

Detección serológica y caracterización molecular de *Potato virus S* (PVS, *Carlavirus*) en cultivos de papa de Colombia

José Fernando Gil¹, José Miguel Cotes² & Mauricio Marín¹

1. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Cra 64 x Calle 65, Autopista Norte, Medellín, Colombia; josefergil@gmail.com, mamarinm@unal.edu.co
2. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Departamento de Ciencias Agronómicas, Cra 64 x Calle 65, Autopista Norte, Medellín, Colombia; jmcotes@unal.edu.co

Recibido 19-IV-2012. Corregido 20-IX-2012. Aceptado 18-X-2012.

Abstract: Detection and molecular characterization of *Potato virus S* (PVS, *Carlavirus*) from Colombia. In Colombia, potato crops are affected by a wide variety of viruses such as PVY, PLRV, PVX, PMTV and PVS. Unfortunately, there are very few studies on the biology, distribution and pathogenicity of these viruses; this situation is even worse for the latent virus PVS. In this work, we evaluated the presence of PVS in four Colombian provinces (Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Nariño) by the use of ELISA. We also studied the degree of molecular variation by sequence comparison of a segment of the gene encoding for the viral coat protein. In average, PVS was detected in 40% of 320 analyzed samples of potato leaves; the highest levels were observed in the East of Antioquia (49%) and Pasto (Nariño) (47%), while in the other regions ranged between 35% and 42%. Analysis of sequence revealed the presence of two PVS strains in Colombia: three isolates were associated to PVS^O (Ordinary) and twelve belonged to PVS^A (Andean). A high diversity was observed among PVS^A strains with percent identities in the range of 88-99%. These findings highlight the importance of strengthening seed certification programs and quarantine measures in Colombia for viruses like PVS, which can cause losses of up to 20% in potato crops and even higher in mixed virus infection. Rev. Biol. Trop. 61 (2): 565-575. Epub 2013 June 01.

Key words: *Betaflexiviridae*, DAS-ELISA, RT-PCR, *Solanum tuberosum*, viral capsid.

El *Potato virus S* (PVS) es un miembro del género *Carlavirus*, familia *Betaflexiviridae*, que incluye seis géneros y 66 especies de virus (Adams & Kreuze 2008, ICTV 2012). Este virus presenta forma filamentosa de 610-710nm y un genoma de ARN de cadena sencilla con orientación positiva (ARNss+) de cerca de 8 500 nucleótidos (nt). El extremo 5' del ARN está protegido con una caperuza y el 3' tiene una cola de poli-Adenina. El genoma codifica para seis genes; el primero codifica para un polipéptido de 223kDa que contiene motivos conservados para una helicasa, metiltransferasa y ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp). Los genes 2, 3 y 4 comprenden el triple bloque de genes (TGB), que participan en el movimiento intra e intercelular del virus, mientras

que el gen 5 de ~970nt, codifica para la cápside viral (CP) de 34kDa. Este gen se traslapa con el gen 6 que codifica para una proteína rica en cisteína de unión a ácidos nucleicos (NABP), involucrada en la transmisión por áfidos, silenciamiento de genes del hospedante y en la replicación viral (Matoušek *et al.* 2005, Lin *et al.* 2009, Salari *et al.* 2011).

El PVS es considerado como uno de los virus que dependen de la papa (*Solanum tuberosum*) para su supervivencia y diseminación, por lo que es de esperar que su mayor variabilidad se encuentre en la región andina, centro de origen de su hospedante (Salazar 1995). En muchas variedades de papa cultivadas en el mundo, el PVS es asintomático o causa síntomas suaves, por lo que se denomina

como un virus latente (Salari *et al.* 2011). Sin embargo, sus niveles de incidencia pueden alcanzar hasta el 100% en un cultivo o región, gracias a su eficiente transmisión mecánica, por tubérculos-semilla y por áfidos (Wardrop *et al.* 1989). A pesar de la condición latente de este virus, se ha estimado que puede ocasionar pérdidas en los cultivos de papa, que oscilan entre un 10 y 20% (Rose 1983, Dolby & Jones 1987, Jeffries 1998). Adicionalmente, el PVS presenta una reacción sinérgica con otros virus como el *Potato virus X* (PVX), que conduce a que ocasione síntomas más severos, aumente su tasa replicativa y por ende, cause un mayor efecto detrimental sobre el número total de tubérculos producidos por las plantas (Nyalugwe *et al.* 2012).

Tradicionalmente, se han descrito dos razas de este virus: PVS^O y PVS^A (Ordinaria y Andina, respectivamente), con base en su reacción diferenciada (local o sistémica) sobre plantas indicadoras de *Chenopodium quinoa*; sin embargo, la denominación de las razas no implica su ocurrencia en una región específica, por cuanto ambas variantes han sido detectadas en Europa, América, Asia y Oceanía (MacKenzie *et al.* 1989, Matoušek *et al.* 2000, Cox & Jones 2010). Las identidades en porcentaje de nt entre ambas razas, en las secuencias que codifican para la proteína de cápside (CP) y la proteína de 11kDa son de 81% (93% para aminoácidos (aa)) y 83% (77% para aa), respectivamente (Lin *et al.* 2009). En estas proteínas también se encuentra el mayor número de aa que difiere entre ambas razas, particularmente hacia el extremo N-terminal de CP (Foster & Mills 1992, Matoušek *et al.* 2000).

