

# COINFECCIÓN NATURAL DE VIRUS DE ARN EN CULTIVOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* subsp. *Andigena*) EN ANTIOQUIA (COLOMBIA)

## Natural coinfection of RNA viruses in potato (*Solanum tuberosum* subsp. *Andigena*) crops in Antioquia (Colombia)

Yuliana GALLO GARCÍA<sup>1,2\*</sup>, Andrea SIERRA MEJÍA<sup>2</sup>, Livia DONAIRE SEGARRA<sup>3</sup>, Miguel A. ARANDA<sup>3</sup>, Pablo Andrés GUTIÉRREZ<sup>2</sup>  
Mauricio MARÍN MONTOYA<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, Universidad CES, Calle 10 A n°. 22 - 04, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Carrera 65 n°. 59A - 110, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Grupo de Patología Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-CSIC, Espinardo, Murcia, España.

<sup>4</sup> Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Carrera 65 n°. 59A - 110, Medellín, Colombia.

\*For correspondence: ygallo@ces.edu.co

Received: 24<sup>th</sup> April 2019, Returned for revision: 12<sup>th</sup> July 2019, Accepted: 09<sup>th</sup> August 2019.

Associate Editor: Jaime Castellanos.

Citation/Citar este artículo como: Gallo Y, Sierra A, Donaire L, Aranda M, Gutiérrez PA, Marín M. Coinfección natural de virus de ARN en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* subsp. *Andigena*) en Antioquia (Colombia). Acta biol. Colomb. 2019;24(3):546-560. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n3.79277>

### RESUMEN

Las enfermedades virales son uno de los principales problemas fitopatológicos de la papa. Con el fin de determinar los virus más prevalentes en cultivos de papa var. Diacol Capiro en el oriente Antioqueño (Colombia), se evaluó mediante RT-qPCR la presencia de diez virus de ARN (PVY, PVA, PVV, TaLMV, PVS, PLRV, PVV, PVX, ToRSV y PMTV) en 36 muestras de tejido foliar. Los resultados indicaron la ocurrencia de cinco de los diez virus evaluados, con niveles de prevalencia de 88,9 %, 75 %, 75 %, 41,7 % y 25 % para PVY, PVX, PVV, PLRV y PVS, respectivamente. Con fines comparativos, cuatro virus también se evaluaron mediante ELISA, siendo detectados PVS (80,5 %), PVY (55 %) y PLRV (5,5 %); mientras que PVX no fue encontrado con esta prueba. La comparación de estas técnicas mediante la razón de prevalencia (RP), indicó que la RT-qPCR ofrece niveles superiores de detección con valores de RP = 1,6 y RP = 7,5 para los virus PVY y PLRV; mientras que para PVS la ELISA detectó más muestras positivas que RT-qPCR (RP = 3,22), evidenciándose la necesidad de diseñar nuevos cebadores ajustados a la diversidad de este virus en Antioquia. La coinfección mixta más frecuente fue PVY-PVV-PVX (22,2 %), mientras que los cinco virus se encontraron en el 11,1 % de las muestras. Finalmente, utilizando secuenciación Sanger de la cápside y NGS para los genomas completos, se confirmó la circulación de todos los virus detectados en los cultivos de papa del oriente Antioqueño. Estos resultados señalan la necesidad de fortalecer los programas de manejo integrado de enfermedades virales en Antioquia.

**Palabras clave:** ELISA, RT-qPCR, Secuenciación de nueva generación (NGS), Solanaceae, Virus de ARN.

### ABSTRACT

Viral diseases are one of the main phytopathological problems affecting potato crops worldwide. To determine the most prevalent viruses in potato var. Diacol Capiro crops in Eastern Antioquia, 36 leaf samples were tested for the presence of PVY, PVA, PVV, TaLMV, PVS, PLRV, PVV, PVX, ToRSV and PMTV using RT-qPCR. Detected viruses included PVY, PVX, PVV, PLRV and PVS with prevalence levels of 88.9 %, 75.0 %, 75.0 %, 41.7 % and 25.0 %, respectively. PVS, PVY, PLRV and PVX were also tested by ELISA. PVS, PVY and PLRV tested positive in 80.5 %, 55.0 % and 5.5 % of samples; PVX was not detected. Prevalence Ratios (PR) suggests that detection is higher for PVY (PR = 1.6) and PLRV (PR = 7.5) using RT-qPCR. ELISA worked better for PVS with a PR of 3.22; this result suggests that the RT-qPCR primers used for PVS must be adjusted to reflect the genome diversity of virus in Antioquia. The most frequent coinfection was PVY-PVV-PVX, which occurred in 22.2 % of samples; coinfection with PVY, PVX, PVV, PLRV and PVS was present in 11.1 % of samples. The circulation of these viruses in Eastern Antioquia was further confirmed using Sanger and high-throughput sequence. This work highlights the need to strengthen integrated disease management programs of viruses in Antioquia.

**Keywords:** ELISA, Next-generation sequencing (NGS), RNA viruses, RT-qPCR, Solanaceae.

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo de mayor producción en el mundo (FAO, 2008; He *et al.*, 2012) con 388 190 674 t/año y una extensión de 19 302 642 ha (FAOSTAT, 2019). En Colombia, este cultivo es la principal actividad agrícola de las zonas andinas y comprende cerca de 132 161 ha distribuidas en diez departamentos y 283 municipios, con un rendimiento promedio de 21 t/ha; las variedades más cultivadas son Pastusa Suprema (29,7 %), Diacol Capiro (25,7 %), Parda Pastusa (13 %), Ica Única (10,5 %) y Criolla Colombia (6,4 %) (Fedepapa, 2018; MADR, 2018). El departamento de Antioquia es el cuarto productor nacional de este tubérculo con una participación cercana al 6 %, una producción de 2 753 854 t y un área cultivada de 7400 ha, distribuida en cerca de 27 municipios, principalmente de las zonas del altiplano norte y del oriente, en alturas de 2100 a 2800 m.s.n.m., con una temperatura media de 13 a 17 °C y una precipitación anual de 1500 a 2000 mm. En este departamento, cerca del 90 % del área cultivada corresponde a la variedad Diacol Capiro, 8 % a papa criolla (*Solanum phureja*) variedad Colombia, 1 % a ICA Nevada y 1 % a ICA Puracé (MADR, 2018).

Sin embargo, este cultivo es afectado por un alto número de fitopatógenos e insectos plaga que reducen drásticamente sus rendimientos y calidad de los tubérculos, siendo recientemente calculado que las pérdidas de su producción alcanzan un promedio mundial de 17,2 % y que este valor puede ser aún mayor (21 %) en algunos países en vía de desarrollo (Savary *et al.*, 2019). Adicionalmente, dado que comercialmente la papa se propaga en forma vegetativa a través de tubérculos, los patógenos sistémicos, especialmente aquellos de origen viral, son uno de los problemas fitosanitarios más limitantes para este cultivo (Nikitin *et al.*, 2018). En el mundo, se han reportado más de 40 virus de papa, entre los que se destacan: Potato virus Y (PVY) (*Potyvirus*, *Potyviridae*), Potato virus S (PVS) (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*), Potato leafroll virus (PLRV) (*Polerovirus*, *Luteoviridae*), Potato yellow vein virus (PYV) (*Crinivirus*, *Closteroviridae*) y Potato virus X (PVX) (*Potexvirus*, *Alphaflexiviridae*) (García-Ruiz *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Nikitin *et al.*, 2018).

Los efectos deletéreos que ocasionan las infecciones virales en las plantas son difíciles de valorar, pues dependen de múltiples factores tales como la variante del agente causal, la susceptibilidad del hospedante, la edad de la planta, el clima y la ocurrencia de infecciones mixtas, entre otros (Salazar, 1995; Guzmán *et al.*, 2010). Así por ejemplo, PVY y PLRV pueden ocasionar pérdidas en cultivos de papa en niveles de hasta un 50 - 80 % (Beemster y Bokx, 1987; Marshall *et al.*, 1988; Nolte *et al.*, 2004); mientras que para el caso de PVX se han reportado pérdidas que disminuyen en hasta un 50 % los rendimientos de este cultivo cuando se presenta en infecciones con otros virus (Beemster y Bokx, 1987).

Las infecciones mixtas a menudo se asocian con el aumento en la severidad de los síntomas y del título viral, en comparación con las plantas infectadas por un solo virus, fenómeno conocido como sinergismo (Syller, 2012; Pagan y García-Arenal, 2018). En papa, dos casos particularmente bien estudiados corresponden a la infección mixta de PVX/PVY y PVY/PLRV, que pueden disminuir la producción de las cosechas entre 80 % y 90 % (Vance, 1991; Savenkov y Valkonen, 2001; Agrios, 2005; Ahmadvand *et al.*, 2012); mientras que la infección individual de PVX generalmente causa síntomas tenues, pero en combinación con otros virus como PVY, PVS y PVA, puede inducir mosaicos severos que afectan drásticamente los rendimientos de los cultivos (Hameed *et al.*, 2014).

En Colombia son frecuentes las coinfecciones virales en los cultivos de papa, siendo reportadas las infecciones mixtas con PVY, PVS, PLRV y PYV (Guerrero y Martínez, 1980; Gil *et al.*, 2013). Esta situación también se ha evidenciado sobre la Colección Central Colombiana de papa, en donde utilizando pruebas de DAS-ELISA se encontró que el 40 % de las muestras analizadas presentaban infecciones mixtas con los virus PVS, PVY y PLRV y en el 21 % de éstas se observaron cuatro virus diferentes (Guzmán *et al.*, 2010).

