberación Post-ELISA de las partículas virales, con el procedimiento descrito por Wetzel *et al.* (1992), en el que se utilizan 70 µl de buffer de liberación (Tris-HCl 10mM pH 8,0, 1 % Triton X 100) e incubación a 70 °C durante 10 min. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en dos pasos con el sistema SYBR Green I. Para la retrotranscripción se utilizaron 20 µL de volumen, conteniendo 200 U de la enzima Maxima Reversa Transcriptasa (Thermo, EEUU), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 pmol del primer reverso (para el gen CP) PVXR (5'-GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC- 3') (Nie y Singh, 2001), 20 U de inhibidor de RNasa (RiboLock, Thermo) y 12 µL del producto de la liberación Post-ELISA. Las reacciones se incubaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) a 65 °C por 5 min, seguido de 50 °C por 30 min y 85 °C por 5 min para inactivar la enzima. Las reacciones de qPCR se realizaron en 25 µL conteniendo 12,5 µL del kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo), 10 µL de agua estéril tratada con DEPC, 50-100 ng de DNA copia (cDNA) y 0,3 µM de los primers PVX_101-2_FP (5'-AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC-3') y PVX_101-2_RP (5'-GCT TCA GAC GGT GGC CG-3'), que generan un amplicon de 100 pb (posiciones 6110 y 6210) de la región que codifica para CP (Agindotan *et al.*, 2007). La amplificación se desarrolló en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen, Alemania) y consistió de 95 °C por 10 min para activar la Taq-polimerasa (*Hot-start*), seguido por 35 ciclos de 95 °C por 10 s y 50 °C por 45 s. La adquisición de fluorescencia se realizó después de cada ciclo de amplificación y los valores de Ciclo umbral (*threshold Cycle-Ct*) para cada muestra fueron definidos utilizando los valores por defecto del programa Rotor-Gene Q ver. 1.7., siendo consideradas como positivas aquellas muestras que superaron el valor basal de fluorescencia antes del ciclo 35 (Schena *et al.*, 2004). Posteriormente, los amplicones fueron sometidos a un análisis de desnaturalización utilizando la herramienta HRM (*High Resolution Melting*) entre 50 y 99 °C

y comparados los valores de temperatura de fusión (*melting Temperature*–*T_m*) con respecto a los alcanzados en los controles positivos. Todas las reacciones incluyeron además un control negativo libre de cDNA viral.

Finalmente, cinco de los amplicones correspondientes a tres muestras de tejido foliar (dos de *S. phureja* y uno de *S. tuberosum*) y a los dos controles positivos, fueron secuenciados por el método de Sanger en un equipo ABI 3730xl de la compañía MacroGen (Corea del Sur), previa purificación con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Las secuencias fueron editadas con el software Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) y comparadas con GenBank mediante BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Secuenciación Sanger de CP

Dada la carencia de secuencias de CP disponibles en GenBank para aislamientos de PVX procedentes del norte Antioqueño, en cinco de las muestras de esta región que resultaron positivas en las pruebas de DAS-ELISA y de IC-RT-qPCR, además del control positivo local de *S. phureja*, se extrajo el RNA total utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo), a partir de 100 mg del tejido macerado, eluido en 50 μ L de agua tratada con DEPC y determinada su concentración y pureza por lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo), para su utilización en pruebas de RT-PCR convencional. Las condiciones de retrotranscripción fueron similares a las descritas anteriormente, y para el PCR se emplearon 25 μ L de volumen que incluían 17,8 μ L de agua, 1X buffer de enzima (10X), 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerasa (Thermo), 1 μ L de cDNA y 0,2 μ M de los primers PVXF (5'-TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG-3') y PVXR (5'-GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC-3') que se unen a las posiciones del genoma de PVX 5664-5683 y 6225-6205, respectivamente, y amplifican un producto de 562 pb de la región CP (Nie y Singh, 2001). El programa de amplificación se inició a 95 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 53 °C por 45 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. El tamaño de los amplicones fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa al 1,8 %, suplementado con GelRed 1X (Biotium, EEUU), utilizando para el análisis un equipo Bio Doc Analyze (Biometra, Alemania) y se procedió a su purificación del gel mediante el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo). Las muestras fueron secuenciadas en ambos sentidos en un equipo ABI Prism 3730xl de la compañía MacroGen.

Secuenciación NGS

Con el fin de aumentar la información de secuencias de PVX infectando papa en Colombia, en esta investigación se realizaron cuatro secuenciaciones masivas a partir de dos grupos de muestras (*bulks*) de tejido foliar para cada variedad (Diacol-Capiro y Criolla Colombia), procedentes

del municipio de La Unión (Antioquia); estos *bulks* fueron identificados como NGS1, NGS2 para las muestras foliares de *S. phureja* y NGS3, NGS4 para aquellas de *S. tuberosum*. El RNA se extrajo utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo) y posteriormente, las muestras fueron tratadas con el kit TruSeq Stranded Total RNA with Ribozero Plant kit (Illumina, EEUU) con el fin de evitar el RNA ribosomal en el proceso de secuenciación y fue evaluada su integridad utilizando el programa RIN (*RNA Integrity Number*) (Imbeaud *et al.*, 2006) a partir de lecturas en un equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EEUU). Las librerías de cDNA se construyeron con el kit TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina) y la secuenciación masiva fue realizada en un equipo HiSeq2000 (Illumina, EEUU) de la compañía MacroGen. Una vez obtenidas las secuencias, se removieron las bases con baja calidad (*Phred* < 30) utilizando el programa SeqTK (<https://github.com/lh3/seqtk>) y los *reads* correspondientes a secuencias de PVX fueron identificados por mapeo contra genomas de referencia (Acciones AF111193 y KM659859) utilizando el programa Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012) y confirmación por BLASTX (Gish y States, 1993).

Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas por NGS y Sanger para las regiones codificantes de la cápside y replicasa viral, fueron utilizadas como base para realizar análisis filogenéticos a partir de su alineamiento con el software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) con respecto a secuencias de cepas de PVX de referencia internacional. Los análisis se realizaron con el algoritmo de Máxima verosimilitud y el modelo Jukes-Cantor utilizando el programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). El soporte de la topología interna de las ramas del árbol fue determinado por análisis de *bootstrap* con 1000 remuestreos (Felsenstein, 1985).

RESULTADOS

Pruebas de DAS-ELISA

El PVX fue detectado mediante pruebas de DAS-ELISA en el 14,7 % y 13,3 % de las muestras de las variedades Diacol-Capiro y Criolla-Colombia, respectivamente; con excepción de en las muestras foliares obtenidas de Santa Rosa de Osos, el virus fue encontrado en al menos una de las muestras procedentes de los demás municipios evaluados (Fig. 1). La validez de las pruebas de DAS-ELISA fue confirmada por los altos valores de absorbancia obtenidos para los controles positivos (3,2 para el control comercial y 2,8 para el local de *S. phureja*) y los bajos niveles alcanzados para los controles negativos (promedio = 0,14; SD = 0,021); definiéndose en el histograma de frecuencias de absorbancia a 405 nm, un nivel de 0,196, como el valor de corte del ensayo.

IC-RT-qPCR y secuenciación de amplicones

Las pruebas de IC-RT-qPCR utilizando como molde los productos de Post-ELISA resultaron positivas para las ocho

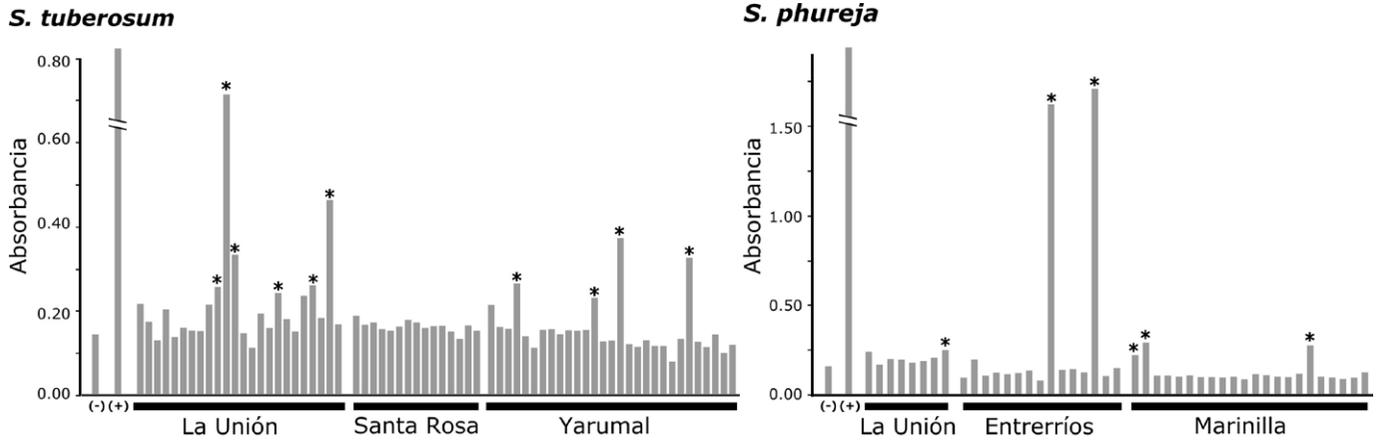


Figura 1. Resultados de las pruebas de DAS-ELISA para la detección del *Potato virus X* (PVX) en tejidos foliares de papa de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, de diferentes municipios del Departamento de Antioquia. Los asteriscos (*) representan los resultados positivos y (+) y (-) las lecturas de los controles respectivos.

muestras evaluadas, con valores de Ct de 15,04 a 27,59, (promedio 21,98) y para los controles positivos de 20,4 (Agdia) y 15,04 (*S. phureja*) (Fig. 2). El análisis de las curvas de desnaturalización, permitió identificar dos variantes de este virus entre las muestras foliares, con valores de T_m de $80,3 \pm 0,5$ °C y $83,7 \pm 0,5$ °C (Tabla 1).

La naturaleza viral de los amplicones generados en las reacciones de IC-RT-qPCR fue confirmada por secuenciación de Sanger, encontrándose niveles de identidad del 96–100 % con respecto a secuencias de aislamientos del clado I de Eurasia de PVX (ej. KJ534604, JX905355 y HQ433257). Por su parte, los controles positivos (de Agdia y local de *S. phureja*) presentaron 100 % de identidad con las accesiones de PVX: KF568903, KC875236 y KM659859.

Secuenciación Sanger de CP y NGS

Utilizando RT-PCR convencional con los primers PVXF y PVXR, se obtuvieron los fragmentos del tamaño esperado de 562 pb para tres de las cinco muestras evaluadas, dos de ellas (17Sp y 21Sp) procedentes del municipio de Entrerrios y la tercera correspondiente al control positivo de *S. phureja*. La naturaleza viral de dichos amplicones fue confirmada por comparación con las bases de datos moleculares, presentando niveles de identidad superiores al 98 % con respecto a diferentes accesiones de CP para PVX (X65015, HG518657, HQ396172, KF568901).