PVS^A induce síntomas más severos en las plantas infectadas, incluyendo senescencia prematura y pérdida de hojas (Jeffries 1998), además es más eficientemente transmitido por áfidos que aislamientos de PVS^O, siendo las especies *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Aphis fabae* y *A. nasturtii* sus vectores principales (Wardrop *et al.* 1989, Lambert *et al.* 2012). Estudios recientes han encontrado variantes de PVS^O con capacidad de generar una invasión sistémica en *C. quinoa*, pero

que son filogenéticamente distantes a PVS^A (Matoušek *et al.* 2005, Lambert *et al.* 2012) y que por tanto, han recibido la denominación de PVS^{O-CS} (CS: *Chenopodium systemic*). Sin embargo, se desconoce la existencia de aislamientos de PVS^A que no causen infección sistémica en *C. quinoa* (Cox & Jones 2010).

En Colombia, los estudios de genotipificación e incidencia de virus en cultivos de papa son muy escasos. Sin embargo, los pocos realizados indican altos niveles de infección de *Potato virus Y* (PVY) (Gil *et al.* 2011a) y *Potato leafroll virus* (PLRV) (Gil *et al.* 2011b) en cultivos de las principales regiones productoras de papa en este país, así como en la Colección Central Colombiana (CCC) de papa, una colección de germoplasma que consta de cerca de 2900 accesiones de *S. tuberosum* subespecies *andigena* y *tuberosum*, *S. phureja*, *S. chaucha* y especies silvestres como *S. colombianum* y *S. estradae* (Corpoica 2005). En este sentido, en un estudio que evaluó mediante pruebas de inmunopresión el estado de sanidad viral de algunas accesiones de la CCC, se encontró que el virus más prevalente entre las 34 accesiones bajo estudio fue PVS, con un 61.3% de detección (Franco-Lara *et al.* 2009); mientras que Gúzman *et al.* (2010) encontraron a partir de pruebas de DAS-ELISA, que el 85% de las 585 accesiones evaluadas presentaban reacción positiva con anticuerpos específicos para PVS. Estos autores también encontraron que PVS no se encontraba como el único virus afectando las accesiones, sino que en la mayoría de casos, hacía parte de complejos virales con *Potato virus X* (PVX), PVY y PLRV, por lo que no se descartan efectos sinérgicos en la expresión de síntomas y en la reducción de la producción. Dichos resultados conducen a cuestionar la importancia que juega el PVS en la producción de papa de este país suramericano, ya que debido a su condición de virus latente, es muy poco lo que se conoce sobre su biología, distribución y efecto en los cultivos de papa de Colombia. Con el fin de acortar la brecha de información sobre este virus, se realizó el presente estudio, para determinar los niveles de detección de PVS en muestras de cultivos de papa de cuatro

departamentos de Colombia, y realizar una evaluación de la variabilidad genética de 15 aislamientos del virus, a partir de la secuenciación parcial del gen CP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección del PVS: Para esta evaluación se realizó, muestreos aleatorios en ocho cultivos de *S. tuberosum* ssp. andigena de las variedades Capiro, Parda Pastusa, Esmeralda, Suprema, Unica, Nevada, y de *S. phureja* variedad Criolla Colombia, ubicados en tres zonas productoras del departamento de Antioquia y Cundinamarca y en dos zonas de Boyacá y Nariño, respectivamente; durante 2009-2010 (Cuadro 1). En cada cultivo se realizó una colección aleatoria de cuatro muestras conformadas por dos folíolos jóvenes del extremo apical de las hojas, para generar una muestra compuesta. Las muestras se secaron a temperatura ambiente, se empacaron en bolsas plásticas selladas y se enviaron por servicio de *courier* al laboratorio para su conservación a -80°C .

En todos los casos, el período transcurrido entre la colecta y almacenamiento de las muestras no superó las 24hr. Las 320 muestras (4 muestras x 8 cultivos x 10 zonas) se evaluaron para la detección de PVS mediante pruebas de DAS-ELISA con anticuerpos policlonales de la compañía Agdia (Indiana, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia), incluyendo en cada prueba un control positivo y un control negativo (suministrados en forma liofilizada por el fabricante). Los pozos fueron considerados con reacción positiva cuando la lectura de absorbancia a 405nm presentó un valor mínimo del doble de la lectura obtenida en el control negativo, siguiendo el criterio de Matthews (1993).

Los resultados fueron analizados a través de un modelo lineal generalizado aleatorio considerando una distribución binomial para la variable presencia de virus y utilizando una función de ligamiento *logit*. Para el análisis de los datos se consideraron *d* departamentos

CUADRO 1

Zonas de procedencia de las muestras de papa obtenidas para detectar la presencia de PVS en Colombia

TABLE 1
Regions of origin of potato samples used to detect PVS in Colombia

Departamento	Municipios Latitud / Longitud					
Antioquia	Zona 1: Oriente		Zona 2: Oriente cercano			Zona 3: Norte
	La Unión	Sonsón	Santuario	Marinilla	Carmen de Viboral	Santa Rosa de Osos
	05°58'38" N 75°21'54" W	05°42'44" N 75°18'50" W	06°08'18" N 75°15'51" W	06°10'36" N 75°20'21" W	06°05'06" N 75°20'19" W	06°38'56" N 75°27'48" W
Cundinamarca	Zona 4: Villapinzón	Zona 5: Zipaquirá	Zona 6: Occidente			
	Villapinzón	Zipaquirá	Cota	Madrid		
	05°13'00" N 73°36'00" W	05°01'42" N 74°00'21" W	04°49'00" N 74°06'00" W	04°26'47" N 74°09'25" W		
Boyacá	Zona 7: Turmeque		Zona 8: Tunja			
	Turmequé	Ventaquemada	Siachoque	Tunja		
	05°19'00" N 73°30'00" W	05°22'09" N 73°31'30" W	05°30'00" N 73°14'00" W	05°32'07" N 73°22'04" W		
Nariño	Zona 9: Pasto	Zona 10: Ipiales				
	Pasto	Ipiales				
	01°12'49" N 77°16'52" W	00°49'49" N 77°38'40" W				