En los últimos años, se ha aumentado considerablemente la información sobre los virus que afectan diferentes solanáceas cultivadas en Colombia y están disponibles los genomas completos de cepas de las razas PVY<sup>o</sup>, PVY<sup>N</sup> y PVY<sup>NTN</sup> en papa (Villamil-Garzón *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2017; Riascos *et al.*, 2018); de PYV en papa criolla, tomate (*S. lycopersicum*) y lulo (*S. quitoense*) (Villamil-Garzón *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2017; Baena *et al.*, 2017; Gallo *et al.*, 2018); así como también de los linajes PVS<sup>A</sup> y PVS<sup>P</sup> en papa criolla (Gutiérrez *et al.*, 2012; Vallejo *et al.*, 2016), de PVX en uchuva (*Physalis peruviana*) y de PLRV en plantas voluntarias de papa (Medina *et al.*, 2017).

El presente trabajo hace parte de dicha línea de investigación y tuvo como principal objetivo evaluar la coinfección natural de diez virus de ARN en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* subsp. Andigena var. Diacol Capiro) en el oriente Antioqueño, mediante la utilización de RT-qPCR y su comparación con pruebas de ELISA utilizadas frecuentemente como *Gold standard* en el país. Finalmente, la circulación de los virus detectados fue confirmada mediante secuenciación Sanger de la cápside viral y secuenciación de nueva generación (NGS), obteniéndose los genomas completos de los virus PVY, PVS, PVX, PLRV y PYV.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para la evaluación de la prevalencia viral, se realizaron muestreos aleatorios equiprobabilísticos en 12 lotes (> 1 ha) en estado de floración de papa var. Diacol Capiro en municipios del oriente Antioqueño; zona uno: Marinilla

(tres lotes, 6° 10' 28" N, 75° 20' 20" W) y San Vicente Ferrer (tres lotes, 6°16' 55" N 75°19'56"O); zona dos: Sonsón (seis lotes, 5°42'34"N 75°18'38"O). En cada lote se obtuvieron tres muestras foliares conformadas por cinco folíolos jóvenes. Cada muestra fue dividida en dos partes; la primera se destino para la realización de pruebas de ELISA y la segunda para la extracción de los ácidos nucleicos necesarios en las pruebas de RT-qPCR y RT-PCR.

Para la confirmación de la circulación de los virus en el oriente de Antioquia y la caracterización de sus genomas, se secuenció por NGS una muestra compuesta (*bulk*) de tejido foliar procedente de cuatro lotes de Marinilla (dos lotes) y La Unión (dos lotes), con síntomas de enfermedades virales como: mosaicos, amarillamiento de venas, enrollamiento y deformación foliar (Figura 2).

### Detección de virus por RT-qPCR

El ARN total de cada una de las muestras fue extraído con el kit GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) a partir de 100 mg de tejido macerado con nitrógeno líquido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN fue eluído en 40 µL de agua tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC). La concentración e integridad del ARN purificado fue evaluada por lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo-Fisher Scientific, EEUU). A partir de este ARN, se procedió a la síntesis del ADN complementario (ADNc) para los diez virus evaluados en el estudio: Potato virus Y (PVY), Potato virus A (PVA), Potato virus V (PVV), Tamarillo leaf malformation virus (TaLMV), Potato virus S (PVS), Potato leafroll virus (PLRV), Potato yellow vein virus (PYVV), Potato virus X (PVX), Tomato ring spot virus (ToRSV) y Potato mop-top virus (PMTV), utilizando 100 pmol de cada cebador reverso, que para el caso de PVY, PVA, PVV, TaLMV, PVS, PVX y ToRSV correspondió al Oligo-(dT)18 y para los virus PYVV, PLRV y PMTV, a los cebadores específicos PYVV\_R\_CP, PLRV-R y 123end, respectivamente (Tabla 1). Las reacciones de ADNc se hicieron en 20 µL conteniendo 200 U de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo-Fisher Scientific, EEUU), 1X de buffer RT, 0,5 mM de los cuatro dNTPs, 20 U de inhibidor de ARNasas RiboLock (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) y de 100 a 500 ng de ARN. Las reacciones se incubaron a 42 °C durante 60 min y posteriormente la enzima se inactivó a 70 °C durante 10 min. Para la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se utilizó el kit Maxima SYBR Green/ROX (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) en un volumen total de 12,5 µL con cebadores específicos a una concentración de 0,3 µM (Tabla 1). El programa de amplificación fue de 10 min a 95 °C para activar la Taq polimerasa, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 15s y 50 °C por 45s, utilizando un equipo RotorGene Q-5plex (Qiagen, Alemania) para calcular los valores de ciclo umbral (Ct) y de temperatura de fusión (Tm) en el rango 50 - 99 °C. Todas las reacciones tuvieron un control

positivo y un control negativo, que correspondía a tejido foliar infectado (+) o libre (-) de los virus bajo estudio, tanto de origen comercial (Agdia, Indiana, EEUU) o de muestras procedentes de la colección del grupo de investigación.

### Detección de virus por ELISA

Estas evaluaciones se realizaron en las 36 muestras para cuatro de los cinco virus detectados mediante RT-qPCR (PVY, PVS, PLRV y PVX), dada la ausencia de anticuerpos comerciales para PYVV. Para PVY se utilizó el formato ACP-ELISA (*Antigen Coated Plate ELISA*) con anticuerpos monoclonales; para los virus PVS, PLRV y PVX se utilizó el formato DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich*) con anticuerpos policlonales. En cada prueba se incluyeron dos controles positivos que correspondían a muestras de tejido liofilizado de plantas infectadas con el virus bajo análisis y como control negativo, se utilizó una muestra de tejido vegetal libre de virus. Las pruebas de ELISA y los controles fueron adquiridos en la compañía Agdia (Indiana, EEUU). Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia). El valor de corte (*Cut-off*) que diferencia entre muestras positivas y negativas fue definido con el procedimiento descrito por Bioreba (Suiza), que utiliza la fórmula:

$$Cut-off = (\text{promedio} + 3 \text{ desviaciones estándar}) \times 1,1 \quad (1)$$

### Secuenciación de nueva generación (NGS) y análisis bioinformáticos

A partir de cinco gramos de una mezcla de tejido foliar de papa derivada de las muestras sintomáticas obtenidas en ambas zonas del oriente de Antioquia, se procedió a la extracción de ARN de doble cadena (ARNdc) siguiendo el protocolo reportado por Valverde *et al.*, (1990), utilizando celulosa de fibra media (C6288 Medium) (Merck KGaA, Alemania) equilibrada en 16,5 % de buffer STE (100 mMNCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 y 1 mM EDTA). Para la elución final se emplearon 200 µL de agua tratada con DEPC. La presencia de ARNdc fue verificada mediante la visualización de bandas en un gel de poliacrilamida al 8 % teñido con GelRed (Biotium, EEUU). Posteriormente, se procedió a su desnaturalización a 98 °C por 5 min y se evaluó su concentración y valor de RIN (*RNA Integrity Number*) en un equipo Bioanalyzer2100 (Agilent Technologies, EEUU). La librería de ADNc se construyó con el kit TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep con eliminación del ARN ribosomal (ARNr) utilizando Ribo-Zero (Illumina, EEUU). La secuenciación fue realizada en un equipo Illumina NovaSeq de la compañía Macrogen (Corea del Sur).

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a determinar su calidad con el programa FastQC y los nucleótidos de los extremos con baja calidad (QC < 30) fueron eliminados empleando el programa Trimmomatic v. 0.36 (Bolger *et al.*, 2014). Posteriormente, se realizó el

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados en el estudio para síntesis del ADNc, RT-qPCR y RT-PCR.

| Virus | Técnica | Cebador  | Referencia                     |
|-------|---------|--|--------------------------------|
| PVY   | qPCR    | PVY-1_FP - 5' CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA C 3'             | Singh <i>et al.</i> , 2012     |
|       |         | PVY-1_RP - 5' ATA TAC GCT TCT GCA ACA TCT GAG A 3'         |                                |
|       | PCR     | PVY-F - 5' ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC 3'                   | Nie y Singh, 2001              |
|       |         | PVY-R - 5' TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT 3'                   |                                |
| PVV   | qPCR    | PVW_F_CP - 5' TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG-3                | Álvarez <i>et al.</i> , 2017   |
|       |         | qPVW_R_CP - 5' AGG TCT CAG GAT CTG GAT CAA CT-3'           |                                |
|       | PCR     | PVW_F_CP - 5' TCA GGT TAG AGC AGA CAG AGG-3                |                                |
|       |         | PVW_R_CP - 5' AGT TGC TGC ATT CTT GAA CAG G 3'             |                                |
| PVS   | qPCR    | PVS_gen_F - 5' ATG CCG CCY AAA CCA GAT CC 3'               | Vallejo <i>et al.</i> , 2016   |
|       |         | qPVS_gen_R - 5' AGC ATK GCT TCY TCA TTT TGC CCT G 3'       |                                |
|       | PCR     | PVS_gen_F - 5' ATG CCG CCY AAA CCA GAT CC 3'               |                                |
|       |         | PVS_gen_R - 5' ACC TTC ART ATG ACK CCA AGC AAC ATG C 3'    |                                |
| PLRV  | qPCR    | PLRV-Sense - 5' GCT CAA GCG AGA CAT TCG TG 3'              | Yang <i>et al.</i> , 2014      |
|       |         | PLRV-Antisense - 5' TTG AAT GCC GGA CAG TCT GA 3'          |                                |
|       | PCR     | PLRV-F - 5' CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC 3'                  | Singh <i>et al.</i> , 1995     |
|       |         | PLRV-R - 5' GCA ATG GGG GTC CAA CTC CAA CTC AT 3'          |                                |
| PVV   | qPCR    | PVV_phu_F - 5' ATG CTG GAA AAG ATC CAG C 3'                | Álvarez <i>et al.</i> , 2016   |
|       |         | qPVV_phu_R - 5' CAT CCC GCT CCT CAA C 3'                   |                                |
| PVX   | qPCR    | PVX_101-2_FP - 5' AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC 3'            | Agindotan <i>et al.</i> , 2007 |
|       |         | PVX_101-2_RP - 5' GCT TCA GAC GGT GGC CG 3'                |                                |
|       | PCR     | PVXF - 5'TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG3'                      | Nie y Singh, 2001              |
|       |         | PVXR - 5' GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC 3'                   |                                |
| ToRSV | qPCR    | ToRSV-1590F - 5' GCC ACC CGA GAA CGT TAG C 3'              | Osman <i>et al.</i> , 2008     |
|       |         | ToRSV-1661R -5' GCC TGC TGA GTC TGC TGT AGA G 3'           |                                |
| TaLMV | qPCR    | TaLMV_F_CP - 5' -GCT GAT AAA CTT GAT GCC GGA GC-3'         | Villegas <i>et al.</i> , 2017  |
|       |         | qTaLMV_R_CP - 5' -GAT GAA CCA GCA TCG ACA TCC C-3'         |                                |
| PMTV  | qPCR    | PMTV-1948F - 5'-GTGATCAGATCCGCGTCTT-3'                     | Mumford <i>et al.</i> , 2000   |
|       |         | PMTV-2017R - 5'-CCACTGCAAAAGAACCGATTTC-3'                  |                                |
|       | cADN    | 123end - 5' GTG AAC CAC GGT TTA RCC CTG KAA GC - 3'        | Gil <i>et al.</i> , 2011       |
| PVA   | qPCR    | PVA 102-2 FP - 5' - TGTCGATTAGGTACTGCTGGGAC - 3'           | Agindotan <i>et al.</i> , 2007 |
|       |         | PVA 102-2 RP - 5' - TGCTTT GGT TTG TAA GAT AGC AAG TG - 3' |                                |

