

Prevalencia de cinco virus de ARN en tubérculos-semilla de papa cultivados en Antioquia (Colombia)*

Prevalence of five RNA viruses in potato seed-tubers grown in Antioquia (Colombia)

Prevalência de cinco vírus de ARN em tubérculos-semente de batata cultivados em Antioquia (Colombia)

GALLO-GARCÍA, YULIANA¹; SIERRA-MEJIA, ANDREA ²; GUTIÉRREZ,
PABLO-ANDRÉS³; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO⁴

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 20 de Febrero 2020.

Aprobado para publicación: 20 de Octubre 2020

* Título de los proyecto de origen: "Caracterización genómica de virus de RNA que infectan *Solanum tuberosum* en Antioquia utilizando secuenciación de nueva generación (NGS)". Financiación: Dirección de Investigación e Innovación - Universidad CES. Culminación: 28 de Agosto de 2019. Caracterización molecular del viroma de plantas solanáceas de importancia económica en Antioquia. Financiación: Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL). Culminación: 1 de Marzo de 2019.

- 1 Universidad CES, Facultad de Medicina, Grupo de investigación de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias. PhD en Biotecnología. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-6018-453X>
- 2 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Grupo de investigación de Biotecnología Microbiana. Ingeniera Biológica. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0893-5882>
- 3 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Grupo de investigación de Biotecnología Microbiana: PhD en Bioquímica. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7003-6485>
- 4 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Grupo de investigación de Biotecnología Vegetal. PhD en Fitopatología. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7123-2747>

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los productos agrícolas con mayor demanda interna en Colombia. Este cultivo es afectado por un complejo de virus que reduce los rendimientos y la calidad de los tubérculos-semilla. En este trabajo se evaluó la prevalencia de cinco virus de ARN (PVY, PVS, PVX, PLRV y PVV) en brotes de tubérculos-semilla de origen comercial (TC) y no-comercial (TNC) y en sus plantas derivadas, utilizando RT-PCR en tiempo real. Los resultados evidenciaron altos niveles de infección de los cinco virus en el material de siembra e infecciones mixtas hasta con cuatro virus en los tubérculos comerciales. PVY (74%) y PVS (36%) presentaron los mayores niveles de prevalencia en plantas derivadas de tubérculos-semilla. La combinación PVY+PLRV presentó el mayor nivel de prevalencia en tubérculos-semilla TC (24%), mientras que en TNC las combinaciones PVY+PVV+PVS y PVY+PVS+PLRV se presentaron en 10% de las muestras. La afinidad filogenética de los virus detectados se evaluó mediante secuenciación Sanger de amplicones de cápside, agrupándose en subclados previamente identificados sobre solanáceas en Colombia. Estos resultados señalan la necesidad de tomar acciones urgentes que permitan mejorar los niveles de sanidad viral de los materiales de siembra de papa cultivados en el país.

ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the agricultural products with highest internal demand in Colombia. However, this crop is affected by a virus complex that have a dramatic effect in yields and on the quality of tuber-seeds. In this work we tested the prevalence of five RNA viruses (PVY, PVS, PVX, PLRV and PVV) in tuber-seed sprouts and their corresponding plantlets using real-time RT-PCR. Tuber-seeds were obtained from commercial (TC) and informal seed (TNC) distributors. Our results suggest high levels of infection with all five viruses in seed potatoes. Mixed infections, with up to four different viruses, were found with high frequency in certified or registered seed tubers. PVY (74%) and PVS (36%) were the most prevalent viruses using leaf tissues. The combination PVY+PLRV (24%) was the most common mixed infection in commercial tuber-seeds. In non-commercial seeds the most prevalent mixed infections were PVY+PVV+PVS and PVY+PVS+PLRV at 10%. The phylogenetic affinity of all viruses under study was determined by partial sequencing of their CP genes, which confirmed their close relationship with previously characterized Colombian strains. These results underscore the urgent need to improve the health status in potato seed-tubers used by farmers in Colombia.

Correspondencia: ygallo@ces.edu.co

Cómo citar este artículo: Gallo-García, Yuliana; Sierra-Mejía, Andrea; Gutiérrez, Pablo-Andrés; Marín-Montoya, Mauricio. Prevalencia de cinco virus de ARN en tubérculos-semilla de papa cultivados en Antioquia (Colombia). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 19, n. 1, 2021, p. xx-xx. Doi:

PALABRAS CLAVES:

RT-qPCR; Secuenciación; Solanaceae; Virología vegetal; Virus de la papa.

KEYWORDS:

RT-qPCR; Sequencing; Solanaceae; Plant virology; Potato viruses.

PALAVRAS-CHAVE:

RT-qPCR; Sequenciamento; Solanaceae; Vírus da batata; Virologia vegetal.

RESUMO

A batata (*Solanum tuberosum*) é um dos produtos agrícolas com maior demanda interna na Colômbia. Este cultivo é afetado por um complexo de vírus que reduzem os rendimentos e a qualidade dos tubérculos-semente. Neste trabalho foi avaliada a prevalência de cinco vírus de ARN (PVY, PVS, PVX, PLRV y PYVV) em brotos de tubérculos-semente de origem comercial (TC) e não comercial (TNC) e em plantas derivadas desses brotos, usando RT-PCR em tempo real. Os resultados evidenciaram altos níveis de infecção dos cinco vírus no material de semeadura e infecções mistas com até quatro vírus nos tubérculos comerciais. PVY (74%) e PVS (36%) apresentaram os maiores níveis de prevalência em plantas derivadas de tubérculos-semente. A combinação PVY+PLRV apresentou o maior nível de prevalência em tubérculos-semente TC (24%), enquanto em TCN as combinações PVY+PYVV+PVS e PVY+PVS+PLRV foram detectadas em 10% das amostras. A afinidade filogenética dos vírus detectados foi avaliada por sequenciamento Sanger de amplicons da cápside, agrupando-se em subclados previamente identificados sobre solanáceas na Colômbia. Estes resultados indicam a necessidade de tomar ações urgentes para melhorar os níveis de sanidade viral dos materiais de semeadura de batata no país.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los más importantes en el mundo. Para el año 2018, en Colombia se reportó un área de siembra de papa de 132.161 ha con un rendimiento promedio de 20,8 t/ha [1], que al compararse con el Reino Unido (país que cuenta con un área similar de siembra), corresponde a tan sólo un 48% de la producción alcanzada en dicho país. Estas diferencias resultan de múltiples aspectos agronómicos, agroambientales y socioeconómicos; pero sin duda, un factor diferenciador es el uso de semilla certificada, que para países desarrollados supera el 90%, mientras que, en economías emergentes como Colombia, tan solo se reporta su uso en niveles de entre 0,5 y 10% [2]. Uno de los objetivos principales de los programas de certificación de semilla es limitar la incidencia de patógenos (ej. bacterias, hongos, virus y viroides) en niveles inferiores al umbral de daño económico. Sin embargo, en cultivos como la papa que se propagan en forma vegetativa a través de tubérculos, la situación es compleja, dado el proceso de degeneración de la semilla a lo largo de ciclos sucesivos de propagación asexual [3]. El uso masivo de tubérculos-semilla certificados ha representado para los países de Europa occidental y América del norte el aumento en los rendimientos de este cultivo en niveles del 70 al 100% [2]. En el caso de Colombia, el uso de semilla certificada para el año 2015 alcanzó sólo el 5% a nivel nacional y su producción está concentrada en unas pocas variedades. La mayor parte de los agricultores de papa desconocen las ventajas técnicas y económicas de la adopción de la semilla certificada y su alto costo en comparación con la semilla tradicional es un factor que limita su acceso a pequeños productores. Sin embargo, la cadena productiva de la papa se ha planteado como uno de los objetivos para el futuro próximo, alcanzar un índice de uso de semilla certificada del 20% en todo el país [4].