($i=1,2,\dots,d$); m_i zonas dentro de departamentos ($j=1,2,\dots,b$; donde $b=\sum m_i$), F_{ij} lotes dentro de zonas y departamentos ($k=1,2,\dots,c$; donde $c=\sum \sum F_{ij}$), y n observaciones totales. Así para el vector y de observaciones de presencia/ausencia de PVS, en la planta l del lote k dentro de la zona j del departamento d , se consideró el siguiente modelo lineal generalizado (Littell *et al.* 2006, McCulloch *et al.* 2008):

$$\text{logit}(E[y]) = 1m + Z_1u_1 + Z_2u_2 + Z_3u_3 + e$$

donde, en su orden, $\mathbf{1}$ y μ son el vector de unos de tamaño n y la media general; \mathbf{Z}_1 y \mathbf{u}_1 son la matriz de presencia $n \times a$ y el vector $a \times 1$ de efectos aleatorios de departamento, \mathbf{Z}_2 y \mathbf{u}_2 son la matriz de presencia $n \times b$ y el vector $b \times 1$ de efectos aleatorios de zonas dentro de departamentos, \mathbf{Z}_3 y \mathbf{u}_3 son la matriz de presencia $n \times c$ y el vector $c \times 1$ de efectos aleatorios de lotes dentro de zonas y departamentos; y \mathbf{e} es el vector de efectos residuales. En este estudio se supone que el vector y sigue una distribución de Bernoulli, y que los efectos de departamentos, zonas dentro de departamentos, y lotes dentro de zonas y departamentos siguen una distribución normal con media cero y varianzas σ^2_{u1} , σ^2_{u2} y σ^2_{u3} . Para la predicción de la presencia (\hat{p}) se utilizó el mejor predictor lineal insesgado (BLUP, por sus siglas en inglés) para el efecto respectivo, usando la siguiente expresión:

$$\hat{p} = 1\hat{m} + Z_1\hat{u}_1$$

Para el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GLIMMIX del programa estadístico SAS versión 9.2.

Variabilidad genética de aislamientos de PVS: El ARN molde necesario para amplificar un fragmento del gen de la proteína de la cápside de PVS por medio de la técnica de RT-PCR se obtuvo a partir de extracciones de ARN total de una mezcla de folíolos de papa que fueron positivos a la prueba de ELISA, mediante el kit *RNeasy plant mini* (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de RT-PCR se realizaron

en dos pasos con los cebadores PVSCPF (5'-CTA GRC AAT TGC GAG CTC AC-3') (Ali *et al.* 2008) y PVSr (5'-ATG ATC GAG TCC AAG GGC ACT G-3'), que están dirigidos a regiones conservadas del gen CP de PVS y por tanto amplifican una porción de este gen en variantes ordinarias y andinas de este virus (Nie & Singh 2001, Ali *et al.* 2008). Las reacciones de retrotranscripción se realizaron con la enzima M-MuLV transcriptasa reversa (20U/ μ L) (Fermentas, Lituania) a 37°C por 60min y el programa de PCR consistió en 95°C por 30s, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30s, 53°C por 45s, 72°C por 1min y una extensión final a 72°C por 5min. Los amplicones del tamaño esperado (~629pb) fueron purificados directamente del gel mediante el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) y secuenciados en un secuenciador ABI Prism 3730xl (PE Applied Biosystems, USA).

Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante el *software* BioEdit 6.0.6 (Hall 1999), construyéndose secuencias consenso y confirmando su identidad con genes virales por comparación con las bases de datos moleculares mediante BLAST. El alineamiento incluyó las secuencias obtenidas en el estudio y aquellas depositadas en el GenBank representando las variantes principales de PVS. Para esto se alinearon las secuencias mediante el *software* Clustal W (Larkin *et al.* 2007) y se realizó un análisis filogenético mediante el método de Máxima Parsimonia utilizando el *software* MEGA versión 5.0 (Tamura *et al.* 2011). El soporte de la topología interna de los dendrogramas fue determinado por análisis de *bootstrap* con 1000 remuestreos (Felsenstein 1985). Adicionalmente, se realizó un análisis de distancia genética basado en el número de sustituciones por sitio, empleando la metodología de Máxima Probabilidad Compuesta (Tamura *et al.* 2004) mediante el *software* MEGA versión 5.0 (Tamura *et al.* 2011).

RESULTADOS

Evaluación de la presencia de PVS: Los resultados de los análisis serológicos indicaron

la presencia promedio del 40% del PVS en los cuatro departamentos evaluados, siendo las muestras de los cultivos de papa de Cundinamarca y Antioquia los que presentaron los mayores niveles de detección (58 y 45%, respectivamente), seguidos por Nariño y Boyacá, con 30 y 29%, respectivamente (Fig. 1). Dentro de los departamentos, las muestras de las regiones del Oriente Cercano de Antioquia y Pasto (Nariño) fueron en su orden las que tuvieron mayor presencia del virus, con 49 y 47%, respectivamente. Las demás zonas presentaron niveles de detección de PVS entre 35 y 42% (Fig. 1).