Los resultados de la secuenciación NGS generaron librerías pareadas de 23.986.627 reads (NGS1- *S. phureja*), 4.550.998 reads (NGS2- *S. phureja*), 20.356.009

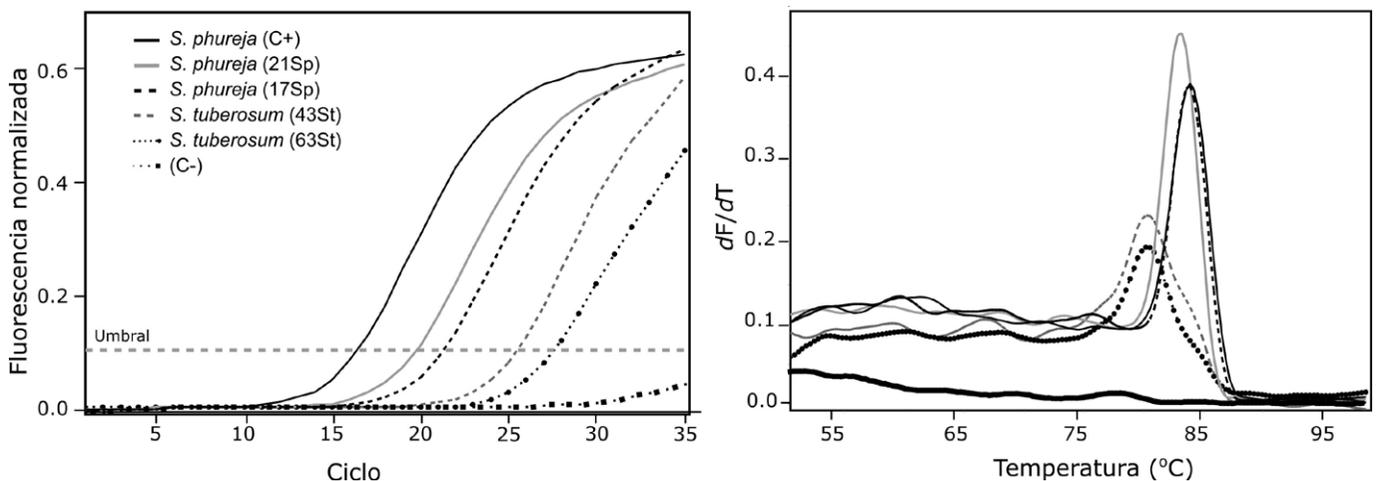


Figura 2. A Curvas de amplificación por RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I y los primers PVX_101-2_FP y PVX_101-2 RP para la detección del *Potato virus X* (PVX) en tejidos foliares procedentes de cultivos de papa de Antioquia. B Perfiles de las curvas de desnaturalización de los amplicones específicos de PVX obtenidos por IC-RT-qPCR. Se presentaron dos valores de T_m ($T_{m1} = 80,3 \pm 0,5$ °C y $T_{m2} = 83,7 \pm 0,5$ °C) que identifican las dos variantes de este virus en Antioquia.

Tabla 1. Confirmación por IC-RT-qPCR de la presencia del *Potato virus X* (PVX) en tejidos foliares de papa de plantas procedentes de diferentes municipios de Antioquia.

Muestra	Procedencia	Varietal	Valor de Ct*	Valor de Tm**
C-			> 35	
<u>C+ (Agdia)</u>	EEUU		20,4	83,7
<u>C+ (<i>S. phureja</i>)</u>	La Unión	Criolla Colombia	15,04	83,8
<u>43St</u>	Yarumal	Diacol-Capiro	24,11	80,3
<u>52St</u>	Yarumal	Diacol-Capiro	24,3	80,0
<u>55Sr</u>	Yarumal	Diacol-Capiro	26,13	80,3
<u>63St</u>	Yarumal	Diacol-Capiro	27,59	80,3
<u>17Sp</u>	Entrerriós	Criolla Colombia	19,89	83,7
<u>21Sp</u>	Entrerriós	Criolla Colombia	18,31	83,0

*Ct corresponde al ciclo umbral de amplificación; Ct > 35 representa resultados negativos en las pruebas de RT-qPCR. **Tm indica la temperatura de fusión, es decir aquella en la que el 50 % de la doble hélice de los amplicones se encuentran desnaturalizados. Las muestras subrayadas corresponden a los amplicones obtenidos por RT-qPCR que fueron secuenciados y confirmados como parte de la región que codifica para la cápside de PVX.

reads (NGS3-*S. tuberosum*) y 4.878.771 reads (NGS4-*S. tuberosum*). Los análisis de BLASTX y BLASTN realizados con estos grupos de datos, identificaron la presencia de PVX en las dos muestras foliares de *S. phureja*, pero no se detectó en Diacol-Capiro. Por esta razón, los mapeos fueron sólo realizados para las secuencias de *S. phureja* y resultaron en el ensamblaje para los ORFs 1 a 5 de 73, 16, 0, 7 y 16 *contigs* para NGS1 y 100, 6, 6, 9 y 8 *contigs* para NGS2, respectivamente (Fig. 3).

Análisis filogenéticos

El árbol filogenético generado utilizando 445 posiciones del ORF5 (CP) del genoma de PVX presentó dos clados

principales correspondientes a los linajes Eurasia y América, previamente definidos para este virus por Cox y Jones (2010). El clado I presentó un soporte de *bootstrap* del 100 % y se dividió en dos subgrupos (I-1 y I-2), siendo el I-1 el que presentó mayor número de aislamientos de PVX procedentes de diferentes orígenes geográficos, e incluyendo las tres secuencias obtenidas por Sanger en el presente estudio (17Sp, 21Sp y C+); mientras que el subclado I-2 agrupó las dos secuencias de CP ensambladas por NGS a partir del transcriptoma de *S. phureja* de muestras del municipio de La Unión, con el aislamiento PVX-Physalis, también procedente de este municipio antioqueño, pero de plantas de uchuva (Gutiérrez *et al.*, 2015). Los clados principales se