Entre los principales agentes causales de la degeneración del tubérculo-semilla de papa se destacan los nematodos (ej. *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp.), bacterias (ej. *Ralstonia solanacearum* y *Streptomyces scabies*), hongos y oomicetes (ej. *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*), polillas (ej. *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella*) y diferentes virus, siendo reportados para este último caso, alrededor de 40 especies en el mundo. En la actualidad, los virus que presentan mayor importancia económica para el cultivo de la papa incluyen: potato leafroll virus (PLRV), potato virus A (PVA), potato virus S (PVS), potato virus X (PVX) y potato virus Y (PVY) [5]. En Colombia se han registrado como los virus de mayor importancia: PVY, PVS, PVX, PLRV, potato yellow vein virus (PYVV) y potato mop-top virus (PMTV) [6,7,8,9,10]. Adicionalmente, es frecuente el reporte de infecciones mixtas entre PVY, PVS, PLRV y PYVV [10]. Así, por ejemplo, en trabajos realizados sobre brotes de tubérculos-semilla var. Diacol Capira empleando la técnica RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) se encontraron niveles de infección viral del 100%, 93,75% y 83,3% para PVY, PVX y PLRV, respectivamente [7,11].

Con el fin de evaluar los niveles de infección de los virus PVY, PVS, PVX, PYVV y PLRV y sus posibles infecciones mixtas en tubérculos-semilla de papa var. Diacol Capira, en el presente estudio se evaluaron mediante RT-qPCR,

siete lotes semilla certificada o registrada (TC) comercializadas en el oriente Antioqueño y siete lotes de semilla no comercial (TNC) obtenidos por agricultores en sus fincas o en mercados locales; la afinidad filogenética de las cepas de los virus detectados fue también determinada a partir de secuencias Sanger de la cápside viral.

MÉTODO

Muestras

Las muestras de tubérculos-semilla de papa var. Diacol Capira fueron colectadas en los municipios del Oriente Antioqueño (Antioquia, Colombia): La Ceja (2200 msnm, humedad relativa 98%, 16°C, 6°01'40"N 75°25'52"O), La Unión (2500 msnm, humedad relativa 98%, 14,5°C, 5°58'22"N 75°21'40"O), Santuario (2150 msnm, humedad relativa 97%, 15,9°C, 6°08'15"N 75°15'50"O) y Marinilla (2120 msnm, humedad relativa 98%, 16,4°C, 6°10'28"N 75°20'20"O), y correspondieron a siete lotes de semilla comercial (certificada o registrada) (TC) en estado de brotación y siete lotes de semilla no comerciales (TNC) (obtenidos por agricultores en sus fincas o en mercados locales). Cada muestra consistió en tres tubérculos obtenidos al azar del respectivo lote de semillas, para un total de 42 muestras analizadas. Una vez en el laboratorio, se obtuvieron 100 mg de brotes para la extracción de ácidos nucleicos y los mismos tres tubérculos fueron sembrados individualmente en bolsas con aproximadamente un (1) kg de suelo y mantenidos bajo condiciones de casa malla antiáfidos por cuatro semanas, para proceder a la extracción de sus ácidos nucleicos, pero en este caso a partir de tejido foliar.

Detección de virus por RT-qPCR

A cada una de las 42 muestras de brotes de tubérculos-semilla y el respectivo tejido foliar de las plantas mantenidas en casa malla, se les realizó la extracción del ARN total utilizando el método del Trizol (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) a partir de 100 mg de tejido, previa maceración con nitrógeno líquido y eluido en 40 µL de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC). Su concentración y pureza se evaluó con lecturas a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo-Fisher Scientific). La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó en un volumen de 20 µL a 42°C por 1 h a partir de 200 U de la enzima RevertAid Reverso Transcriptasa (RT) (Thermo-Fisher Scientific), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de RiboLock inhibidor de ARNasas, 100 ng de ARN total y 100 pmol de cada primer reverso, que para el caso de PVY, PVS y PVX correspondió al Oligo-(dT)18; mientras que para PYVV se usó el primer qPYVV_R_CP (5' AGG TCT CAG GAT CTG GAT CAA CT 3') [12] y para PLRV el primer PLRV-R (5' GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT 3') [13]. En 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 primers específicos PVY-1_FP (5' CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA C 3') y PVY-1_RP (5' ATA TAC GCT TCT GCA ACA TCT GAG A 3') [14], PVS_gen_F (5' ATG CCG CCY AAA CCA GAT CC 3') y qPVS_gen_R (5' AGC ATK GCT TCY TCA TTT TGC CCT G 3') [15], 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') [16], PYVV_F_CP (5' TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG 3') y qPYVV_R_CP [14] y PLRV-Sense (5' GCT CAA GCG AGA CAT TCG TG 3') y PLRV-Antisense (5' TTG AAT GCC GGA CAG TCT GA 3') [17]. El programa de amplificación consistió de un paso de activación de la enzima a 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s y 52°C por 45 s, en un equipo Rotor-Gene Q-5plex (Qiagen, Alemania). Una vez finalizado el programa, se obtuvieron los valores de ciclo umbral (Ct) y temperatura de fusión (Tm) en el rango 50-99°C, utilizando el software del equipo. En todas las reacciones se incluyó un control positivo procedente de tejidos foliares infectados con cada virus evaluado y un control negativo derivado de tejidos foliares libres de virus.