Variabilidad genética de aislamientos de PVS: Las pruebas de RT-PCR produjeron los amplicones del tamaño esperado (~629pb) con los cebadores PVSCPF y PVS_R. El análisis de variabilidad genética se realizó utilizando 15 secuencias de fragmentos del gen de la proteína de cápside, de cepas de PVS procedentes de cultivos de papa de los cuatro departamentos bajo estudio de Colombia (Cuadro 2) y 28 secuencias de referencia obtenidas del GenBank, representando diferentes razas y orígenes geográficos del virus (Fig. 2). Así mismo, se utilizó como grupo externo una secuencia de CP de la especie tipo del género *Carlavirus*, *Carnation*

latent virus (CLV) (Accesión X52627). El dendrograma resultante generó dos grandes clados que representan las razas PVS^O (25 aislamientos de referencia y tres de Colombia) y PVS^A (tres aislamientos de referencia y 12 de Colombia), y se presentan fuertemente respaldados por valores de *bootstrap* del 97 y 96%, respectivamente (Fig. 2). El primer clado, presentó seis subclados (I a VI), algunos de los cuales estuvieron apoyados por altos valores de *bootstrap* (ej. IV, VI). Tres de los aislamientos colombianos de PVS se presentaron en el clado I de PVS^O, en conjunto con un aislamiento de Reino Unido y uno de Australia, mientras que los demás clados incluyeron indistintamente aislamientos de PVS obtenidos en Europa, Australia y Asia. Sin embargo, los aislamientos representativos de EEUU sólo se presentaron en el clado III.

Por otra parte, el grupo representando la raza Andina de PVS, se subdividió en tres subclados (I, II y III) (Fig. 2), con los dos primeros emparentados filogenéticamente, aunque con un mediano soporte de *bootstrap* (81%). El primer subclado (I) sólo incluyó aislamientos colombianos de PVS procedentes de cultivos de los departamentos de Antioquia y Nariño (cuatro aislamientos), mientras que el II agrupó las secuencias de referencia de cepas de PVS^A

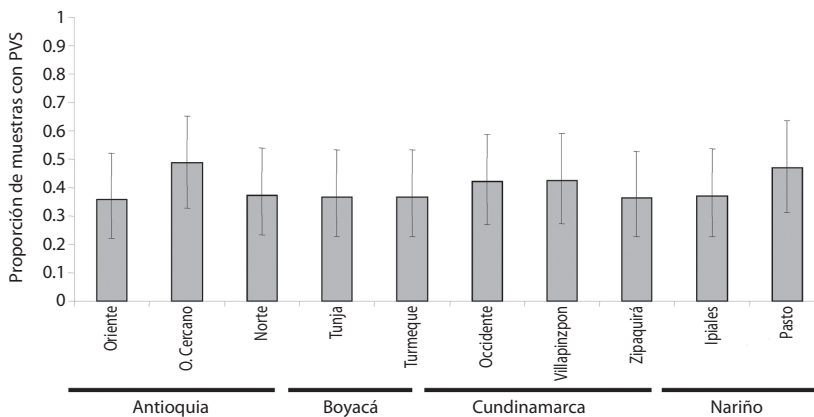


Fig. 1. Niveles de detección de PVS en muestras evaluadas por ELISA, procedentes de cultivos de papa de diez regiones de Colombia. Las líneas dentro de las barras indican los intervalos de confianza al 95%.

Fig. 1. Detection levels of PVS in plant samples tested by ELISA from potato crops of ten regions from Colombia. Lines within the bars indicate confidence intervals at 95%.

CUADRO 2

Procedencia y números de accesión de los aislamientos de PVS secuenciados en este estudio

TABLE 2
Origin and accession numbers of PVS sequences reported in this study

Aislamientos	Departamento	Municipio	Vereda	Variedad de papa*	# accesión
24FB	Antioquia	Santuario	El Carmelo	Capiro	JN082757
26FB	Antioquia	Sonsón	Tasajo	Criolla	JN082758
55MY	Antioquia	La Unión	Vallejuelito	Criolla	JN082759
56MY	Antioquia	Sta. Rosa de Osos	El Roble	Capiro	JN082760
57MY	Cundinamarca	Villapinzón	Quincha	Esmeralda	JN082761
58MY	Cundinamarca	Villapinzón	Chasques	Criolla	JN082762
59MY	Cundinamarca	Villapinzón	Bosabita	Esmeralda	JN082763
61MY	Nariño	Pasto	La Victoria	Nevada	JN082764
62MY	Nariño	Pasto	La Victoria	Nevada	JN082765
63MY	Nariño	Ipiales	Saguarán	Capiro	JN082766
64MY	Nariño	Ipiales	Suras	Criolla	JN082767
65MY	Boyacá	Siachoque	Jurubita	Suprema	JN082768
66MY	Antioquia	Sta Rosa de Osos	El Roble	Criolla	JN082769
67MY	Antioquia	Carmen de Viboral	Aldana Abajo	Nevada	JN082770
68MY	Antioquia	Santuario	Valle de María	Capiro	JN082771

* Las variedades de papa mencionadas corresponden a la especie *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, con excepción de la variedad criolla, que pertenece a la especie *Solanum phureja*.

procedentes de India, Perú y República Checa. El subclado III presentó la mayor proporción de aislamientos colombianos de PVS (8 de 15 secuenciados), procedentes de todas las zonas cultivadoras de papa bajo análisis.

El análisis de distancia genética para todas las secuencias del gen CP de PVS, mostró un promedio de sustituciones por sitio de 0.21 para nt y de 0.45 para aa; mientras que para el clado representando PVS^O, dichos valores fueron de 0.05 (nt) y 0.12 (aa), y para PVS^A de 0.17 (nt) y 0.42 (aa).

Al evaluar los niveles de identidad genética de nt, se encontró que los aislamientos colombianos identificados como PVS^O, compartieron entre el 76 al 80% de similitud con respecto a las secuencias de las cepas de Colombia clasificadas como PVS^A. Estos valores fueron superiores a 91% (máximo de 99%) para todos los aislamientos PVS^O (colombianos e internacionales), mientras que para las secuencias bajo estudio de los aislamientos de PVS^A, se encontraron valores de identidad de 88 a 99%.