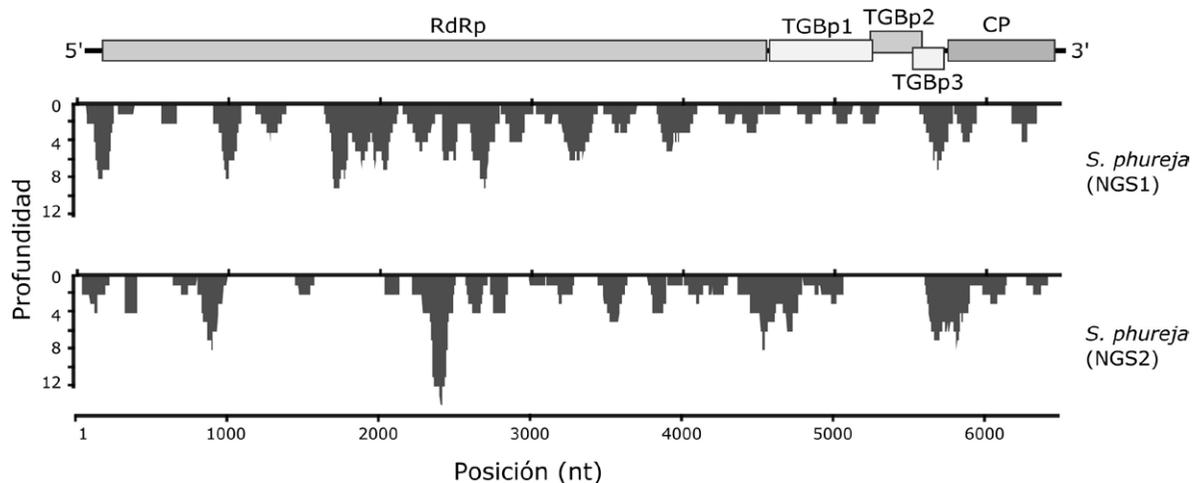


Figura 3. Valores de profundidad de la secuenciación de nueva generación (NGS) mediante el sistema Hiseq2000 para el *Potato virus X* (PVX) en dos grupos de muestras de tejido foliar de *S. phureja* procedentes del municipio de La Unión (Antioquia). En la parte superior se presenta el diagrama a escala del genoma de este virus, indicándose las proteínas resultantes de cada marco abierto de lectura (ORF).

presentaron claramente diferenciados de la secuencia del grupo externo de análisis, el potexvirus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)

Por otra parte, el clado II presentó tres subclados (II-1, II-2, II-3), representados por un aislamiento (DY) de PVX de Escocia (II-1); por el aislamiento HB de Bolivia y uno de *S. tuberosum* de Estonia (II-2) y por dos aislamientos colombianos de PVX reportados por Gil *et al.* (2011) a

partir de muestras de *S. tuberosum* del departamento de Nariño (II-3); ninguno de los aislamientos secuenciados en este trabajo hizo parte de este clado (Fig. 4A). Los niveles de identidad genética encontrados entre las cepas del subclado I-1 superaron el 98 % y fueron del 95 % con respecto al subclado I-2; pero descendieron hasta el 77 % con respecto a las cepas del linaje Americano (II). Los niveles de identidad para esta región de CP entre las cepas de PVX con respecto

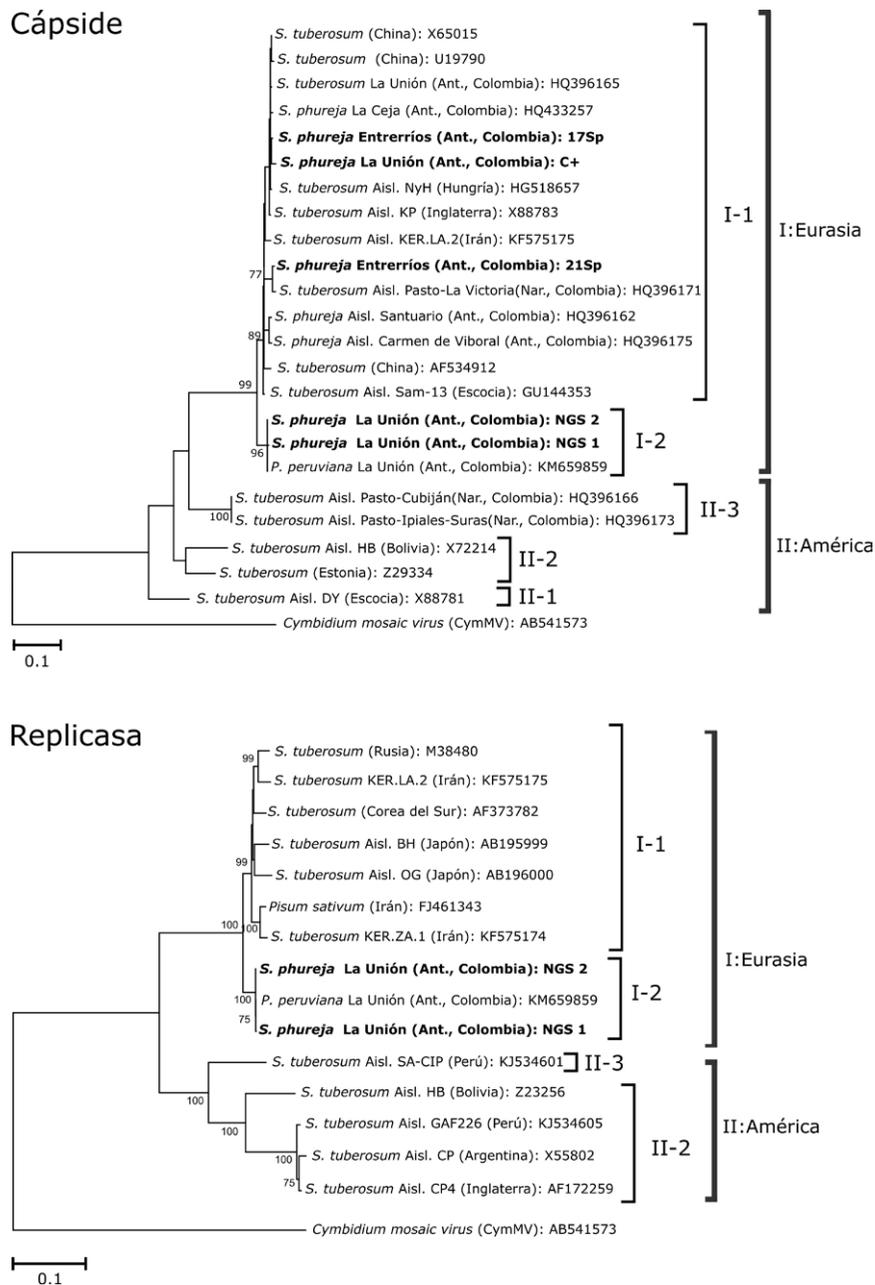


Figura 4. (A) Árbol filogenético basado en secuencias de la regiones que codifican para la cápside y (B) la replicasa viral de aislamientos del *Potato virus X* procedentes de cultivos de papa de Antioquia y otros lugares del mundo. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap* > 75 % y los números externos se refieren a los clados principales y subclados definidos en el análisis filogenético. Las muestras resaltadas corresponden a las secuenciadas en este trabajo.

al grupo externo de análisis CymMV, fueron cercanos al 43 % (Tabla 2).