Identificación de virus por RT-PCR convencional y secuenciación Sanger

Se realizó la amplificación de la región codificante de la cápside (CP) de al menos tres cepas de cada virus por RT-PCR convencional y secuenciación Sanger, utilizando los primers: PVY-F (5' ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC 3')

y PVY-R (5' TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT 3') [18], PVS_gen_F y PVS_gen_R (5' ACC TTC ART ATG ACK CCA AGC AAC ATG C 3') [15], PVXF (5' TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG 3') y PVXR (5' GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC 3') [18], PYVV_F_CP y PYVV_R_CP (5' AGT TGC TGC ATT CTT GAA CAG G 3') [12] y PLRV-F (5' CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC 3') y PLRV-R (5' GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT 3') [13]. Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µL con 1X de buffer de enzima (10X), 0,2 mM de cada dNTP, 1,8 mM de MgCl₂, 1 U de Taq ADN polimerasa (Thermo-Fisher Scientific), 0,2 µM de los primers y 1 µL de ADNc, el cual fue obtenido como se describió anteriormente. El programa consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones del tamaño esperado para PVY (480 pb), PVS (421 pb), PVX (562 pb), PYVV (495pb) y PLRV (330 pb) fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,7%, suplementado con GelRed 1X (Biotium, EEUU) y visualizados en un equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EEUU). Las bandas fueron purificadas directamente del gel utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo-Fisher Scientific) y secuenciadas en un equipo ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen (Corea del Sur). A partir de las secuencias obtenidas se generaron los consensos para la región CP y su posterior alineamiento con el programa MUSCLE [19] "type": "article-journal", "volume": "32", "uris": ["http://www.mendeley.com/documents/?uuid=9b77ccf1-aca7-4240-b826-60bc0fac8720"], "mendeley": {"formattedCitation": "[20]", "plainTextFormattedCitation": "[20]", "previouslyFormattedCitation": "[20]", "properties": {"noteIndex": 0}, "schema": "https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json"} con respecto a secuencias disponibles en GenBank de cepas previamente reportadas en Colombia y en otros países. Finalmente, dichos alineamientos fueron utilizados para generar matrices de identidad a nivel de nucleótidos y los análisis filogenéticos utilizando el método de Máxima verosimilitud con el modelo de sustitución T92+I con 1000 réplicas de *bootstrap* empleando el software MEGA7 [20].

Análisis estadístico

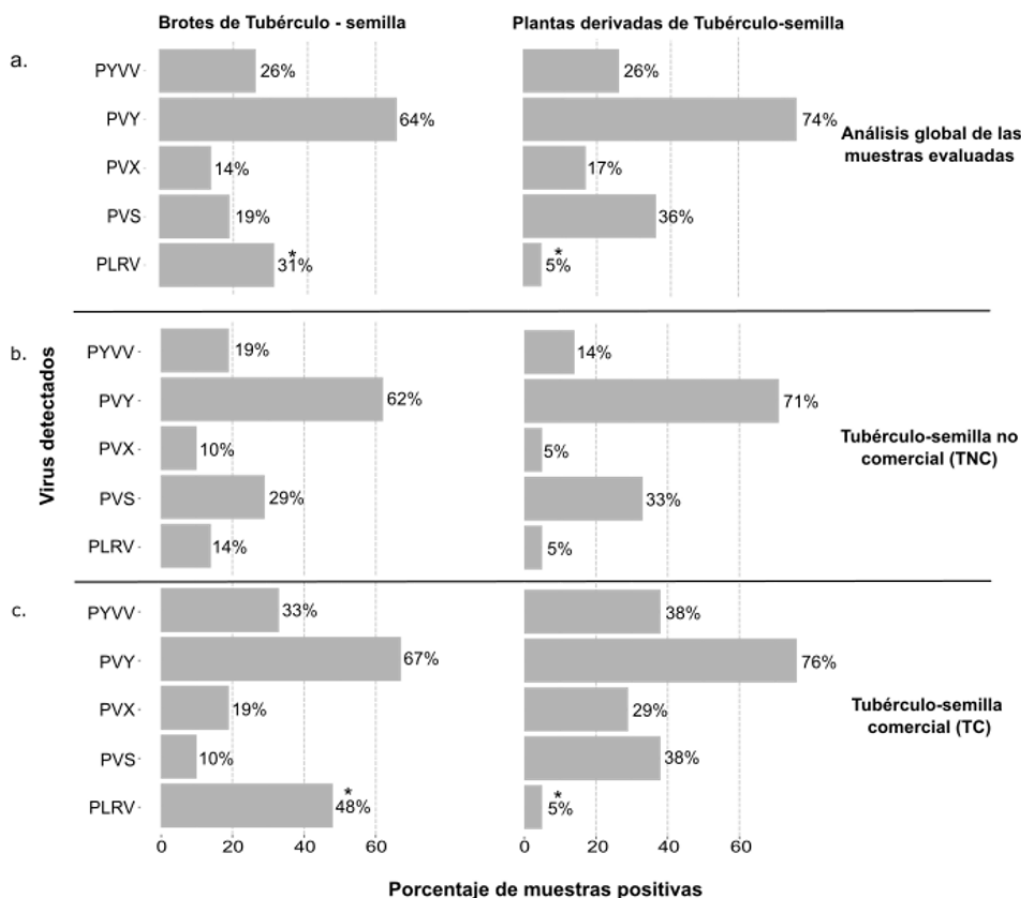
Para el experimento de detección de virus en tubérculos y en las plantas derivadas de éstos, se analizaron los datos a partir de una prueba de ANOVA con un nivel de significancia de $p=0,05$ utilizando la prueba Friedman, con el fin de detectar diferencias significativas para la detección de cada virus entre tubérculos-semilla y las plantas bajo condiciones de casa malla y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (nivel de significancia de $p<0,05$) para las comparaciones entre tubérculos-semilla comerciales y tubérculos-semilla no comerciales. Estos análisis se realizaron con el programa RStudio versión 3.6.3.