La identidad de los aislamientos de PVS con respecto al CLV, utilizado como grupo externo de análisis fue de 43 a 48%.

DISCUSIÓN

El cultivo de la papa en Colombia, participa con el 7.1% de la superficie sembrada en cultivos transitorios (128 701ha), aporta cerca de 7.8% de la producción agrícola con un volumen de 2 272 772ton/año y genera alrededor de 69 000 empleos directos (MADR 2009). Uno de los principales aspectos que afectan la producción de este cultivo son los problemas virales, sin embargo, el nivel de conocimiento que se tiene de la biología y relaciones patogénicas de los virus que afectan la papa en Colombia es bajo, lo cual se ve reflejado en las deficiencias que se presentan en las prácticas destinadas a su manejo, como por ejemplo en la producción de tubérculo-semilla certificada. El PVS es uno de los virus más prevalentes y menos caracterizados en los cultivos de papa de

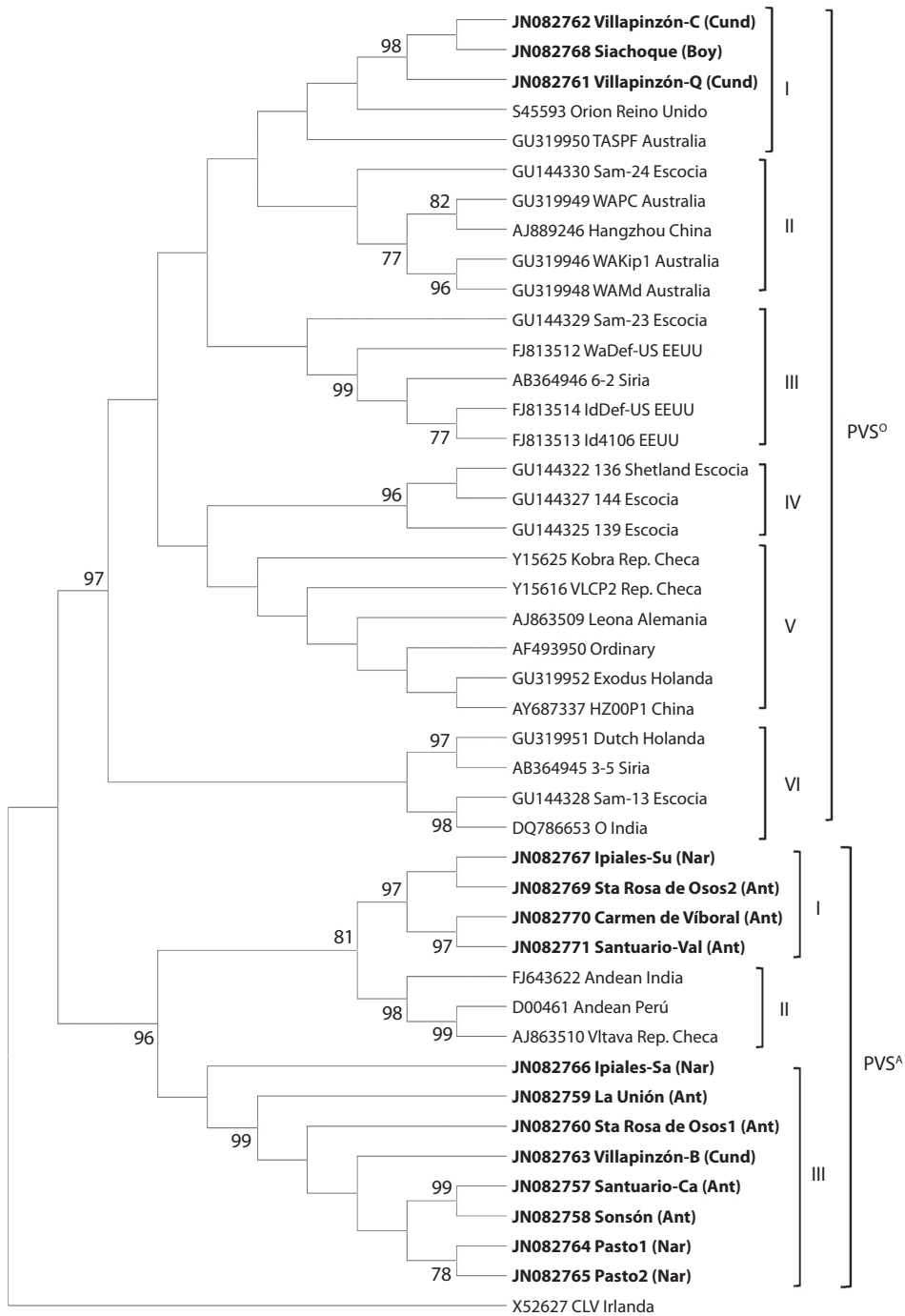


Fig. 2. Árbol filogenético basado en secuencias parciales de la cápside viral para aislamientos de PVS obtenidos de cultivos de papa de Colombia y otros países del mundo. Los números bajo las ramas indican valores *bootstrap* (>75%). Los clados se denominan por números (ver texto). Las secuencias de aislamientos colombianos de PVS se presentan en negrita.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on partial sequences of viral capsid of PVS isolates obtained from potato crops in Colombia and other countries. *Bootstrap* values are shown below branches (>75%) Clades are named by numbers (see text). PVS Colombian sequences are shown in bold.

la región Andina (Salazar 1995), por lo que fue seleccionado en esta investigación para evaluar su presencia en diferentes regiones cultivadoras de papa de Colombia, así como sus niveles de variación genética.