El árbol filogenético realizado para 4417 posiciones del ORF1 que codifica para la replicasa viral, presentó una topología similar a la descrita para el análisis de CP, aunque por ausencia de secuencias en GenBank para esta región, no se generó el subclado II-1. Las dos secuencias de *S. phureja* obtenidas mediante NGS nuevamente agruparon en el subclado I-2 con el aislamiento de PVX obtenido en

P. peruviana de Colombia, confirmándose así la afinidad filogenética entre cepas de PVX procedentes de diferentes hospedantes en los Andes Colombianos (Fig. 4B). Finalmente, los niveles de identidad encontrados para esta región entre los aislamientos del clado I fueron superiores al 95 % y cayeron hasta el 75 % entre éstos y los miembros del clado II. Los niveles de identidad entre las cepas de PVX con respecto al grupo externo de análisis CymMV para esta región del ORF1, fueron cercanos al 48 % (Tabla 2).

Tabla 2. Matriz de identidad de secuencias parciales de nucleótidos del ORF5 (445 posiciones) que codifica para la proteína de la cápside y del ORF 1 (4417 posiciones) que codifica para la replicasa viral del *Potato virus X* (PVX).

Cápside	(1)									
<i>S. phureja</i> ; 17Sp. (Entrerriós)	(1)	ID	(2)							
<i>S. phureja</i> ; C+ (La Unión)	(2)	98,8	ID	(3)						
<i>S. phureja</i> ; NGS2 (La Unión)	(3)	95,2	95,2	ID	(4)					
<i>S. tuberosum</i> ; Aisl.NyH (Hungria; HG518657)	(4)	99,3	98,6	95,2	ID	(5)				
<i>S. phureja</i> (La Ceja; HQ433257)	(5)	99	98,4	95,4	99,3	ID	(6)			
<i>S. tuberosum</i> ; Aisl. Sam13 (Escocia; GU144353)	(6)	98,1	97,5	96,3	98,4	98,1	ID	(7)		
<i>S. tuberosum</i> Aisl.HB_ (Bolivia; X72214)	(7)	77,2	77,2	76,8	77,5	77,2	77,5	ID	(8)	
<i>S. tuberosum</i> Aisl.Ipiales-Suras (Nariño; HQ396173)	(8)	78,8	78,1	78,4	78,8	79,5	79	80,9	ID	(9)
<i>Cymbidium mosaic virus</i> (China; AB541573)	(9)	43,6	43,9	43,2	43,2	43,6	42,5	43,5	43,9	ID
Replicasa	(1)									
<i>P. peruviana</i> (La Unión; KM659859)	(1)	ID	(2)							
<i>S. tuberosum</i> (Corea del Sur; AF373782)	(2)	95,2	ID	(3)						
<i>S. tuberosum</i> ; Aisl.BH (Japón; AB195999)	(3)	95,1	96,2	ID	(4)					
<i>S. tuberosum</i> ; Aisl. OG (Japón; AB196000)	(4)	94,4	95,7	95,6	ID	(5)				
<i>S. tuberosum</i> ; Aisl.KER.LA.2 (Irán; KF575175)	(5)	94,7	96	95,7	95,2	ID	(6)			
<i>S. phureja</i> ; NGS2 (La Unión)	(6)	99,7	94,9	94,7	94,2	94,2	ID	(7)		
<i>S. tuberosum</i> ; Aisl.CP (Argentina; X55802)	(7)	75,4	75,4	75,5	75,4	75,3	73,5	ID	(8)	
<i>S. tuberosum</i> ; Aisl.HB (Bolivia; Z23256)	(8)	75,9	75,9	76,1	76,2	76,3	55,6	75,2	ID	(9)
<i>Cymbidium mosaic virus</i> (China; AB541573)	(9)	49	48,6	49	48,7	49,1	49	49,3	75,3	ID

DISCUSIÓN

En esta investigación se detectó mediante pruebas de DAS-ELISA la infección de PVX en niveles de 14,7 % y 13,3 %, en muestras de tejido foliar de plantas de papa, obtenidas en Antioquia en las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, respectivamente. Dichos niveles de detección se encuentran dentro del rango registrado por Gil *et al.* (2012) en un estudio de incidencia de este virus también realizado con DAS-ELISA, pero que incluyó además de muestras de Antioquia, otras obtenidas en diferentes regiones cultivadoras de los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Nariño. En dicho trabajo, el PVX se encontró con una incidencia nacional del 8 %; y específicamente para las subregiones de Antioquia entre el 5 % (Norte) y 26 % (Oriente cercano). Evaluaciones similares realizadas en otros países, como Costa Rica (Vásquez *et al.*, 2006), Pakistán (Abbas *et al.*, 2012) y China (Wang *et al.*, 2011) han detectado este virus en tejido foliar de papa en niveles del 77 %, 53,6 % y 12,4 %, respectivamente; siendo señalada como la principal razón para obtener estos altos valores de incidencia, las deficiencias en la sanidad del material de siembra, pues el PVX es transmitido por vía mecánica y por tubérculo-semilla, pero no por vectores artrópodos, lo que sí ocurre con la mayoría de los otros virus que afectan la papa (PVY, PVS, PLRV, PVV) (Kerlan, 2008; Frost *et al.*, 2013).