RESULTADOS

Detección de virus por RT-qPCR

De manera global, los virus PVY y PLRV fueron los de mayor prevalencia en los tubérculos-semilla evaluados, con niveles de 64% y 31% respectivamente; seguidos de PYVV (26%), PVS (19%) y PVX (14%) (Figura 1a). Estos resultados de infección viral en material de siembra de papa en Colombia se suman a los reportados por García *et al.* (2016) [7] y Mesa *et al.* (2016) [11], quienes encontraron para PVY una prevalencia del 100%, para PVX del 93,75% y para PLRV del 83,3%, y resultan muy preocupantes para la agroindustria de producción de papa en Colombia. Al realizar nuevamente la evaluación sobre las plantas derivadas de dichos tubérculos, los porcentajes de detección aumentaron en un 10% para PVY (74%), 17% para PVS (36%) y 3% para PVX (17%), mientras que para PYVV no se evidenció ningún incremento en la detección. Sin embargo, los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre ambos tipos de evaluaciones (brotes de tubérculos-semilla y tejido foliar de plantas) ($p=0,73$, $p=0,17$, $p=1$ y $p=0,8$, respectivamente). Una situación contraria se encontró para la detección del PLRV, pues en los brotes del tubérculo-semilla se detectó en el 31% de las muestras, mientras que en el tejido foliar de las plantas derivadas tan sólo se encontró en el 5% de éstas, lo que resultó en el hallazgo de diferencia estadística significativa ($p=0,004$) entre ambos tipos de muestras (Figura 1.b,c).

Figura 1. Porcentaje (%) de muestras de brotes y plantas de papa derivadas de tubérculos-semilla comerciales (TC) y no comerciales (TNC) que resultaron positivas para los virus PLRV, PVS, PVX, PVY y PVV por RT-qPCR. * Diferencia estadísticamente significativa empleando la prueba de Friedman.



Al compararse los niveles de prevalencia de cuatro de los cinco virus entre las muestras TC y TNC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas procedencias del material de siembra. Así, PVY se detectó con un nivel de infección de 67% (TC) y 62% (TNC) ($p=0,728$); PVS en 10% (TC) y 29% (TNC) ($p=0,147$); PVX en 19% (TC) y 10% (TNC) ($p=0,341$) y PYVV 33% (TC) y 19% (TNC) ($p=0,482$). Sin embargo, se observaron altos niveles de prevalencia de los virus en el material de siembra TC respecto a los TNC, lo que puede estar asociado a la selección positiva que hacen los agricultores sobre sus lotes y a problemas con la detección de los virus durante el esquema de certificación de semilla [21].

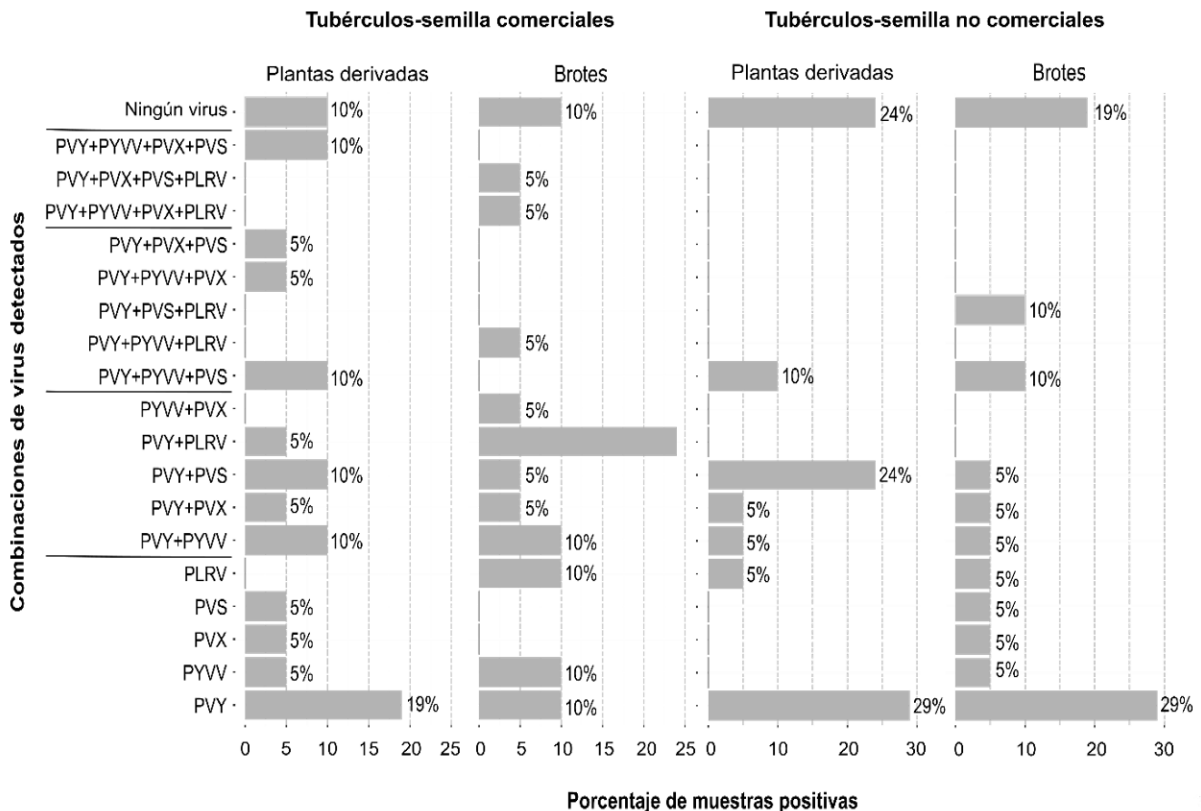
Por su parte, los niveles de infección detectados entre dichos materiales para el virus PLRV mostraron diferencia estadística significativa ($p=0,01$), con valores de 48% (TC) y 14% (TNC) y al compararse la detección en sus plantas derivadas, nuevamente ésta disminuyó a niveles del 5% para TC y TNC (Figura 1b, c). Este resultado en particular puede deberse al hecho que el PLRV es un virus limitado al floema de las plantas, por lo que su título en tejido foliar puede ser muy bajo, dificultándose su detección en el mesófilo [22], e indica la necesidad de realizar su detección en plantas directamente sobre haces vasculares como en peciolo y tallos y preferiblemente en brotes de tubérculos, cuando el objetivo de la evaluación sea la certificación del material de siembra de papa.