Los resultados encontrados a partir de 320 muestras de plantas obtenidas en 10 zonas de cultivo de los cuatro principales departamentos productores de papa de Colombia, indicaron altos niveles de detección del virus, con un promedio general del 40% y departamentos como el de Cundinamarca y Antioquia, cuyas muestras en conjunto presentaron niveles de detección de 58 y 45%, respectivamente. En Colombia, no se contaba con antecedentes de estudios referentes a los niveles de presencia de PVS en cultivos de papa en producción, pero sí se tenían indicios de la alta prevalencia de este virus en la CCC de papa. Así, a partir de pruebas de inmunopresión y DAS-ELISA, se había encontrado que PVS era el virus que presentaba mayores niveles de detección, con valores del 61.3% (Franco-Lara *et al.* 2009) y 85% (Guzmán *et al.* 2010), respectivamente. Dichos hallazgos, así como los aquí encontrados, plantean la necesidad de revisar la aplicación del programa de certificación de tubérculo-semilla en el país, pues en éste sólo se tolera 1%, 2% y 5% de presencia de PVS en semilla básica, registrada y certificada, respectivamente (ICA 2003). En adición, los altos niveles de detección de PVS en el país, se pueden explicar por el hecho que este virus causa síntomas suaves o incluso ocurre en forma asintomática en diferentes variedades de papa, enmascarándose su presencia en cultivos utilizados para la generación de semilla, lo que sumado a su alta transmisibilidad por tubérculo (Franc & Bantari 1996), favorece su rápida dispersión dentro y entre las diferentes regiones productoras de papa. Además, se ha reportado que PVS puede establecer sinergismos con otros virus como PVX (Lambert *et al.* 2012, Nyalugwe *et al.* 2012), que incrementan las pérdidas en la producción de papa.

Por otra parte, trabajos recientes adelantados por nuestro grupo (Gil *et al.* 2011a, b), tendientes a evaluar la presencia de PVY y PLRV

en las mismas regiones analizadas en este estudio, determinaron que dichos virus alcanzaron niveles de presencia promedio del 72% y 20%, respectivamente. Lo anterior sugiere que es imperativo el establecimiento de un esfuerzo nacional en los organismos de sanidad vegetal estatal, agremiaciones de productores y agroindustrias de alimentos, para implementar prácticas que conduzcan a disminuir los niveles de infección del PVS y de los otros virus, de manera que se puedan mejorar los rendimientos de los cultivos y se garantice la calidad del tubérculo-semilla empleado en el país. En este sentido, sería de gran interés evaluar los niveles de incidencia de PVS en las diferentes regiones productoras, a partir de un muestreo representativo de las áreas cultivadas en cada zona y de un análisis altitudinal, que permita evaluar el impacto de la transmisión de PVS por vectores, ya que bajo las condiciones propias de la zona andina, se desconoce su papel epidemiológico en la dispersión de este virus.

Con respecto al análisis de variabilidad genética realizado a partir de la secuenciación de una porción del gen CP de 15 aislamientos colombianos de PVS, y su comparación con cepas de referencia de otros países del mundo, fue posible la detección e identificación en el país de las dos razas hasta ahora caracterizadas para esta especie viral: PVS^O y PVS^A, siendo la última aparentemente la más registrada, al incluir 12 de los 15 aislamientos secuenciados. En este caso, cepas de la raza A se encontraron a partir de muestras de Antioquia, Nariño y Cundinamarca, mientras que PVS^O fue detectado en Boyacá y Cundinamarca. Sería importante en el futuro adelantar trabajos locales que permitan definir si en dichas regiones se presentan indistintamente ambas razas o por el contrario existe alguna especialización dependiente de las condiciones medioambientales y varietales prevalentes en cada región. Para nuestro conocimiento, este trabajo es el primero que reporta la raza ordinaria de PVS a partir de muestras de papa de los Andes suramericanos y en el que se presentan mayores niveles de variación entre cepas de PVS de un mismo país (del 76 al 99%). Esta situación no

resultaba inesperada, pues como lo planteó en su trabajo pionero Jones (1981), dicha región, al corresponder al centro de origen de la papa, también debe presentar la mayor diversidad de virus que han co-evolucionado con sus ancestros silvestres.

Trabajos similares al aquí presentado, que evalúan los niveles de diversidad de PVS con base en secuencias de CP, han encontrado una base genética más estrecha para los aislamientos de PVS caracterizados en diferentes regiones. Así por ejemplo, Salari *et al.* (2011) al evaluar los niveles de diversidad de 12 aislamientos de PVS procedentes de Irán, encontraron que todos los aislamientos correspondían a la raza PVS^O y que su diversidad global oscilaba entre 92.5 y 99.1%; mientras que Lambert *et al.* (2012) evaluando la variabilidad genética de aislamientos de PVS obtenidos en cultivos de papa de Tasmania (Australia), encontraron que éstos compartían niveles de identidad superiores al 95%, independientemente de causar infecciones sistémicas (PVS^{O-CS}) o locales (PVS^O) sobre *C. quinoa*. Similarmente, Lin *et al.* (2009) evaluaron las secuencias completas de dos aislamientos de PVS de EEUU, y encontraron que éstos compartían una identidad global para todo el genoma de 98% y de 98.6% para el gen de CP.