alineamiento de los *reads* contra el genoma de referencia de papa disponible en NCBI utilizando el programa Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2013), con el fin de eliminar la mayor proporción de *reads* de origen vegetal. De esta forma, los *reads* no alineados fueron ensamblados *de novo* con el programa Trinity (Hass *et al.*, 2013) y su resultado evaluado con el programa QUAST (Gurevich *et al.*, 2013). Los *contigs*

correspondientes a genomas virales se identificaron por comparación con la base de datos de virus de referencia del NCBI utilizando BlastN local. Los virus detectados se verificaron y ensamblaron por mapeo utilizando Magic-Blast y los alineamientos resultantes se visualizaron con el programa Tablet. Las secuencias consenso para cada virus fueron generadas con Samtools y los SNVs (*Single nucleotide*

variants) fueron analizados con el programa LoFreq (Wilm *et al.*, 2012). Finalmente, se identificaron los marcos abiertos de lectura (*Open Reading frames* - ORF) mediante BlastX y ORF finder. Para cada uno de los genomas virales identificados en este trabajo, se obtuvo la región codificante de la cápside viral (CP) para realizar análisis filogenéticos utilizando el método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*) con el modelo de sustitución K2+G, empleando el software MEGA7 con 1000 réplicas de *bootstrap* (Kumar *et al.*, 2016).

### RT-PCR convencional y secuenciación Sanger

Las condiciones de síntesis del ADNc fueron similares a las descritas anteriormente. Se amplificó la región que codifica la cápside para cada virus con cebadores específicos (Tabla 1) en un volumen de 25 µL con 1X de buffer de enzima (10X), 0,2 mM de cada dNTP, 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de TaqADN polimerasa (Thermo-Fisher Scientific, EEUU), 0,2 µM de los cebadores y 1 µL de ADNc. El programa consistió en 94 °C durante 3 min como desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 50 s, 52 °C por 50 s, 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min, en un termociclador T3 (Biometra, Alemania). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, suplementado con GelRed 1X (Biotium, EEUU) y visualizados en un equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EEUU). Al menos tres bandas de muestras individuales del tamaño esperado para cada virus fueron purificadas con el kit GeneJET Gel Extraction® (Thermo-Fisher Scientific, EEUU) y secuenciadas en ambos sentidos por el método de Sanger en un equipo ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen (Corea del Sur).

### Análisis estadístico

Con el fin de evaluar la existencia de asociación entre las pruebas de diagnóstico empleadas (ELISA y RT-qPCR) y la presencia de cada virus detectado, se calculó la razón de prevalencia y su respectiva prueba estadística de Fisher, empleando el programa EPIDAT® 3.1 (Análisis epidemiológico de datos tabulados). La razón de prevalencia (RP) fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Razón de Prevalencia (RP)} = \frac{\frac{a}{(a+b)}}{\frac{c}{(c+d)}} \quad (2)$$

Siendo (a) el número de muestras positivas por RT-qPCR, (b) el número de muestras negativas por RT-qPCR, (c) el número de muestras positivas por ELISA y (d) el número de muestras negativas por ELISA. Por otra parte, los análisis de profundidad promedio para cada uno de los genomas virales ensamblados como resultado de la secuenciación NGS, fueron calculados y graficados con el programa RStudio (RstudioTeam, 2015).

## RESULTADOS

### Detección de virus por RT-qPCR

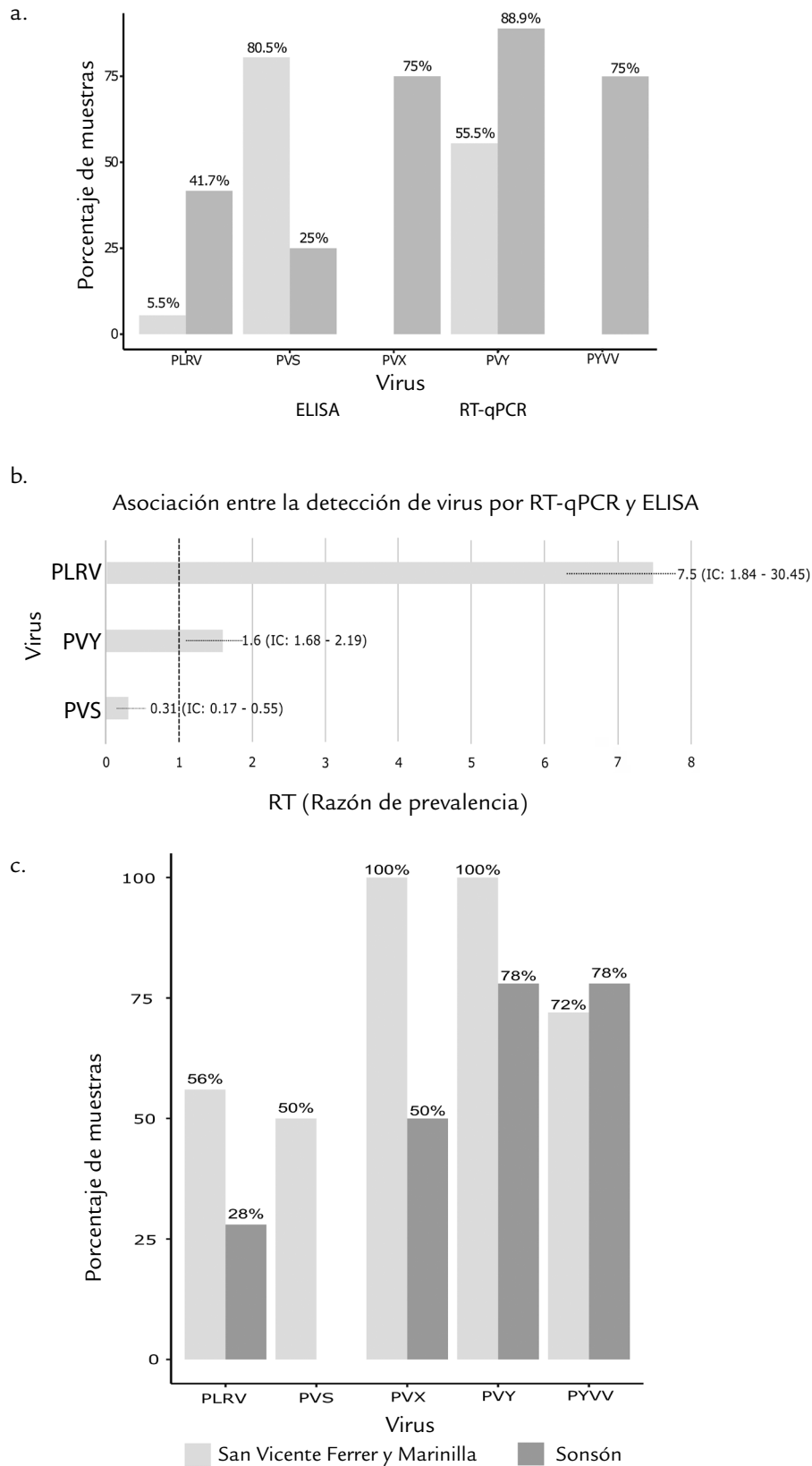
Utilizando la técnica de RT-qPCR se evaluó la presencia de los virus PVY, PVA, PVV, TaLMV, PVS, PLRV, PYV, PVX, ToRSV y PMTV en tejido foliar de papa var. Diacol Capiro en el oriente de Antioquia. PVY fue el virus con mayor prevalencia, al ser encontrado en el 88,9 % de las muestras, seguido de PVX y PYV que fueron detectados en el 75 % de éstas. Entre los virus detectados, PLRV y PVS fueron los menos prevalentes, con valores de 41,7 % y 25 %, respectivamente (Figura 1). Los virus PVA, PVV, TaLMV, ToRSV y PMTV no fueron encontrados en ninguna de las muestras. Todos los controles positivos amplificaron la secuencia esperada con valores de Ct inferiores a 25 y no se observó amplificación en ninguno de los controles negativos.