La efectividad del uso de la práctica de siembra de semilla certificada de papa por su sanidad viral, ha sido plenamente demostrada en países como Canadá y Estados Unidos, en los que operan estrictos sistemas estatales y privados de indexaje de semilla, acompañados por el empleo de técnicas de detección altamente sensibles como RT-PCR múltiple y RT-PCR en tiempo real (Agindotan *et al.*, 2007; Halterman *et al.*, 2012). Así por ejemplo, Frost *et al.* (2013) indican que la detección de PVX es marginal en los cultivos de papa del estado Wisconsin, uno de los mayores productores de este tubérculo en EEUU, siendo indicado que de 500.000 plantas evaluadas en el programa de certificación estatal de semilla entre los años 1990 a 2000, ninguna resultó positiva para la infección de PVX, así como tampoco se detectó el virus en evaluaciones realizadas en dicho estado, sobre 2100 plantas de 20 cultivos diferentes y nueve variedades de papa. La comparación de estos reportes con los encontrados en el presente estudio resultan alarmantes; pero es más preocupante aún para la agroindustria de producción de papa de Antioquia, los resultados de un estudio reciente, utilizando pruebas de RT-qPCR para la detección directa del PVX en tejidos de tubérculos de papa y en el que se detectó este virus en el 93,75 % de las muestras evaluadas (García-Ruiz *et al.*, 2015); es decir niveles de infección del material de siembra similares a los informados en un trabajo realizado en Camerún, pero utilizando pruebas de DAS-ELISA (90 % de infección) (Njukeng *et al.*, 2013). Por esto, la generación de tubérculos-semilla de *S. phureja* y *S. tuberosum* var. Diacol-Capiro libre de PVX resulta imperativo para la cadena de

la papa en Colombia, siendo posible la utilización de las técnicas de detección evaluadas en el presente estudio para monitorear la infección viral a lo largo del proceso de certificación, que incluye materiales de siembra Super-élite, Élite, Básico, Registrado y finalmente Certificado.

La utilización de la metodología de NGS a partir de *bulks* de muestras foliares de papa indicó la presencia de PVX, aunque en bajos niveles de infección, sólo en los *bulks* de muestras de *S. phureja*, pero no en los de *S. tuberosum*, presentándose *reads* asociados a este virus en proporciones de $2,33 \times 10^{-6}$ (NGS1) y $1,42 \times 10^{-5}$ (NGS2); aunque esta información fue suficiente para el ensamblaje de entre seis y 100 *contigs* distribuidos a lo largo del genoma del PVX. La ausencia de detección por NGS del PVX en las muestras de Diacol-Capiro, seguramente se debe al factor de dilución de aquellas muestras posiblemente infectadas por el virus, por lo que en trabajos futuros será necesario reducir el número de submuestras utilizadas para cada *bulk* bajo análisis, cuando se utilicen plataformas de NGS como las aquí empleadas. En un trabajo reciente realizado por Ho *et al.* (2014) en el que se generó una herramienta bioinformática de búsqueda de virus de plantas (VirFind) a partir de resultados NGS, se encontró que este tipo de análisis podía identificar apropiadamente hasta un *read* de origen viral en bases de datos de 25 a 30 millones de *reads*, lo que da cuenta de altísimos niveles de detección viral, que según los autores corresponden a una copia viral por transcriptoma vegetal bajo análisis.

En la actualidad el costo inicial de los equipos y de las plataformas experimentales que soportan los sistemas NGS, continua siendo uno de los principales limitantes para su utilización masiva en sistemas comerciales de detección de virus de plantas; así por ejemplo, un corrido de secuenciación utilizando el sistema HiSeq2000 empleado en el presente estudio, tiene un costo aproximado de \$1000 dólares por cada Gb de información generada (Liu *et al.*, 2012). El otro factor clave que restringe el uso a gran escala de estas metodologías NGS en la agricultura, es la necesidad de aumentar las capacidades computacionales y de disponer de un mayor número de técnicos preparados en disciplinas bioinformáticas y de biología de sistemas.

De gran interés resultará en el futuro obtener las secuencias completas de los genomas de las dos variantes de PVX identificadas en este trabajo, para lo que se propone su inoculación en grupos de plantas indicadoras, que permitan aumentar el título viral y evitar la presencia de infecciones mixtas con otros virus que pudieran afectar los ensamblajes bioinformáticos de dichos genomas. Esta información será además relevante para evaluar regiones polimórficas que permitan el diseño de primers específicos para la detección selectiva de las variantes del virus aquí encontradas. En un trabajo previo adelantado por nuestro grupo (Gutiérrez *et al.*, 2015), fue posible la secuenciación completa (6435 nt) de un aislamiento de PVX obtenido de plantas de *P. peruviana*

en Colombia, identificándose los cinco ORFs (RdRp, TGB1, TGB2, TGB3 y CP) reportados en los estudios pioneros de este virus realizados por Morosov *et al.* (1987) y Huisman *et al.* (1988), además del extremo 5' y la metil-guanosina y la cola de poli-A ubicada en el extremo 3', reportadas por Sonenberg *et al.* (1978).

Los análisis filogenéticos realizados a partir de las secuencias de PVX obtenidas con las metodologías HiSeq2000 (para CP y replicasa) y de terminación por dideoxinucleótidos de Sanger (para CP), generaron dendrogramas con topologías similares, en los que se presentan dos clados principales (I y II) representando los linajes de Eurasia y América, previamente definidos por Cox y Jones (2010). Así mismo, coinciden en la definición de los subgrupos I-1, I-2; II-1, II2 y II3, con los registros recientes realizados por Kutnjak *et al.* (2014), en su estudio de secuenciación masiva de cinco aislamientos de PVX obtenidos en diferentes materiales de papa en Perú. Los aislamientos obtenidos en el presente estudio, se ubicaron en los dos subgrupos del Clado Eurasiático: las dos secuencias generadas por NGS y procedentes del municipio de La Unión estuvieron asociadas al aislamiento PVX-Physalis en el subclado I-2 y las dos restates de Entrerriós, así como el control positivo de *S. phureja*, obtenidos por secuenciación Sanger de la región CP, lo hicieron en el subclado I-1, confirmando nuevamente la ocurrencia de dos variantes de PVX en los cultivos de papa de Antioquia. Es importante anotar que la denominación de los clados de PVX como "Eurasia" y "América" no indican que el origen de los aislamientos de este virus procedan de una u otra región, sino más bien representan los nombres de las regiones donde inicialmente fueron detectados en mayor número diferentes variantes de PVX. Por esto, al ser la región Andina el centro de origen de la papa, corresponde también a la zona de mayor diversidad de sus virus asociados, lo que es claramente visible en los dendrogramas generados en el presente estudio, en el que se incluyen en ambos clados, aislamientos de PVX de diferentes países suramericanos.