Por otra parte, la secuenciación parcial del gen CP en 12 aislamientos de PVS^A de Colombia, amplía el conocimiento sobre rango de variación de esta raza de PVS en el mundo, por cuanto en la mayor parte de estudios de diversidad hasta ahora realizados, siempre se utilizaban un máximo de cinco aislamientos, con tan sólo dos procedentes de la zona Andina de Perú (D00461 y BAA00355), mientras que los otros fueron obtenidos en India (FJ643622), Reino Unido (AA085502) y República Checa (CAI06112). Así mismo, de gran interés resultaron los altos niveles de diversidad encontrados entre aislamientos de esta raza en Colombia, pues los rangos de identidad para CP variaron de 88 a 99% y presentaron un promedio de sustituciones por sitio de 0.17 y 0.42 para nt y aa, respectivamente; valores éstos muy superiores a los encontrados para los aislamientos de la

raza ordinaria, más aún si se tiene en cuenta que éstos contemplan aislamientos de diferentes continentes (91 a 99% de identidad y 0.05 (nt) y 0.12 (aa) de sustituciones por sitio). De interés resultará en el futuro la inoculación de dichos aislamientos sobre plantas de *C. quinoa*, por cuanto desde el registro original de la raza PVS^A por Hinostroza-Orijuela (1973) y su confirmación posterior a partir de un aislamiento encontrado en cultivos de papa de Wisconsin (EEUU) por Slack (1983), se ha considerado que a diferencia de PVS^O, esta raza tiene la capacidad de inducir infecciones sistémicas en dicho hospedante experimental. Sin embargo, los estudios iniciados por Matoušek *et al.* (2000) y recientemente confirmados por Cox & Jones (2010) y Lambert *et al.* (2012), encontraron que algunos aislamientos de PVS^O tenían la capacidad de inducir síntomas en hojas no inoculadas de *C. quinoa*, aunque se desconoce hasta el momento la existencia de aislamientos de PVS^A que sólo induzcan lesiones locales en este hospedante.

Los resultados de diversidad viral de PVS encontrados en este estudio, ameritan continuar con el proceso de secuenciación de todo el genoma en al menos una cepa colombiana representativa de los tres clados hallados en el análisis filogenético, de manera que sea posible una comparación global con los aislamientos completamente secuenciados de este virus en otros lugares del mundo (Matoušek *et al.* 2000, Lin *et al.* 2009). Esto servirá como base para el diseño de herramientas de diagnóstico molecular que cubran el rango de variantes de este virus en el país y puedan posteriormente utilizarse en programas de mejoramiento genético por resistencia a virus, certificación de semilla y vigilancia cuarentenaria. Adicionalmente, es necesario evaluar si tal diversidad presenta correlaciones con las características patogénicas de las variantes de PVS sobre las variedades de papa cultivadas en el país, aspecto que requiere ser abordado con prontitud.

El hecho que en Colombia aparentemente prevalezcan cepas de la raza PVS^A, implica que además de la transmisión por contacto y por tubérculo-semilla que presenta este virus,

su dispersión por diferentes especies de áfidos (Wardrop *et al.* 1989), puede jugar un papel importante en la distribución del virus dentro y entre los lotes de cultivo de las diferentes regiones cultivadoras de papa del país.

Los hallazgos presentados en este trabajo y otros realizados recientemente para PVY y PLRV (Gil *et al.* 2011a, b), indican que es necesario emprender acciones de manejo que reduzcan los niveles de infección de virus en los cultivos de papa de Colombia, siendo la aplicación efectiva del programa de certificación de tubérculo-semilla, el manejo integrado de insectos vectores, la eliminación de focos de infección en los cultivos y la vigilancia cuarentenaria apoyada con el uso herramientas de detección asintomática de virus, cuatro aspectos fundamentales para garantizar la sanidad viral de los cultivos de papa de este país suramericano.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al apoyo económico del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (proyecto 090-2007S4527-87-08). Se agradece a Luz Estela Lagos por su apoyo con la recolección de muestras en el Departamento de Nariño.

RESUMEN

El cultivo de papa en Colombia es afectado por diversos virus, que incluyen PVY, PLRV, PVX, PMTV y PVS; aunque se han realizado pocos estudios sobre la biología, distribución y patogenicidad de dichos virus en Colombia, siendo especialmente escasa la información referente al PVS. En este trabajo se evaluó mediante pruebas de ELISA, la presencia del PVS en cuatro departamentos de Colombia, así como sus niveles de variación, a partir de la secuenciación de una porción del gen de la cápside viral. Los resultados indicaron una detección promedio del virus en el 40% de las 320 muestras analizadas, con zonas como el Oriente cercano de Antioquia (49%) y Pasto (Nariño) (47%), donde se detectó en mayor proporción el virus. Los análisis de variación molecular indicaron la presencia de las dos razas de PVS (Ordinaria y Andina) en Colombia, siendo los aislamientos de PVS^A los más diversos, al presentar un rango de identidad del 88 al 99%. Estos hallazgos indican que es imperativo el fortalecimiento de los programas de certificación de semilla y vigilancia cuarentenaria

en el país, especialmente para virus como el PVS, que aunque puede ser asintomático, causa pérdidas hasta del 20% en cultivos de papa.

Palabras clave: *Betaflexiviridae*, capsida viral, DAS-ELISA, RT-PCR, *Solanum tuberosum*.