Al considerar la prevalencia de los virus por subregiones del oriente de Antioquia, se identificó la presencia de PVY y PVX en el 100 % de las muestras foliares obtenidas en la zona uno, mientras que en la zona dos se detectaron en el 78 % y 50 %, respectivamente (Figura 1). PYV por su parte, se encontró en el 72 % de muestras de la zona uno y en el 78 % de las muestras de la zona dos y PLRV se encontró en el 56 % y 28 % de dichas zonas. Finalmente, PVS solo fue detectado en el 50 % de las muestras de la zona uno.

Los valores de Ct obtenidos para los cinco virus detectados, presentaron una gran variación, lo que indica la ocurrencia de diferentes niveles de infección en las muestras evaluadas. PVY presentó el mayor título viral y la mayor variación, con un valor mínimo de Ct de 8,96 y un máximo de 34,77 (Media= 17,58, SD = 8,64), seguido de PVS con valores de Ct entre 10,68 y 31,28 (Media = 25,93, SD = 8,27). Los valores promedio de Ct para PVX, PYV y PLRV, fueron de 19,54 (SD = 3,6), 39,24 (SD = 3,15) y 31,04 (SD = 3,15), respectivamente. El Tm de las muestras positivas por RT-qPCR fue comparado respecto al rango de temperaturas reportado en Colombia para el virus correspondiente y en todos los casos se obtuvieron los valores esperados. Para PVY se encontraron lecturas promedio de Tm = 77,5 °C ± 0,6 °C (77,5 °C ± 0,5 °C; Medina *et al.*, 2015); para PVS el valor de Tm fue de 87,5 °C ± 1 °C (Tm = 86,96 °C ± 1 °C; Vallejo *et al.*, 2016), mientras que para PVX se presentaron dos valores de Tm (80,55 °C ± 1 °C y 83,85 °C ± 0,5 °C) correspondientes a dos variantes registradas para este virus por García *et al.*, (2016) (Tm= 79,5 °C ± 1 °C y Tm = 83,7 °C ± 1 °C). Finalmente, para PLRV el valor promedio de Tm fue de 80 ± 0,3 °C (Tm= 81,8 °C ± 0,3 °C; Mesa *et al.*, 2016) y para PYV el Tm fue de 77,5 °C ± 1,5 °C (Tm = 77,28 ± 0,6 °C; Álvarez *et al.*, 2017).

### Detección de virus por ELISA

Las pruebas comerciales de ELISA para la detección de los virus en tejido foliar de papa var. Diacol Capiro permitieron detectar al PVS en 80,5 % de las muestras evaluadas, con



**Figura 1. a.** Detección de los virus PLRV, PVS, PVX, PVY y PVV mediante RT-qPCR y ELISA a partir de tejido foliar de papa var. Diacol Capiro. **b.** Razón de prevalencia entre la prueba RT-qPCR y ELISA para los virus PLRV, PVY y PVS. **c.** Porcentaje de muestras infectadas con los virus PLRV, PVS, PVX, PVY y PVV en dos zonas (zona uno: San Vicente Ferrer y Marinilla; zona dos: Sonsón) del oriente de Antioquia.

un valor promedio de absorbancia de 1,65 (SD = 0,24), seguido por la detección de PVY (55,5 %), con valores de absorbancia en el rango de 0,53 - 2,88 (Absorbancia promedio = 1,47; SD = 0,68) y por PLRV, que fue detectado en el 5,5% de las muestras (Absorbancia promedio = 0,413, SD = 0,004). De manera sorprendente, dada la alta prevalencia encontrada con la prueba de RT-qPCR, el virus PVX no se detectó mediante esta técnica en ninguna muestra (Figura 1). Al considerar los resultados obtenidos por subregiones se encontró que en las zonas uno y dos se presentaron los mismos porcentajes de prevalencia para los virus PVY y PLRV con un 55,5 % y 5,5 % respectivamente; mientras que PVS fue detectado en el 61,1 % de las muestras evaluadas en la zona uno y en el 100 % de las muestras de la zona dos.

### Medida de asociación entre los métodos de detección RT-qPCR y ELISA

La asociación entre la detección por RT-qPCR y ELISA para cada virus fue estimada mediante la razón de prevalencia (RP) que indica la fuerza de asociación entre la presencia o ausencia del virus y su detección por ambas pruebas. Para PLRV se obtuvo una RP de 7,5, que resultó estadísticamente significativa ( $p = 0,0005$ ), indicando que por cada muestra que resulta positiva para PLRV mediante ELISA, es posible detectar por RT-qPCR 7,5 muestras más infectadas por este virus (Figura 1). Para el caso del virus PVY, también se encontró una asociación estadísticamente significativa con un valor de RP igual a 1,6 ( $p = 0,003$ ), lo que indica que la técnica de RT-qPCR aquí empleada permitió detectar un 60 % más de muestras con este virus con respecto a la prueba de ELISA. Para el caso del virus PVS, la situación fue contraria, pues bajo las condiciones de este trabajo se encontró que la prueba ELISA tiene mejor desempeño, permitiendo detectar en niveles de 3,22 veces más muestras infectadas (RP = 3,22;  $p = 0,000$ ) que la RT-qPCR. Por otra parte, ya que la prueba ELISA no detectó la infección de PVX en ninguna de las muestras evaluadas, no fue posible calcular la razón de prevalencia para este virus; sin embargo, es importante enfatizar que con RT-qPCR se contabilizaron 27 muestras positivas para dicho virus y sólo nueve resultaron negativas, lo que claramente indica la utilidad de dicha prueba para el diagnóstico de este virus en papa. Finalmente, para el caso de PYV no se realizó comparación con la técnica ELISA, dado que hasta el momento no existen anticuerpos comerciales para la detección de este virus.

### Coinfección natural en papa de los virus PVY, PVS, PLRV, PVX y PYV

Una vez obtenidos los resultados de RT-qPCR se realizó un análisis de coinfección de los virus detectados en la totalidad de las muestras y en cada una de las subregiones del oriente Antioqueño. Los resultados indicaron la coinfección natural de PYV y PLRV en 5,6 % de las muestras, todas provenientes del municipio de Sonsón (zona dos); mientras

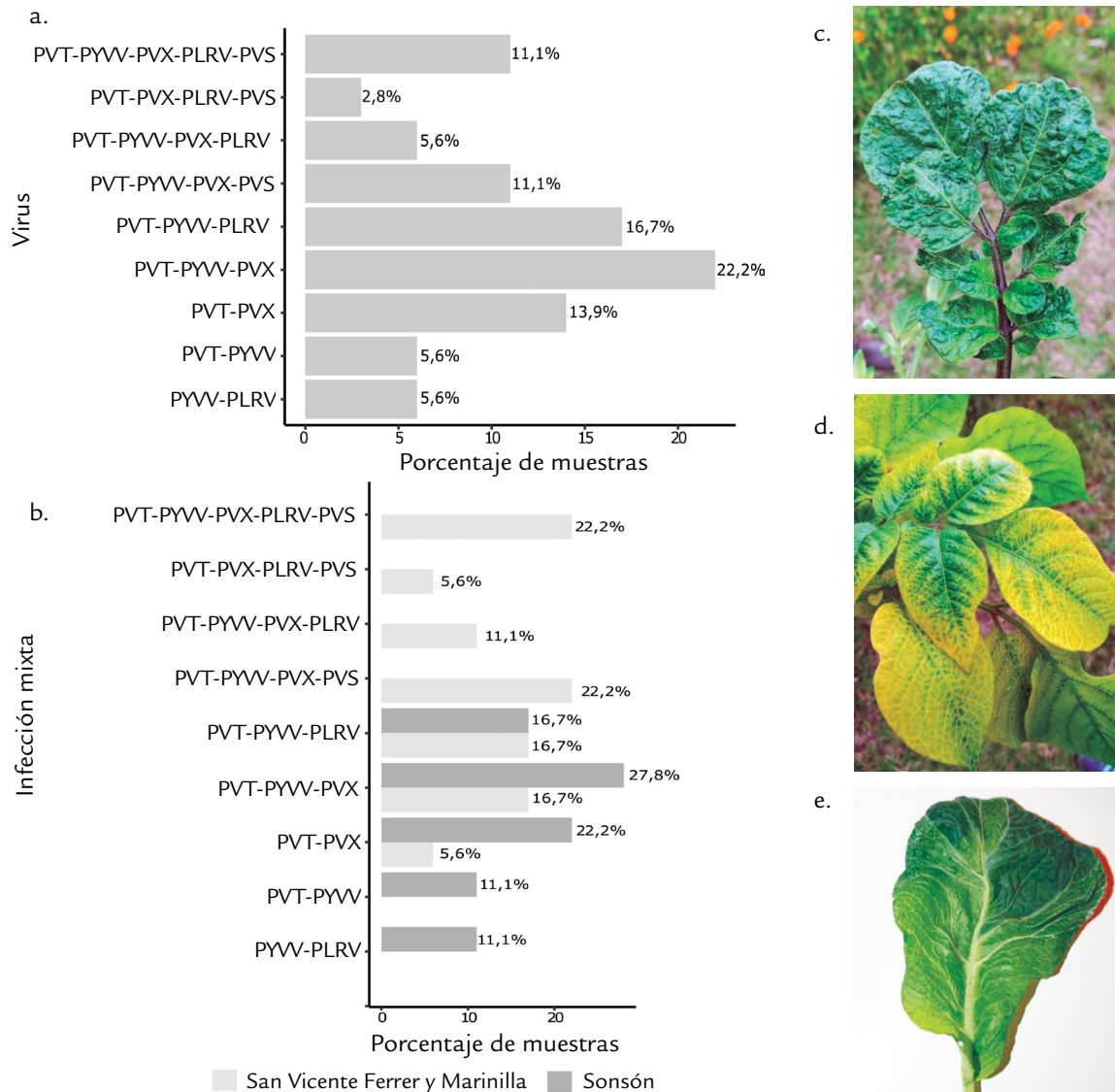
que coinfecciones de PVY y PVX fueron detectados en ambas subregiones con un 13,9 % de prevalencia (Figura 2).