Los análisis realizados para los valores de Ct de las pruebas de RT-qPCR, señalaron variaciones menores para este parámetro entre los virus detectados, tanto sobre los brotes de los tubérculos como en sus plantas deri-

vadas. El virus encontrado en mayor título viral (menor Ct) fue el PVY, con un Ct promedio de 25,84 (SD=6,45) para los brotes de tubérculos, y de 27,8 (SD=8,03) para el tejido foliar de sus plantas derivadas; mientras que para PVS, PYVV, PVX y PLRV éstos valores fueron de 26,06 (SD=6,73) y 31 (SD=7,9); 31,63 (SD=5,3) y 30,71 (SD=4,78); 32,46 (SD=3,92) y 32,51 (SD= 5,74); y 33,3 (SD=3,21) y 35 (SD=0), respectivamente. La naturaleza viral de los amplicones obtenidos mediante RT-qPCR fue confirmada mediante análisis de las curvas de fusión empleando la herramienta HRM (*High Resolution Melting*). La comparación de dichos valores con respecto al rango de temperaturas reportadas en Colombia para cada virus, correspondió a los valores esperados; así, para PVY se encontraron valores de $T_m=77,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$ ($77,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, [9]); para PVS de $87,5 \pm 1^\circ\text{C}$ ($T_m= 86,96 \pm 1^\circ\text{C}$; [9]); mientras que para PVX se presentaron dos valores de T_m ($80,5 \pm 1^\circ\text{C}$ y $83,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$) correspondientes a dos variantes registradas para este virus ($T_m= 79,5 \pm 1^\circ\text{C}$ y $T_m= 83,7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; [8]). Finalmente, para PYVV el T_m fue de $77,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ ($T_m=77,28 \pm 0,6^\circ\text{C}$; [9]) y para PLRV el valor promedio de T_m fue de $80 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ($T_m= 81,8^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$ [9]). Por otra parte, todos los controles positivos empleados en el estudio resultaron en amplificaciones efectivas con valores de Ct inferiores a 30 y T_m correspondientes a los rangos indicados; mientras que en los controles negativos no se detectó amplificación para ninguno de los virus.

Un aspecto que llama la atención de los resultados obtenidos es la ocurrencia de infecciones mixtas en los tubérculos-semilla evaluados y en sus plantas derivadas (Figura 2). Para brotes de tubérculos (TC), la combinación de PVY+PLRV presentó el mayor nivel de detección con un valor de 24%, mientras que la infección mixta PVY+PYVV se encontró en el 10% de las muestras y PVY+PVX, PVY+PVS, PYVV+PVX, PVY+PYVV+PLRV, PVY+PYVV+PVX+PLRV, PVY+PVX+PVS+PLRV en el 5% de éstas. Para el caso de las plantas derivadas de dichos tubérculos-semilla (TC), se encontraron en el 10% de las plantas las infecciones mixtas: PVY+PYVV, PVY+PVS, PVY+PYVV+PVS y PVY+PYVV+PVX+PVS; mientras que las combinaciones PVY+PVX, PVY+PLRV, PVY+PYV-

Figura 2. Porcentaje (%) de muestras de papa con infecciones únicas y mixtas de virus en brotes y plantas derivadas de tubérculos-semilla comerciales (TC) y no comerciales (TNC), utilizando la prueba de RT-qPCR.



V+PVX y PVY+PVX+PVS se detectaron en el 5% de éstas. Finalmente, en el 10% de las muestras para los tubérculos-semilla comerciales y sus plantas derivadas no se detectó ninguno de los virus evaluados en este estudio. Para el caso de los tubérculos-semilla (TNC), las muestras infectadas con los virus PVY+PYVV+PVS alcanzaron un porcentaje de detección del 10% y en un 5% lo fueron para las combinaciones PVY+PVX y PVY+PYVV. Interesantemente, la detección de PVY+PVS en estas muestras (TNC), arrojó un valor del 5% en tubérculos-semilla y del 24% en sus plantas derivadas. Por último, en el 19% de los tubérculos-semilla y en el 24% de sus plantas derivadas no se encontró ninguno de los virus bajo estudio (Figura 2).

Estos resultados evidencian que la sanidad viral de los materiales de siembra comercializados como certificados o registrados en el oriente Antioqueño superan dramáticamente los umbrales de detección permitidos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), entidad regulatoria en Colombia, mediante la Resolución 3168 de 2015; aunque en dicha normativa se utiliza la observación visual de síntomas y en algunos casos la prueba de ELISA como referentes de evaluación. Sin embargo, es importante señalar que diversos estudios han demostrado que la sensibilidad de la técnica de RT-qPCR para la detección de virus en plantas puede representar con respecto a pruebas de ELISA, niveles de detección superiores en el rango de 10.000 a 100.000.000 veces [5,22], por lo que resultaría deseable que este organismo de sanidad vegetal incluya la utilización de pruebas moleculares en su normatividad para certificación de semilla por su sanidad viral [23].