REFERENCIAS

- Adams, M. & J. Kreuze. 2008. Taxonomic proposal to the ICTV Executive Committee. Creation of new family *Betaflexiviridae*. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, D.C., EE.UU. (Consultado: 16 de Febrero 2012, http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/plant-2008/1098.aspx).
- Ali, M., T. Maoka & K.T. Natsuaki. 2008. The Occurrence of potato viruses in Syria and the molecular detection and characterization of Syrian *Potato virus S* isolates. *Pot. Res.* 51: 151-161.
- CORPOICA. 2005. Informe técnico de bancos, C.I. Tibaitatá. CORPOICA, Bogotá, Colombia.
- Cox, B.A. & R.A. Jones. 2010. Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus S* isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Arch. Virol.* 155: 1163-1169.
- Dolby, C.A. & R.A.C. Jones. 1987. Occurrence of the Andean strain of *Potato virus S* in imported potato material and its effects on potato cultivars. *Plant Pathol.* 36: 381-388.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Foster, D.G. & P.R. Mills. 1992. The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of *Potato virus S*. *Virus Genes* 6: 213-220.
- Franc, G.D. & E.E. Banttari. 1996. Translocation and mechanical spread of a Minnesota isolate of *Potato virus S* in potatoes. *Am. Pot. J.* 73: 123-133.
- Franco-Lara, L., C.A. Soto & M. Guzmán. 2009. Detección de los virus PVX, PVS, PVY y PLRV en la Colección Central Colombiana de papa por medio de la técnica de inmunopresión (IMI). *Rev. Fac. Ciencias Básicas* 5: 130-139.
- Gil, J.F., J.M. Cotes & M. Marín. 2011a. Incidencia de potyvirus y caracterización molecular de PVY en regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Colombia. *Rev. Col. Biotecnol.* 13: 85-93.
- Gil, J.F., J.M. Cotes & M. Marín. 2011b. Incidencia y caracterización molecular del *Potato leafroll virus* (PLRV) en las principales regiones productoras de papa de Colombia. *Fitosanidad* 15: 17-24.
- Guzmán, M., V. Román, L. Franco & P. Rodríguez. 2010. Presencia de cuatro virus en algunas accesiones de la

- Colectión Central Colombiana de papa mantenida en campo. Agro. Col. 28: 225-233.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- Hinojosa-Orihuela, A.M. 1973. Some properties of *Potato virus S* isolated from Peruvian potato varieties. Potato Res. 16: 244-250.
- ICA. 2003. Resolución 2501 de 2003. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá, Colombia. (Consultado: 10 de Febrero 2010, <http://www.ica.gov.co/getattachment/0c8d645e-90cd-4537-9cad-1828e0a0653a/2003R2501.aspx>).
- ICTV. 2012. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV Master Species List 2011. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, D.C., EE.UU. (Consultado: 16 de Febrero 2012, http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents).
- Jeffries, C.J. 1998. Potato FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm No 19. FAO/IPGRI, Roma, Italia.
- Jones, R.A.C. 1981. The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in the Andean Region of South America, p. 89-107. In J.M. Thresh (ed.). Pest, pathogens and vegetation. The role of weed and wild plants in the ecology of crop pests and diseases. Pitman Advanced Publishing Program, Boston, EE.UU.
- Lambert, S.J., J. Scott, S. Pethybridge & F.S. Hay. 2012. Strain characterization of *Potato virus S* Isolates from Tasmania, Australia. Plant Dis. 96: 813-819.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan & H. McWilliam. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948.
- Lin, Y., K. Druffel, J. Whitworth, M. Pavek & H. Pappu. 2009. Molecular characterization of two *Potato virus S* isolates from late -blight-resistant genotypes of potato (*Solanum tuberosum*). Arch. Virol. 154: 1861-1863.
- Littell, R.C., A. Miliken, W.W. Stroup, R.D. Wolfinger & O. Schabenberger. 2006. SAS[®] for mixed models. SAS Institute, Carolina del Norte, EE.UU.
- Mackenzie, D.J., J.H. Tremaine & R. Stace-Smith. 1989. Organization and internal homologies of the 3'-terminal portion of *Potato virus S* RNA. J. Gen. Virol. 70: 1053-1063.
- MADR. 2009. Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero. Dirección de política sectorial, Grupo sistemas de información, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá, Colombia. (Consultado: 15 de Diciembre 2010, <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/anuario>).
- Matoušek, J., J. Schubert, P. Dědič & J. Ptáček. 2000. A broad variability of *Potato virus S* (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Can. J. Plant Pathol. 22: 29-37.
- Matoušek, J., J. Schubert, J. Ptáček, P. Kozlová & P. Dědič. 2005. Complete nucleotide sequence and molecular probing of *Potato virus S* genome. Acta Virol. 49: 195-205.
- Matthews, R.E.F. 1993. Diagnosis of plant virus diseases. CRC, Boca Ratón, Florida, EE.UU.
- McCulloch, C.E., S.R. Searle & J.M. Neuhaus. 2008. Generalized linear, and mixed models. John Wiley & Sons, Nueva Jersey, EE.UU.
- Nie, X. & R.P. Singh. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. J. Virol. Methods 91: 37-49.
- Nyalugwe, E.P., C.R. Wilson, B.A. Coutts & R.A.C. Jones. 2012. Biological properties of *Potato virus X* in potato: Effects of mixed infection with *Potato virus S* and resistance phenotypes in cultivars from three continents. Plant Dis. 96: 43-54.
- Rose, D. 1983. Some properties of an unusual isolate of *Potato virus S*. Pot. Res. 26: 49-62.
- Salazar, L.F. 1995. Potato viruses and their control. International Potato Center, Lima, Perú.
- Salari, K., H. Massumi, J. Heydarnejad, A. Hosseini & A. Varsani. 2011. Analysis of Iranian *Potato virus S* isolates. Virus Genes 43: 281-288.
- Slack, S.A. 1983. Identification of an isolate of the Andean strain of *Potato virus S* in North America. Plant Dis. 67: 786-789.
- Tamura, K., M. Nei & S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101: 11030-11035.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.
- Wardrop, E.A., A.B. Gray, R.P. Singh & J.F. Peterson. 1989. Aphid transmission of *Potato virus S*. Am. Pot. J. 66: 449-459.