Al analizar la cantidad de muestras que resultaron positivas para tres virus, se encontraron dos combinaciones: PVY/PYV/PVX y PVY/PYV/PLRV con niveles de prevalencia del 22,2 % y 16,7 %, respectivamente (Figura 2). Para el caso de la infección mixta por cuatro virus, se identificaron las siguientes combinaciones: PVY/PYV/PVX/PVS, PVY/PYV/PVX/PLRV y PVY/PVX/PLRV/PVS con niveles de detección de 11,1 %, 5,6 % y 2,8 %, respectivamente; aunque solamente en muestras de plantas provenientes de San Vicente Ferrer y Marinilla (Zona uno). En esta misma región también se identificó la coinfección de cinco de los virus en el 11,1 % del total de las muestras.

### Secuenciación de nueva generación (NGS) y análisis bioinformático

Como resultado de la secuenciación NGS del ARNdc extraído del tejido foliar sintomático de papa var. Diacol Capiro, se obtuvieron 36 911 012 *reads* pareados (3 728 012 212 nt), de los cuales el 1,66 % correspondieron a *reads* de origen vegetal. De esta forma, 36.298.708 *reads* equivalentes al 98,34% del total secuenciado se emplearon para el ensamblaje *de novo* utilizando Trinity y se obtuvieron 1213 *contigs* con un N50 de 1659. El análisis de dichos *contigs* con respecto a la base de datos del NCBI, identificó 324 de ellos como secuencias putativamente de origen viral y asociadas a genomas de virus de los géneros *Potexvirus* (272 *contigs*), *Endornavirus* (20 *contigs*), *Crinivirus* (11 *contigs*), *Potyvirus* (12 *contigs*), *Carlavirus* (6 *contigs*), *Polerovirus* (1 *contig*), *Caulimovirus* (1 *contig*) y *Cavemovirus* (1 *contig*). Una vez realizados los ensamblajes de los *reads* contra los genomas virales de referencia, se logró obtener los genomas completos de PVX (7.551 nt, Accesoión: MK558273), PVY (9.691 nt, Accesoión: MK563993), PVS (8.515 nt, Accesoión: MK563994), PYV (ARN1: 7.829 nt, Accesoión: MK618649; ARN2: 5.296 nt, Accesoión: MK618650 y ARN3: 3.875 nt, Accesoión: MK618651) y PLRV (5.881 nt, Accesoión: MK613996) (Figura 3).

Al comparar las secuencias genómicas obtenidas para cada uno de los virus con las depositadas en la base de datos GenBank, se encontró que todas presentaron un alto porcentaje de identidad con respecto a aislamientos previamente reportados en solanáceas del departamento de Antioquia (Colombia). Para el caso de PVX, se determinó un porcentaje de identidad de 98 % con aislamientos procedentes de plantas de tomate (ej. MH282866) del linaje de Eurasia; para PVY se presentó un 99,9 % de identidad (100 % de cobertura) con respecto a miembros de la raza PVY<sup>NTN</sup> (ej. MF176827 y KR149260) obtenidos en plantas de papa en este departamento; mientras que para PVS se presentó un 98,8 % de identidad (99 % de cobertura) con una secuencia de una cepa infectando plantas de tomate de la raza PVS Andina (PVS<sup>A</sup>) (ej. MH282867). Este análisis para el virus PYV indicó niveles de identidad de 99,5 % para



**Figura 2.** Infecciones mixtas en tejido foliar de plantas de papa var. Diacol Capiro y porcentaje de muestras identificadas con virus mediante RT-qPCR y síntomas asociados a enfermedades virales observados en plantas de papa var. Diacol Capiro en el Oriente de Antioquia. **a.** Porcentaje de muestras identificadas con virus en la totalidad de las muestras evaluadas (36 muestras). **b.** Porcentaje de muestras identificadas con virus por subregión evaluada (18 muestras por zona). **c.** Mosaico rugoso. **d.** Amarillamiento de venas. **e.** Deformación de tejido foliar.

el ARN1 (100 % de cobertura) con respecto a cepas del virus obtenidas en plantas de papa criolla y tomate (ej. KR998193 y KX573901) y de 98,5 % (100 % de cobertura) para el ARN2 y ARN3 con cepas infectando papa criolla y lulo (*S. quitoense*) en Antioquia (ej. KR998194 y MG696858). Finalmente, el genoma de PLRV presentó un 98,2 % de identidad con respecto a aislamientos de este virus reportados en papa en Colombia (100 % de cobertura; ej. KX712226).

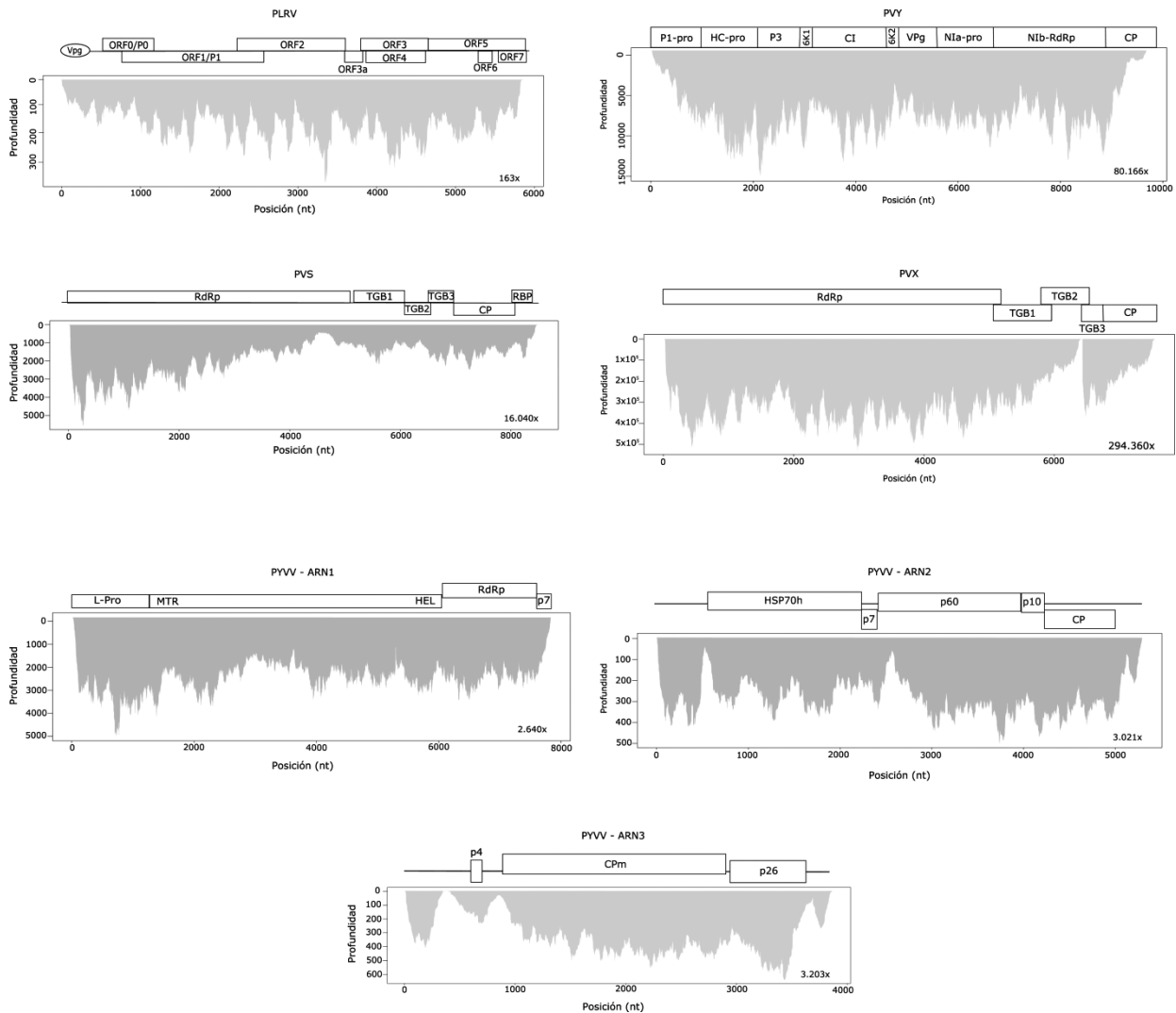
### RT-PCR y secuenciación Sanger

Mediante RT-PCR convencional se obtuvieron al menos tres amplicones de la región de la cápside (CP) que correspondieron al tamaño esperado para PVX (562 pb), PVY (480 pb), PVS (421 pb), PYVW (495 pb) y PLRV (330

pb). Estas secuencias en conjunto con los segmentos de CP obtenidos en los ensamblajes por NGS, fueron utilizadas en los análisis filogenéticos para cada virus (Figura 4). Las secuencias de los amplicones de PVX y la secuencia de NGS se ubicaron en el clado correspondiente al linaje americano de este virus, con un valor de *bootstrap* de 96 % con respecto a secuencias de virus aislados en papa y tomate de diferentes países del mundo y de los departamentos colombianos de Antioquia, Nariño y Cundinamarca.