Teniendo en cuenta los costos y el nivel de experticia asociado a los diferentes métodos de detección de PVX evaluados en este estudio, sugerimos la utilización de las herramientas NGS para verificar el estado fitosanitario de las plantas obtenidas por cultivo de meristemos *in vitro* que se utilizan en el país para dar inicio a los programas de certificación de tubérculo-semilla de papa; mientras que los materiales de las categorías Super élite y Élite podrían ser evaluados por técnicas como IC-RT-qPCR. En este sentido, es relevante citar el trabajo realizado por Bai *et al.* (2007) en China, que detectó la infección con los virus PLRV, PVX, PVY y PVS en niveles del 3 %, 17 %, 18 %, 20,7 %, respectivamente, en evaluaciones realizadas a las plantas *in vitro* utilizadas para iniciar los procesos de certificación de tubérculos de papa en diferentes provincias del Suroccidente y Nororiente de este país asiático.

Ya que el PVX es un virus que se transmite por contacto y principalmente por tubérculo-semilla en los cultivos de papa, pero no por insectos vectores, es necesario fortalecer los programas de certificación del material de siembra que se utiliza en el país, con métodos altamente sensibles como las pruebas de RT-qPCR y de secuenciación de nueva generación.

CONCLUSIONES

En este trabajo se detectaron mediante pruebas de DAS-ELISA niveles de infección del PVX del 14,7 % y 13,3 % en muestras foliares de plantas de papa procedentes de diferentes municipios del departamento de Antioquia de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, respectivamente; lo que representa altos niveles de incidencia de este virus en los cultivos de este departamento.

Utilizando secuenciación NGS y de Sanger, se identificaron dos variantes de PVX en los cultivos de papa de Antioquia, asociados a los subgrupos I-1 y I-2 del clado I de esta especie viral. Estas variantes pueden ser fácilmente identificadas con base en pruebas de RT-qPCR con los primers específicos PVX_101-2_FP y PVX_101-2 y análisis de las temperaturas de fusión (T_m).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia a través de la Convocatoria: Nuevos proyectos de investigación, creación o innovación (proyecto 19438) y por International Foundation for Science (IFS) de Suecia (Proyecto C/4634-2).

REFERENCIAS

- Abbas MF, Hameed S, Rauf A, Nosheen Q, Ghani A, Qadir A, *et al.* Incidence of six viruses in potato growing areas of Pakistan. *Pak J Phytopathol.* 2012;24(1):44-47.
- Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E., Navalinskiene, *et al.* Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol Plant Pathol.* 2009;10(4):537-545. Doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x
- Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2007;142(1-2):1-9. Doi:10.1016/j.jviromet.2006.12.012
- Bai YJ, Wen JZ, Yang MX, Yu DC, Gao YL, Fan GQ, *et al.* Comparison of incidence of major potato viruses in southwest and northeast potato-producing regions in China. *J Northeast Agri Uni.* 2007;38:733-736.
- Cox A, Jones R. Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus X* and the current relationship between phylogenetic placement and resistance groupings. *Arch Virol.* 2010;155(8):1349-1356. Doi:10.1007/s00705-010-0711-3