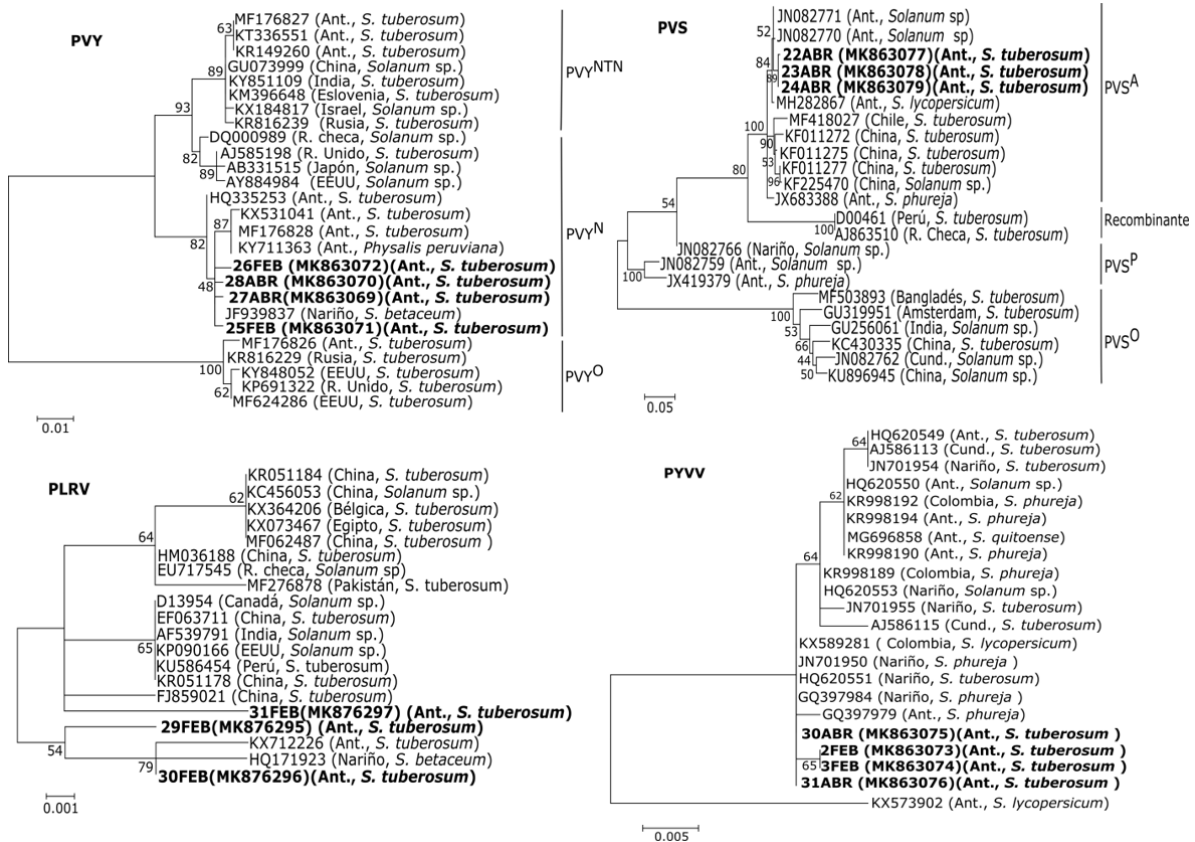
Los niveles de infección viral encontrados en material de siembra de papa, sugieren que este factor es uno de los que más incide en los bajos rendimientos obtenidos en Colombia para este cultivo (20,8 t/ha) [24]; pues se ha reportado que tubérculos infectados con PVY pueden conducir a reducciones en los rendimientos de papa del 20 al 50%, mientras que PVX puede ocasionar pérdidas del 10 al 50% y PVS de entre 10 y 20%. Para el caso de las infecciones mixtas de PVS+PVX, PVY+PVX y PVY+PLRV las pérdidas pueden incluso llegar hasta el 90% [9,25]. Es de resaltar que, al compararse los niveles de infección entre la semilla comercial y no comercial, ésta última presentó menos combinaciones de especies virales y en algunos casos menores niveles de infección, lo que nuevamente indica graves problemas con la producción de semilla certificada en el país y también sugiere un posible efecto de la selección positiva realizada por los agricultores que obtienen su propia semilla. Este proceso consiste en identificar plantas o lotes asintomáticos con excelentes características fenotípicas, para su utilización como material de siembra en el siguiente ciclo de cultivo [26].

Los resultados obtenidos en este estudio deben llamar la atención de los organismos de sanidad vegetal del país, productores de papa, semilleros y agricultores para que tomen acciones inmediatas que ayuden a mejorar los niveles de sanidad viral de los materiales de siembra certificado, incluyendo aspectos claves como la evaluación del material *in vitro* y de los minitubérculos que son empleados en las primeras etapas del proceso de certificación, utilizando pruebas altamente sensibles como la RT-qPCR empleada en este estudio, aumentar el seguimiento y apoyo técnico por parte del ICA a los lotes destinados para la producción de semilla en las fases de campo, promover las prácticas de selección positiva en cultivos de papa y eliminar tempranamente focos de plantas con síntomas de infecciones virales, no sólo en lotes destinados a la producción de semilla, sino para la producción comercial de tubérculos.

Identificación de virus por secuenciación Sanger

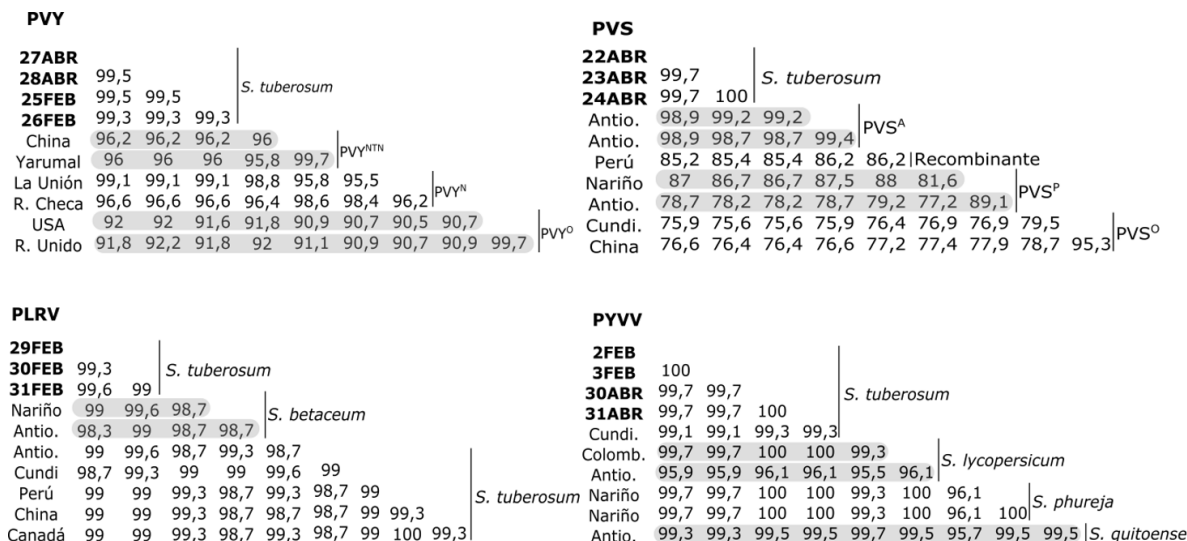
Adicionalmente a la detección de virus realizada utilizando RT-qPCR, se obtuvieron al menos tres amplicones de CP para los virus PVY (480 pb), PVS (421 pb), PYVV (495pb) y PLRV (330 pb) mediante RT-PCR convencional. Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank y los números de acceso se presentan en la Figura 3 Para el caso de PVX, del cual se esperaba un amplicon de 562 pb, no fue posible su obtención aún después de múltiples modificaciones del procedimiento de RT-PCR, lo que sugiere la necesidad de diseñar nuevos primers específicos, con base en los genomas de las cepas de este virus reportadas en GenBank para Colombia y otros países andinos.

Figura 3. Árboles filogenéticos generados a partir de las secuencias de la cápside viral de PVY, PVS, PLRV y PYVV procedentes de plantas derivadas de tubérculos-semilla del oriente antioqueño.