El análisis para PVY ubicó la secuencia NGS (MK563993), y de los aislamientos 72SE (MK544864), 71SE (MK544863) y 8MAY (MK544860) en el clado correspondiente a la raza PVY<sup>NTN</sup> con un valor de *bootstrap* de 92 %; mientras que en el clado que representa la raza PVY<sup>N</sup> con un valor de *bootstrap* de





**Figura 3.** Perfiles de profundidad de la secuenciación de nueva generación (NGS) realizada a partir de ARNdc de una mezcla de tejido foliar de papa var. Diacol Capiro con síntomas de infección viral obtenidas en el oriente de Antioquia. En la parte superior de cada figura se representa la estructura del genoma para cada virus.

95 % se agruparon las secuencias de los aislamientos 27ABR (MK544861), 28ABR (MK544862) y 73SE (MK544865). Estas secuencias presentaron niveles de identidad del 99 % con secuencias de PVY previamente depositadas por Muñoz *et al.*, (2016) y Riascos *et al.*, (2018) obtenidas en muestras de papa de Antioquia. Por otra parte, las secuencias de PVS fueron ubicadas en el clado correspondiente al linaje PVS<sup>A</sup>, compartiendo un nivel de identidad del 97 % con una cepa infectando papa criolla y otra recientemente reportada en tomate. Para el caso de PVV, las cinco secuencias obtenidas compartieron niveles de identidad del 100 % con respecto a secuencias de este virus reportadas en los departamentos de Antioquia y Cundinamarca obtenidas en papa, papa criolla y tomate. Finalmente, el análisis filogenético de las cuatro secuencias virales obtenidas en este estudio para PLRV, compartieron niveles de identidad superiores al 99 % con

diferentes secuencias de cepas provenientes de cultivos de papa de Colombia y de otros países.

## DISCUSIÓN

Las enfermedades virales en el cultivo de la papa representan una de las principales causas de las reducciones en los rendimientos y adicionalmente su efecto negativo se incrementa cuando se considera la calidad de los tubérculos, tanto para procesamiento industrial, como para su utilización como material de siembra (Haltermann *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2013; Villamil-Garzón *et al.*, 2014). Sin embargo, la asociación entre pérdidas en este cultivo y la ocurrencia de infecciones virales no siempre es fácil de conocer, ya que la manifestación de los síntomas generalmente ocurre después

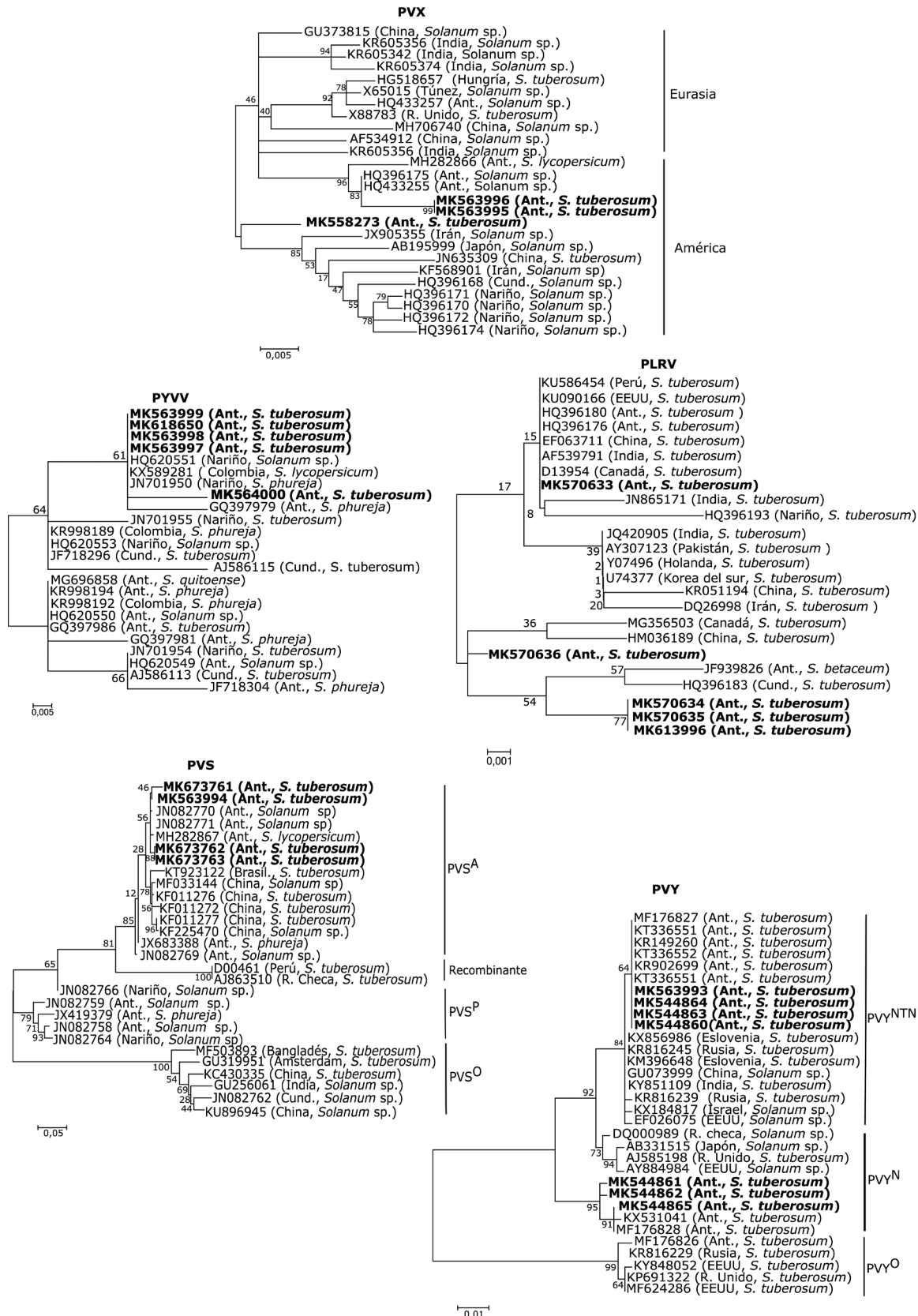


Figura 4. Árboles filogenéticos generados a partir de las secuencias que codifican para la cápside viral (CP) de los virus PYVV, PLRV, PVS, PVY y PVX procedentes de tejido foliar de plantas de papa var. Diacol Capiro. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap* y los nombres en la derecha corresponden a las denominaciones registradas en la literatura para variantes y/o linajes principales identificados en cada especie viral.

de largos períodos de infección, razón por la cual su manejo recae fundamentalmente en la posibilidad de detectar los virus en condiciones asintomáticas y más importante aún, directamente en los tubérculos-semilla, para lo que se requieren técnicas de diagnóstico altamente sensibles como las pruebas moleculares y serológicas (Fang y Ramasamy, 2015; Stammler *et al.*, 2018). Este trabajo surgió de dicha necesidad y tuvo como principal objetivo aumentar el conocimiento del viroma y de la variabilidad genética de las especies de virus detectadas en cultivos de papa var. Diacol Capiro en dos zonas del oriente Antioqueño.

Inicialmente, utilizando la técnica de RT-qPCR se logró identificar la presencia de cinco (PVX, PVY, PVS, PVV y PLRV) de los diez virus evaluados en este estudio, siendo PVY el de mayor prevalencia (88,9 %), seguido por PVX y PVV (75 %) y finalmente por PLRV (41,7 %) y PVS (25 %). En la actualidad, la prueba de ELISA se considera el test *Gold Standard* en los procesos de certificación de tubérculos-semilla de papa y para el diagnóstico de virus de importancia cuarentenaria (Haltermann *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2013; Stammler *et al.*, 2018); sin embargo, en este estudio se encontró que la técnica de ELISA detectó un menor número de muestras infectadas con los virus PVY (55,5 %), PLRV (5,5 %) y PVX (0 %). Estos resultados no resultan sorprendidos, por cuanto existen reportes que señalan que la sensibilidad de la RT-qPCR para la detección de virus de plantas varía entre 10.000 y 100.000.000 veces más que la prueba de ELISA (Agindotan *et al.*, 2007; Joo-jin *et al.*, 2014; Nikitin *et al.*, 2018; Stammler *et al.*, 2018) y dicha observación se ha confirmado también en diferentes trabajos realizados en Antioquia sobre virus de papa. Así por ejemplo, García Ruíz *et al.*, (2016) reportaron niveles de infección con el virus PVX en un 93,75 % de muestras de tubérculos-semilla de papa y papa criolla cuando emplearon RT-qPCR, mientras que al usar la técnica de ELISA, sólo detectaron el virus en el 50 % de éstas.

Al realizar el análisis de asociación calculado mediante la razón de prevalencia, se evidenció que el uso de la técnica de RT-qPCR permite la detección de los virus PLRV y PVY a partir de tejido foliar 7,5 y 1,6 veces más, respectivamente que la prueba ELISA.