- Esfandiari N, Kohi-Habibi M, Hohn T, Pooggin MM. Complete genome sequence of an Iranian isolate of *Potato virus X* from the legume plant *Pisum sativum*. *Virus Genes*. 2009;39(1):141-145. Doi:10.1007/s11262-009-0371-0
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39(4):783-791. Doi:10.2307/2408678
- Frost K, Groves RL, Charkowski AO. Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision of clean seed potatoes. *Plant Dis*. 2013;97(10):1268-1280. Doi:10.1094/PDIS-05-13-0477-FE
- García-Ruiz D, Mesa-Medina M, Mauricio Mesa-Medina, González-Ramírez M, Gutiérrez-Sánchez P, Marín-Montoya M. Detección del *Potato virus X* y del *Potato leafroll virus* en tubérculos de papa en Antioquia mediante pruebas de ELISA y PCR con transcripción inversa cuantitativa. *Biomédica*. 2015;35(S1):139.
- Gil JF, Cotes JM, Marín M. Detección y caracterización molecular del Virus X de la Papa (PVX) en regiones productoras de papa de Colombia. *Rev Protección Veg*. 2012;27(2):69-76.
- Gish W, States DJ. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet*. 1993;3:266-272. Doi:10.1038/ng0393-266
- Guerrero O, Martínez G. Evaluación de pérdidas ocasionadas en la variedad de papa Puracé por los virus *Potato virus X*, *Potato virus Y* y *Potato leafroll virus*. *Fitopatol Colomb*. 1980;9(1):3-40.
- Gutiérrez PA, Alzate JF, Marín M. Complete genome sequence of a novel *Potato virus S* strain infecting *Solanum phureja* in Colombia. *Arch Virol*. 2013;158(10):2205-2208. Doi:10.1007/s00705-013-1730-7
- Gutiérrez PA, Alzate JF, Marín M. Genome sequence of a virus isolate from tamarillo (*Solanum betaceum*) in Colombia: evidence for a new potyvirus. *Arch Virol*. 2014a;160(2):557-560. Doi:10.1007/s00705-014-2296-8
- Gutiérrez PA, Alzate JF, Marín M. Caracterización del viroma de ARN de tejido radical de *solanum phureja* mediante pirosecuenciación 454 GS-FLX. *Bioagro*. 2014b;26(2):89-98.
- Gutiérrez PA, Alzate JF, Marín M. Complete genome sequence of an isolate of *Potato virus X* (PVX) infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Virus Genes*. 2015;50(3):518-522. Doi:10.1007/s11262-015-1181-1
- Guzmán M, Román V, Franco L, Rodríguez P. Presencia de cuatro virus en algunas accesiones de la Colección Central Colombiana de papa mantenida en campo. *Agron Colomb*. 2010;28(2):225-233.
- Halterman D, Charkowski A, Verchot J. Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Tech*. 2012;6(1):1-14.
- Huang P, Yan Q, Din GY. Occurrence and control of *Potato virus S* in Guizhou. *Guizhou Nong Ye Ke Xue*. 2009;37:88-89.
- Huisman M, Linthorst H, Bol J, Cornelissen B. The Complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologues at the amino acid level with various Plus-stranded RNA Viruses. *J Gen Virol*. 1988;69:1789-1798.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, *et al*. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucl Acids Res*. 2005;33(e56):1-12. Doi:10.1093/nar/gni054
- Kerlan C. Potato viruses. In: Mahy BW, van Regenmortel MH, editors. *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Oxford: Academic Press; 2008. p. 458-471.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012. 1327 p.
- Kreuzer JF, Perez A, Untiveros M, Quispe D, Fuentes S, Barker I, *et al*. 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*. 2009;388(1):1-7. Doi:10.1016/j.virol.2009.03.024
- Kreuzer J, Koenig R, De Souza J, Vetten HJ, Muller G, Flores B, *et al*. The complete genome sequences of a Peruvian and a Colombian isolate of *Andean potato latent virus* and partial sequences of further isolates suggest the existence of two distinct potato-infecting tymovirus species. *Virus Res*. 2013;173(2):431-435. Doi:10.1016/j.virusres.2013.01.014
- Kutnjak D, Silvestre R, Cuellar W, Pérez W, Müller G, Ravnikar M, *et al*. Complete genome sequences of new divergent *Potato virus X* isolates and discrimination between strains in a mixed infection using small RNAs sequencing approach. *Virus Res*. 2014;191(1):45-50. Doi:10.1016/j.virusres.2013.01.014
- Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9:357-359. Doi:10.1038/nmeth.1923
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, *et al*. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012;1-12. Doi:10.1155/2012/251364
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-2948.
- Malcuit I, de Jong W, Baulcombe DC, Shields DC, Kavanagh TA. Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by *Potato virus X* (PVX) has occurred through convergent evolution rather than through recombination. *Virus Genes*. 2000;20:165-172.
- Mandal B, Kumar A, Rani P, Kumar R. Complete genome sequence, phylogenetic relationships and molecular

- diagnosis of an Indian isolate of *Potato virus X*. J Phytopathol. 2012;160(1):1-5. Doi:10.1111/j.1439-0434.2011.01848.x
- Morozov S, Lukasheva L, Chernov B, Skryabin K, Atabekov J. Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in the *Potato virus X* genome. FEBS Lett. 1987;213(2):438-442.
- Nie X, Singh RP. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. J Virol Methods. 2001;91(1):37-49.
- Nie X, Singh M. Response of potato, tobacco and *Physalis floridana* plants to mixed infection with PVX, PVY^{NTN} and PVY^o strains. Can J Plant Pathol. 2013;35(3):390-401. Doi:10.1080/07060661.2013.812581
- Njukeng PA, Chewachong GM, Sakwe P, Chofong G, Nkeabeng LW, Demo P, *et al.* Prevalence of six viruses in potato seed tubers produced in informal seed system in the North West region of Cameroon. Cam J Exp Biol. 2013;9(1):44-49. Doi:10.4314/cajeb.v9i1.6
- Roossinck MJ, Martin DP, Roumagnac P. Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. Phytopathology. 2015;105(6):716-727. Doi:10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW
- Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. Eur J Plant Pathol. 2004;110(9):893-908. Doi:10.1007/s10658-004-4842-9
- Sonenberg N, Shatkin AJ, Riccardi RP, Rubin M, Goodman RM. Analysis of terminal structures of RNA from *Potato virus X*. Nucleic Acids Res. 1978;5(7):2501-2521.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725-2729. Doi:10.1093/molbev/mst197
- Vásquez V, Montero-Astúa M, Rivera C. Incidencia y distribución altitudinal de 13 virus en cultivos de *Solanum tuberosum* (*Solanaceae*) en Costa Rica. Rev Biol Trop. 2006;54:1135-1141.
- Verchot-Lubicz J, Ye CM, Bamunusinghe D. Molecular biology of potexviruses: recent advances. J Gen Virol. 2007;88(6):1643-1655. Doi:10.1099/vir.0.82667-0
- Villamil-Garzón A, Cuellar WJ, Guzmán-Barney M. Natural co-infection of *Solanum tuberosum* crops by the *Potato yellow vein virus* and potyvirus in Colombia. Agron Colomb. 2014;32(2):213-223.
- Wang XW. Effect of infection status of *Potato virus Y* and *Potato virus X* on tuber yield of potato. Annual Reports, China's Potato Association. 1999:285-289.
- Wang B, Ma Y, Zhang Z, Wu Z, Wu Y, Wang Q, *et al.* Potato viruses in China. Crop Prot. 2011;30(9):1117-1123. Doi:10.1016/j.cropro.2011.04.001
- Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Dunez J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. J Virol Methods. 1992;39:27-37.
- Wu Q, Ding S, Zhang Y, Zhu S. Identification of viruses and viroids by Next-Generation Sequencing and homology dependent and homology independent algorithms. Annu Rev Phytopathol. 2015;53:1-20. Doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120030
- Yu XQ, Wang HY, Lan YF, Zhu XP, Li X, Fan ZF, *et al.* Complete genome sequence of a Chinese isolate of *Potato virus X* and analysis of genetic diversity. J Phytopathol. 2008;156:346-351. Doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01365.x