Las secuencias resultantes fueron empleadas para realizar análisis de identidad genética con respecto a secuencias disponibles en GenBank de cepas previamente reportadas en Colombia y en otros países (Figura 4). Para el virus PVY, se encontraron muy pocas variaciones entre las cuatro secuencias obtenidas (>99,3%) y se observó una alta afinidad filogenética con cepas de la raza PVY^N (raza necrosante), compartiendo niveles de identidad de entre 96 y 99%, especialmente con aquellas previamente reportadas por Riascos *et al.* (2018) [6] y Álvarez *et al.* (2018) [27] en el departamento de Antioquia (Figura 4) en *S. tuberosum* y *P. peruviana*, respectivamente. PVY es considerado uno de los virus responsables de la degeneración de los tubérculos-semilla ocasionando reducciones en los rendimientos entre el 29 y 85% [2]. Con referencia al virus PVS, se encontraron niveles de identidad de 98,7 a 99,4% con respecto a aislamientos de PVS^A y en el análisis filogenético éstas se agruparon con un valor de *bootstrap* del 100%, en el clado correspondiente al linaje Andino en conjunto con cepas infectando papa criolla (*S. phureja*) y tomate (*S. lycopersicum*). Por su parte, el árbol filogenético obtenido para PLRV agrupó las secuencias en un subclado conformado por cepas de este virus previamente registradas en los departamentos de Antioquia y Nariño y obtenidas tanto sobre papa como en tomate de árbol (*S. betaceum*), con una identidad genética superior al 98%. Finalmente, las secuencias obtenidas para PYVV compartieron el 99% de identidad para la región CP con cepas aisladas de papa, papa criolla y tomate, reportadas en los departamentos de Antioquia, Nariño y Cundinamarca [28], adicionalmente, presentaron un 99,3% de identidad con respecto a un aislamiento de PYVV en lulo (*S. quitoense*) (Figuras 3 y 4) [29, 30].

Figura 4. Matrices de identidad genética para secuencias de la cápside de los virus PVY, PVS, PLRV y PYVV obtenidas en plantas derivadas de tubérculos-semilla de papa y de otros hospedantes reportados en GenBank.



CONCLUSIONES

En este trabajo utilizando la técnica RT-qPCR se detectó la infección de los virus PVY (64%), PVS (19%), PVX (14%), PLRV (31%) y PYVV (26%) a partir de brotes de tubérculo semilla comercial y no comercial de la var. Diacol Capira. Cuando se evaluaron las plantas derivadas de este material luego de cuatro semanas, dichos valores aumentaron para tres de los virus (PVY: 74%, PVS: 36%, PVX: 17%); permanecieron iguales para PYVV (26%) y disminuyeron para PLRV (5%), lo que ofrece una recomendación práctica sobre los tejidos más apropiados para la detección de dichos virus en material de siembra de papa.

En las evaluaciones de las infecciones mixtas de virus según el tipo de tubérculo-semilla (comercial y no comercial) y el tejido empleado para su detección (brotes de tubérculo y tejido foliar de sus plantas derivadas), se observaron muestras que presentaban la infección de hasta cuatro virus, lo que señala la necesidad de tomar acciones inmediatas que ayuden a mejorar los niveles de sanidad viral de los materiales de siembra de papa utilizados en Colombia.

Utilizando RT-PCR convencional y secuenciación Sanger se logró obtener al menos tres secuencias de la región de la cápside para los virus PVY, PVS, PLRV y PYVV. Los análisis de variabilidad genética derivados de dichas secuencias indicaron bajos niveles de variación entre las cepas obtenidas, y su afinidad filogenética con subclados previamente reportados para cada uno de estos virus en Antioquia, Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Dirección de investigación en innovación de la Universidad CES y por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL) y contó con la asesoría estadística del Profesor Guillermo Correa Londoño de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNAL-MED.

REFERENCIAS

- [1] COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL (MADR). Indicadores e Instrumentos Enero 2018 Indicadores Generales. 2018. Disponible en: <https://www.minagricultura.gov.co/paginas/default.aspx>. [citado 11 de marzo de 2019].
- [2] BUDDENHAGEN, CHRIS; HERNANDEZ-NOPSA, JOHN-FREDY; ANDERSEN, KELSEY; ANDRADE-PIEDRA, JORGE; FORBES, GREGORY-ALLAN; KROMANN, PETER; THOMAS-SHARMA, SARA; USECHE, PILAR; GARRETT, KAREN. Epidemic Network Analysis for Mitigation of Invasive Pathogens in Seed Systems: Potato in Ecuador. *Ecology and Epidemiology*, v. 107, n. 1, 2017, p. 1209-1218. 10.1094/PHYTO-03-17-0108-FI
- [3] NAVARRETE, ISRAEL; PANCHI, NANCY; KROMANN, PETER; FORBES, REGORY; ANDRADE-PIEDRA, JORGE. Health quality of seed potato and yield losses in Ecuador. *Revista Latinoamericana la papa*, v. 21, n. 2, 2017, pp. 69-88. <https://doi.org/10.1101/108712>
- [4] COLOMBIA. SISTEMA DE INFORMACIÓN DE GESTIÓN Y DESEMPEÑO DE LAS ORGANIZACIONES DE CADENAS (SIOC). El Sistema de Información de Gestión y Desempeño de las Organizaciones de Cadenas. 2020. Disponible. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Papa>. [citado 24 de agosto de 2020].
- [5] NIKITIN, M.M.; STATSYUK, N.V.; FRANTSUZOV, P.A.; DZHAVAKHIYA, V.G.; GOLIKOV, A.G. Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v. 124, n. 3, 2018, p. 797-809. <https://doi.org/10.1111/jam.13686>
- [6] RIASCOS-CHICA, MELISSA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; MARIN-MONTOYA, MAURICIO-ALEJANDRO. Identificación molecular de Potyvirus infectando cultivos de papa en el oriente de Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, v. 23, n. 1, 2018, p. 39-50. 10.15446/abc.v23n1.65683
- [7] GARCÍA-RUÍZ, DANIELA; OLARTE-QUINTERO, MANUEL-ANDRES; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO. Detección serológica y molecular del Potato virus X (PVX) en tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. Bukasov) en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 18, n. 1, 2016, p. 1-8. 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.51389
- [8] MEDINA, HÉCTOR-CAMILO; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN, MAURICIO. Detection and sequencing of Potato virus Y (PVY) and Potato leafroll virus (PLRV) in a volunteer plant of *Solanum tuberosum* L. cv. Diacol-Capiro. *Acta Agronómica*, v. 66, n. 1, 2017, p. 625-632. 10.15446/acag.v66n4.59753
- [9] GALLO-GARCÍA, YULIANA-MARCELA; SIERRA-MEJÍA, ANDREA; DONAIRE-SEGARRA, LIVIA; ARANDA, MIGUEL; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARIN, MAURICIO. Natural coinfection of RNA viruses in potato (*Solanum tuberosum* subsp. Andigena) crops in Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, v. 24, n. 3, 2019, p. 546-560. 10.15446/abc.v24n3.79277
- [11] MESA-MEDINA, MAURICIO; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, MARTHA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO. Diagnóstico serológico y molecular del *Potato leafroll virus* (PLRV) en tubérculos-semilla de papa en Antioquia, Colombia. *Acta Agronómica*, v. 65, n. 2, 2016, p. 204-210. 10.15446/acag.v65n2.50764
- [12] ÁLVAREZ-YEPES, DANIELA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO. Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PYVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro*, v. 29, n. 1, 2017, p. 3-14.
- [13] SINGH, R.P.; KURZ, J.; BOITEAU, G.; BERNARD, G. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *Journal of Virological Methods*, v. 1, n. 506, 1995, p. 133-143. 10.1016/0166-0934(95)00056-Z