La situación encontrada para la detección del virus PVS fue contraria a lo antes expuesto, pues el virus se encontró mediante ELISA en el 80,5 % de las muestras y tan sólo en el 25 % de éstas, cuando se utilizó RT-qPCR. Dicha diferencia, indica la necesidad de diseñar nuevos cebadores que cubran toda la variabilidad genética que presenta PVS en los Andes colombianos y que ha sido claramente demostrada en estudios filogenéticos recientes (Gutiérrez *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2013; Santillan *et al.*, 2018), en donde se han encontrado al menos tres linajes diferentes para este virus: PVS<sup>A</sup>, PVS<sup>O</sup> y PVS<sup>P</sup>; este último hasta ahora solo encontrado en Antioquia (Colombia) y denominado PVS<sup>P</sup> haciendo referencia a su detección inicial en papa criolla

(*S. phureja*) (Vallejo *et al.*, 2016). Ya que las secuencias de este linaje sirvieron de base para el diseño de los cebadores PVS\_gen\_F y qPVS\_gen\_R utilizados en el presente trabajo, es posible inferir que dichos cebadores presentan desajustes (*mismatches*) con respecto a sus regiones de unión en algunos genotipos de este virus que se encuentran infectando las muestras evaluadas; mientras que los anticuerpos empleados en las pruebas de ELISA cubren un rango mayor de variación, dada su unión con regiones muy conservadas de la proteína de la cápside de este virus.

Un análisis especial merece el caso de la detección de PVX, pues este virus no se encontró en ninguna de las muestras mediante pruebas de ELISA, a pesar de que previamente se había detectado en el 75 % de éstas utilizando RT-qPCR. Dicha situación, es un claro ejemplo de la necesidad de utilizar en virología vegetal, al menos dos pruebas que tengan moléculas diana diferentes, pues de otra forma se puede reportar falsos negativos que afectan los programas manejo, certificación de semilla o de mejoramiento genético por resistencia a virus. En este caso, la falta de detección por ELISA puede explicarse por el bajo título viral que se infiere presentaba este virus en los tejidos foliares evaluados, pues los valores de Ct encontrados en RT-qPCR tuvieron un promedio de 19,54, muy distantes del alcanzado en virus como PVY (Ct = 8,96); o alternativamente por la falta de reconocimiento de las variantes virales que PVX presenta sobre solanáceas andinas en Colombia y que han sido recientemente reportadas en cultivos de papa por Gil *et al.*, (2012) y García Ruíz *et al.*, (2016) y en uchuva por Gutiérrez *et al.*, (2015).

Considerando los resultados globales obtenidos por RT-qPCR, fue evidente que en los cultivos de papa de la zona uno (San Vicente Ferrer y Marinilla) se presentaron los mayores porcentajes de prevalencia viral, siendo detectados los virus PVY y PVX en el 100 % de las muestras analizadas, mientras que PVV, PLRV y PVS se encontraron en el 72 %, 56 % y 50 % de éstas, respectivamente. En la otra subregión (zona dos), los porcentajes de detección viral fueron en general menores (PVY y PVV = 78 %, PVX = 50 %, PLRV = 28 %), e incluso el PVS no se detectó en ninguna muestra; aunque se debe considerar el problema mencionado anteriormente con los cebadores para este virus. Estos hallazgos llaman la atención sobre los muy altos niveles de infección viral que presentan las plantas de papa var. Diacol Capiro en el oriente de Antioquia y que entre otros factores contribuyen a los bajos rendimientos que presenta este cultivo (20,5 t/ha) cuando se compara con los rendimientos de papa alcanzados en países desarrollados como Estados Unidos (49,02 t/ha) y Holanda (41,9 t/ha), que emplean semilla certificada, reglamentan las fechas de siembra y cosecha de papa y realizan diversas prácticas culturales para el manejo de insectos vectores y de arvenses que sirven como reservorios de los virus; aunque se deben considerar las diferencias entre las variedades cultivadas y las condiciones

geomorfológicas de los lotes de cultivo de dichos países, que favorecen la mecanización y el uso de sistemas de riego y drenaje, entre otros aspectos (Halterman *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2013; FAOSTAT, 2019).

En adición, en este estudio se encontró que la ocurrencia de coinfecciones virales es frecuente en la región del oriente de Antioquia, presentándose la infección mixta de PVY, PVV y PLRV como la más frecuente (en el 22 % de las muestras), y llegándose incluso a detectar la coinfección de cinco virus en el 11,1 % de las muestras foliares evaluadas.

Las infecciones mixtas de virus de plantas son bastante comunes en la naturaleza y las interacciones virus-virus en el hospedante ya sean sinérgicas y/o antagonistas, pueden tener consecuencias biológicas, ecológicas y epidemiológicas (ej. cambios en sintomatología, variaciones de la estructura genética de los virus, diferencias en la interacción con vectores, etc) que representan un gran desafío analítico al considerar un conjunto de datos multivariados con distribuciones de probabilidad diferentes, dependencias de escala espacial o temporal y anomalías taxonómicas; sin embargo su estudio detallado ayudan a entender mejor los patrones de transmisión viral, riesgos de infección, evolución del rango de hospedantes, resurgimiento de enfermedades y finalmente los efectos de estos patógenos sobre los rendimientos de los cultivos o sobre la calidad de sus productos o material de siembra (Syller, 2012; McLeish *et al.*, 2019). En Colombia, se han realizado estudios de diagnóstico de infecciones mixtas de algunos virus en papa, siendo reportado por ejemplo que en la colección central colombiana de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* se presentaban niveles de coinfección con los virus PVX y PLRV del 8,96 %; del 19,4 % con PVS, PVY y PLRV; del 16,4 % con PVS, PVX y PLRV y del 20,9 % con PVS, PVX, PVY y PLRV (Guzmán *et al.*, 2010). Así mismo, en 2014, se reportó la infección mixta de PVV y PVY en cultivos de papa del departamento de Cundinamarca con una prevalencia del 32 %, y en 2015 un estudio similar en el municipio de Subachoque del mismo departamento, sobre plantas asintomáticas de papa criolla y papa var. Diacol-Única registró niveles de coinfección para estos dos virus cercanos al 33 % (Villamil-Garzón *et al.*, 2014; Alfaro-García y Franco Lara, 2015).

Finalmente, en el presente estudio se utilizó la reciente metodología molecular de secuenciación de nueva generación (NGS), como base para la confirmación de la circulación de los virus detectados mediante pruebas de RT-qPCR y ELISA en cultivos de papa var. Diacol Capiro en el oriente de Antioquia. Los análisis bioinformáticos realizados confirmaron la presencia en el transcriptoma bajo análisis de secuencias de los genomas de los virus PVX, PVY, PVS, PVV y PLRV y adicionalmente se detectaron secuencias asociadas a miembros del género *Endornavirus*, que corresponde a virus de ARN de doble cadena que carecen de cápside,

con genomas de 9,8 - 17,6 kb y un solo ORF que codifica para una poliproteína de 3000 - 6000 aminoácidos con dominios funcionales para metil-transferasa, helicasa viral, glucosil-transferasa y una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RDRP) (Muñoz-Baena *et al.*, 2017). También se hallaron dos *contigs* asociados a genomas de caulimovirus y cavemovirus, dos grupos de virus con genomas de ADN que posiblemente correspondan a transcritos derivados de virus defectuosos integrados en el genoma de la papa. De gran interés resultará en el futuro evaluar la identidad a nivel de especie de estos tres virus putativos y confirmar para aquellos de ADN la hipótesis de su integración al genoma del hospedante vegetal. Las secuencias derivadas de los genomas completos de los cinco virus detectados, así como aquellas de la cápside viral y obtenidas por RT-PCR convencional/secuenciación Sanger, aumentan la información genómica disponible para estos virus en las bases de datos moleculares y permitirán en un futuro cercano, su uso para el diseño de nuevos cebadores y sondas que se ajusten a los niveles de variación encontrados para dichos virus en la región andina de Colombia y en otras partes del mundo.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó mediante RT-qPCR, la prevalencia de diez virus de ARN en tejido foliar de plantas de papa var. Diacol-Capiro del oriente de Antioquia (Colombia). Ninguna muestra resultó positiva para los virus PVA, PVV, TaLMV, ToRSV y PMTV, pero sí para los virus PVX, PVY, PVS, PLRV y PVV, que alcanzaron niveles de prevalencia en el rango de 25 % a 88,9 %, siendo frecuentes las infecciones mixtas desde dos hasta cinco virus en diferentes combinaciones.

A partir del cálculo de razón de prevalencia (RP) como medida de asociación o efecto entre las pruebas de detección viral de RT-qPCR y ELISA, se determinó que la utilización de RT-qPCR ofrece niveles superiores de detección en valores de  $RP = 1,6$  y  $RP = 7,5$  para los virus PVY y PLRV; mientras que para el caso de PVS, la situación fue contraria, pues bajo las condiciones de este trabajo se encontró que mediante ELISA se detecta en niveles de 3,22 veces más muestras infectadas que con RT-qPCR. El virus PVX sólo se detectó utilizando RT-qPCR y PVV no se evaluó en ELISA, pues hasta el momento no se cuentan con anticuerpos comerciales para este virus.

La secuenciación de nueva generación (NGS) del ARNdc de la mezcla de tejido foliar sintomático de plantas de papa var. Diacol Capiro confirmó la circulación de los cinco virus (PVX, PVY, PVS, PVV y PLRV) en el oriente de Antioquia, así como también la obtención de sus genomas completos y la evaluación de sus niveles de variación con respecto a otras cepas reportadas en Colombia y en otros países.

## 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 y contó con la asesoría estadística de la Profesora María Osley Garzón de la Facultad de Medicina de la Universidad CES.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- 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: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.12.012>
- Agrios G. *Plant pathology*. 5th ed. New York, NY: Elsevier; 2005.
- Alfaro García JP, Franco Lara L. Potato virus Y (PVY) Y Potato yellow vein virus (PYV) en infecciones mixtas no causan síntomas atípicos en plantas de papa. *Univ Mil Nueva Grana*. 2015;11(2):26-37. Doi: <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.1297>
- Álvarez D, Gutiérrez P, Marín M. Molecular Characterization of Potato virus V (PVV) Infecting *Solanum phureja* Using Next-Generation Sequencing. *Acta Biológica Colomb*. 2016;21(3):521-531. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n3.54712>
- Álvarez D, Gutiérrez P, Marín M. Secuenciación del genoma del Potato yellow vein virus (PYV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro* 2017;29(1):3-14.
- Baena LM, Andrés P, Sánchez G, Montoya MM. Genome Sequencing of Potato yellow vein virus (PYV) Strain Infecting *Solanum lycopersicum* in Colombia. *Acta Biológica Colomb*. 2017;22(1):5-17. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.59211>
- Beemster ABR, Bokx A de. Survey of properties and symptoms. In: De Bokx JA, Want JPH van der (eds.). *Viruses potatoes seed potato Prod* (2<sup>nd</sup> edition). Netherlands: Wageningen University; 1987, p. 84-113.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Genome Anal*. 2014;30(15):2114-2120. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Fang Y, Ramasamy R. Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. *Biosens*. 2015;5(3):537-561. Doi: <https://doi.org/10.3390/bios5030537>
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/publications/sofa/2008/es/>. Consultado: 20 de febrero de 2019
- FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura. 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Consultado: 7 de marzo de 2019
- Fedepapa. El agricultory su papel en el país. *Revista Fedepapa*. 2018;43:3.
- Frost KE, 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: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0477-FE>
- Gallo Y, Toro LF, Jaramillo H, Gutiérrez PA, Marín M. Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia). *Rev Colomb Ciencias Hortícolas*. 2018;12(2):281-292. Doi: <http://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7692>
- García Ruíz D, Olarte Quintero MA, Gutiérrez Sánchez PA, Marín Montoya MA. 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. *Rev Colomb Biotecnol*. 2016;18(1):104-111. Doi: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.51389>
- Gil JF, Gutiérrez P, Cotes JM, González EP, MA. Caracterización genotípica de aislamientos Colombianos del Potato Mop Top Virus (PMTV, Pomovirus). *Actual Biol*. 2011;33(94):69-84.
- Gil JF, Cotes JM, Marín MA. 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.
- Gil JF, Cotes JM, Marín MA. Incidencia visual de Síntomas asociados a enfermedades virales en cultivos de papa de Colombia. *BSAA*. 2013;11(2):101-110.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29(8):1072-1075. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gutiérrez Sánchez PA, Alzate JF, Marín Montoya M. Pirosecuenciación del genoma de una cepa andina de Potato virus S (PVS, Carlavirus) infectando *Solanum phureja* (Solanaceae) en Colombia. *Rev Fac Ciencias Básicas*. 2012;8(1):84-93. Doi: <https://doi.org/10.18359/rfcb.2098>
- Gutiérrez PA, Alzate JF, Marín-Montoya MA. Complete genome sequence of a novel potato virus S strain infecting *Solanum phureja* in Colombia. *Arch Virol*. 2013;158(10):2205-2208. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1730-7>

- Gutiérrez P, 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: <https://doi.org/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):225–234.
- Halterman D, Charkowski A, Verchot J. Potato, Viruses, and Seed Certification in the USA to Provide Healthy Propagated Tubers Planted into field. *Pest Technol*. 2012;6(Special Issue 1):1–14.
- Hameed A, Iqbal Z, Asad S, Mansoor S. Detection of Multiple Potato Viruses in the Field Suggests Synergistic Interactions among Potato Viruses in Pakistan. *Plant Pathol J*. 2014;30(4):407–415. Doi: <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2014.0039>
- Hass B, Papanicolaou A, Yassour M. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc*. 2013; 8:1494–1512. Doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- He Z, Larkin R, Honeycutt W. Sustainable Potato Production: Global Case Studies. New York: Springer; 2012. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4104-1>
- Joo-jin J, Ho-jong J, Jeaejong N. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Res Plant Dis*. 2014;20(3):819–845. Doi: <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Brief communication. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870–1874. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2013;9(4):357–359. Doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- MADR - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Cadena de papa, Indicadores e Instrumentos enero 2018. Indicadores Generales. 2018. Disponible en: <https://www.minagricultura.gov.co/paginas/default.aspx>. Consultado: 11 de marzo de 2019.
- McLeish MJ, Fraile A, García-Arenal F. Evolution of plant–virus interactions: host range and virus emergence. *Curr Opin Virol*. 2019;34:50–55. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.003>
- Medina C, Gutiérrez P, Marín M. Detección del Potato Virus Y (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS-ELISA Y qRT-PCR en Antioquia (Colombia). *Bioagro*. 2015;27(2):83–92.
- Medina H, Gutiérrez P, Marín M. 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 Agron*. 2017;66(4):625–632. Doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v66n4.59753>
- Mesa M, González M, Gutiérrez P, Marín M. Diagnóstico serológico y molecular del Potato leafroll virus (PLRV) en tubérculos-semilla de papa en Antioquia, Colombia. *Acta Agron*. 2016;65(2):204–210. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n2.50764>
- Mumford RA, Walsh K, Barker I, Boonham N. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus Using a Multiplex Real-Time Fluorescent Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. *Virology*. 2000;90(5):448–453. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.5.448>
- Muñoz D, Gutiérrez P, Marín M. Detección y caracterización molecular del Potato virus Y (PVY) en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) del norte de Antioquia, Colombia. *Protección Veg*. 2016;31(1):9–19.
- Muñoz-Baena L, Marín-montoya M, Gutiérrez PA. Genome sequencing of two Bell pepper endornavirus (BPEV) variants infecting *Capsicum annum* in Colombia. *Agron Colomb*. 2017;35(1):44–52. Doi: <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n1.60626>
- 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.
- Nikitin MM, Statsyuk NV, Frantsuzov PA, Dzhavakhiya VG, Golikov AG. Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2018;124(3):797–809. Doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13686>
- Nolte P, Whitworth JL, Thornton MK, McIntosh CS. Effect of Seedborne Potato virus Y on Performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody Potato. *Plant Dis*. 2004;88(3):248–252. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.3.248>
- Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rowhani A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses. *J Virol Methods*. 2008;149(2):292–299. Doi: <http://www.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.012>
- Pagan I, García-Arenal F. Population Genomics of Plant Species. Cham: Springer; 2018: p. 33. Doi: [https://doi.org/10.1007/13836\\_2018\\_15](https://doi.org/10.1007/13836_2018_15)
- Riascos M, Gutiérrez Sánchez PA, Marín Montoya MA, Montoya MAM. Identificación molecular de Potyvirus infectando cultivos de papa en el oriente de Antioquia (Colombia). *Acta biol. Colomb*. 2018;23(1):39–50. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.65683>
- Salazar L. Los virus de la papa y su control. Lima: Centro Internacional de la Papa CIP (Perú). 1995. 31p.
- Santillan FW, Fribourg CE, Adams IP, Gibbs AJ, Boonham N, Kehoe MA, *et al*. The Biology and Phylogenetics of Potato virus S Isolates from the Andean Region of South America. *Plant Dis* 2018;102(5):869–885. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1414-RE>
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *NatEcoEvol*. 2019;3:430–439. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

- Savenkov EI, Valkonen JP. Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato Leaf Roll Virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology* 2001;283(2):285–293. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0838>
- Singh RP, 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. *J Virol Methods*. 1995;55(1):133–143.
- Singh M, Singh RP, Fageria MS. Optimization of a Real-Time RT-PCR Assay and its Comparison with ELISA, Conventional RT-PCR and the Grow-out Test for Large Scale Diagnosis of Potato virus Y in Dormant Potato Tubers. *Am J Potato Res*. 2012;90:43–50. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12230-012-9274-z>
- Stammler J, Oberneder A, Kellermann A, Hadersdorfer J. Detecting potato viruses using direct reverse transcription quantitative PCR (DiRT-qPCR) without RNA purification: an alternative to DAS-ELISA. *Eur J Plant Pathol*. 2018;152:237–248. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1468-x>
- Syller J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(2):204–216. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00734.x>
- Vallejo D, Gutiérrez P, Marín M. Genome characterization of a Potato virus S (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. *Agron Colomb*. 2016;34(1):51–60. Doi: <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1.53161>
- Valverde R, Nameth S, Jordan R. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis* 1990;74:255–258. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-74-0255>
- Vance VB. Replication of Potato Virus X RNA Is Altered in Coinfections with Potato Virus Y. *Virology*. 1991;182(2):486–494. Doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90589-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90589-4)
- Villamil-Garzón A, Cuellar WJ, Guzmán-Barney M. Coinfección natural de potato yellow vein virus y potivirus en cultivos de *Solanum tuberosum* en Colombia. *Agron Colomb*. 2014;32(2):213–223. Doi: <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n2.43968>
- Villegas MD, Montoya MM, Gutiérrez PA. Genome comparison and primer design for detection of Tamarillo leaf malformation virus (TaLMV). *Arch Phytopathol Plant Prot*. 2017;50(13-14):713–726. Doi: <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1370934>
- Wilm A, Poh P, Aw K, Bertrand D, Hui G, Yeo T, *et al*. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acid Res*. 2012;40(22):11189–11201. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks918>
- Yang L, Nie B, Liu J, Song B. A Reexamination of the Effectiveness of Ribavirin on Eradication of Viruses in Potato Plantlets in vitro Using ELISA and Quantitative RT-PCR. *Am J Potato Res*. 2014;91(3):304–311. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12230-013-9350-z>
- Zhang W, Zhang Z, Fan G, Gao Y, Wen J. Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses. *J Gen Plant Pathol*. 2017;83(1):33–45. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0688-1>