- [14] SIERRA-MEJÍA, ANDREA; GALLO-GARCÍA, YULIANA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN-MONTOYA, MAURICIO-ALEJANDRO. Design of primers for specific detection of Potato Virus Y (PVY) by RT-PCR. *Acta Biologica Colombiana*, v. 24, n. 3, 2019, p. 561-565.
10.15446/abc.v24n3.76523
- [15] VALLEJO, DANIELA; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN, MAURICIO. Genome characterization of a Potato virus S (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. *Agronomía Colombiana*, v. 34, n. 1, 2016, p. 51-60.
10.15446/agron.colomb.v34n1.53161
- [16] AGINDOTAN, BRIGHT; SHIEL, PATRICK; BERGER, PHILIP. Simultaneous detection of potato viruses PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 142, 2007, p. 1-9.
10.1016/j.jviromet.2006.12.012
- [17] YANG, LIJIE; NIE, BIHUA; LIU, JUN; SONG, BOTAO. A Reexamination of the effectiveness of Ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets in vitro using ELISA and quantitative RT-PCR. *The American Journal of Potato Research*, v. 91, n. 3, 2013, p. 304-311.
10.1007/s12230-013-9350-z
- [18] NIE, X.; SINGH, R.P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. *Journal of Virological Methods*, v. 91, 2001, p. 37-49.
10.1016/S0166-0934(00)00242-1
- [19] ROBERT, EDGAR. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Journal Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 5, 2004, p. 1792-1797. 10.1093/nar/gkh340
- [20] KUMAR, SUDHIR; STECHER, GLEN; TAMURA, KOICHIRO. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, 2016, p. 1870-1874.
10.1093/molbev/msw054
- [21] PRIEGNITZ, UTA; LOMMEN, WILLEMIEN; VAN DER VLUGT, RENÉ; STRUIK, PAUL. Impact of positive selection on incidence of different viruses during multiple generations of potato seed tubers in Uganda. *Potato Research*, v. 62, n. 1, 2019, p. 1-30.
10.1007/s11540-018-9394-z
- [22] SADAWARTI, MURLIDHAR; SINGH, RAJESH; SAMADHIYA, R.K.; SINGH, S.P.; ROY, S.; SINGH, VINAY; RAWAL, SANJAY; BUCKSETH, TANUJA; KUMAR, RAJ; CHAKRABARTI, S.K. Revisiting of planting dates for maximizing seed size potato (*Solanum tuberosum*) tuber yield as per changing climatic scenario. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, v. 89, n. 4, 2019, p. 646-652.
- [23] GULUMA, DEJENE-ABERA. Factors affecting potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber seed quality in mid and highlands: A Review. *International Journal of Agriculture & Agribusiness*, v. 7, n. 1, 2020, p. 24-40.
- [24] ITALIA. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). FAOSTAT. 2019. Disponible: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. [citado 24 de agosto de 2020].
- [25] ZHANG, WEI; ZHANG, ZHIXIANG; FAN, GUOQUAN; GAO, YANLING; WEN, JINGZHI; YANJU, BAI; QIU, CAILING; ZHANG, SHU; SHEN, YU; MENG, XIANXIN. Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses. *Journal of General Plant Pathology*, v. 83, n. 1, 2017, p. 33-45.
10.1007/s10327-016-0688-1
- [26] PRIEGNITZ, UTA; LOMMEN, WILLEMIEN; VAN DER VLUGT, RENÉ; STRUIK, PAUL. Impact of positive selection on incidence of different viruses during multiple generations of potato seed tubers in Uganda. *Potato Research*, v. 62, n. 1, 2019, p. 1-30.
10.1007/s11540-018-9394-z
- [27] ÁLVAREZ-MESA, NATALIA; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, PABLO-ANDRÉS; JARAMILLO-MESA, HELENA; GALLO, YULIANA; MARÍN, MAURICIO. Molecular characterization of Potato virus Y (PVY) and Potato virus V (PVV) (*Potyvirus*, *Potyviridae*) naturally infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in Antioquia (Colombia). *Agronomía Colombiana*, v. 36, n. 1, 2018, p. 13-23.

- 10.15446/agron.colomb.v36n1.65051
- [28] CUADROS, DIEGO; HERNANDEZ, ANNGIE; TORRES, MARÍA; TORRES, DIANA; BRANSCUM, ADAM; RINCON, DIEGO. Vector transmission alone fails to explain the potato yellow vein virus epidemic among potato crops in Colombia. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. 1654, 2017, p. 1-8.
10.3389/fpls.2017.01654
- [29] GALLO, YULIANA; TORO, LUISA-FERNANDA; JARAMILLO, HELENA; GUTIÉRREZ, PABLO-ANDRÉS; MARÍN, MAURICIO. Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v. 12, n. 2, 2018, p. 281-292.
10.17584/rcch.2018v12i2.7692
- [30] HANCINSKÝ, RICHARD; MIHÁLIK, DANIEL; MRKVOVÁ, MICHAELA; CANDRESSE, THIERRY; GLASA, MIROSLAV. Plant Viruses Infecting Solanaceae Family Members in the Cultivated and Wild Environments: A Review. *Plants*, v. 9, n. 667, 2020, p. 2-27.
10.3390/plants9050667