

# CARACTERIZACIÓN DEL VIROMA DE ARN EN TEJIDO RADICAL DE *Solanum phureja* MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN 454 GS-FLX

Pablo Gutiérrez-Sánchez<sup>1</sup>, Juan Alzate-Restrepo<sup>2</sup> y Mauricio Marín-Montoya<sup>1</sup>

## RESUMEN

Las enfermedades virales son una de las principales limitantes para la producción de papa en la región Andina al reducir los rendimientos de los cultivos, afectar la calidad de los tubérculos y limitar su utilidad como semilla. Los programas de manejo integrado de las enfermedades virales deben estar sustentados en el conocimiento previo de las especies de virus y sus variantes presentes en los cultivares establecidos en cada región y en la disponibilidad de herramientas de diagnóstico viral específicas y altamente sensibles. En esta investigación se caracterizó el viroma de ARN asociado a tejido radicular de una planta de *Solanum phureja* cultivar Criolla Colombia mediante la pirosecuenciación del ADNc utilizando el sistema 454 GS-FLX. Los resultados demostraron la coinfección de tres virus de ARN en las raíces analizadas: dos variantes de *Potato virus S* detectadas en el 49,7 % (PVS<sup>Col</sup>) y 42,7 % (PVS<sup>A</sup>) del total de *reads* asociados a cápsides virales, el *Potato virus V* (PVV) (6,5%) y el *Potato leafroll virus* (PLRV) (1,1%). Adicionalmente, se identificaron al menos dos diferentes variantes genómicas para cada uno de los virus, lo que debe ser considerado para el diseño futuro de herramientas de detección molecular que apoyen los programas de certificación de tubérculo-semilla y mejoramiento genético de papa por resistencia a virus.

**Palabras clave adicionales:** Papa criolla, PLRV, PVS, PVV, secuenciación de nueva generación (NGS)

## ABSTRACT

### Characterization of the root RNA-virome in *Solanum phureja* using 454 GS-FLX pyrosequencing

Viral diseases are one of the most limiting factors to the potato industry in the Andean region as they significantly reduce yields, compromise tuber quality and limit their use as seed tubers. Integrated management programs of viral diseases must be supported by a good knowledge of the virus species (and their variants) infecting each potato variety and the availability of specific and highly sensitive diagnostic tools. In this work, the root RNA-virome of a *Solanum phureja* cv. Criolla Colombia plant was characterized using 454 GS-FLX pyrosequencing. Co-infection with three different viruses was found, the most prevalent of which were identified as two variants of *Potato virus S*: PVS<sup>Col</sup> (49.7 %) and PVS<sup>A</sup> (42.7 %). The remaining viruses corresponded to *Potato virus V* (PVV) (6.5 %) and *Potato leafroll virus* (PLRV) (1.1 %). At least two genomic variants were found for each virus, an important factor that should be taken into account in the design of molecular detection tools supporting seed certification and genetic improvement programs.

**Additional key words:** Egg yolk potato, PLRV, PVS, PVV, next generation sequencing (NGS)

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*) en Colombia es uno de los renglones agrícolas más importantes para la región andina del país, pues cerca de 90.000 familias dependen de su siembra en alrededor de 160.000 ha (ICA, 2012). En este país se cultivan unas 30 variedades de papa, aunque entre el 85 y 90% del

área total de siembra es ocupada con las variedades de *S. tuberosum* subsp. Andigena Parda pastusa, Diacol Capiro e ICA-Puracé. El cultivo de papa criolla (*S. phureja*), representa entre el 6 y el 10 % del área total (MADR, 2006; ICA, 2012). En los últimos años ha existido un marcado interés en incentivar la siembra de esta especie diploide en los países andinos, dadas sus excelentes características organolépticas, altos

Recibido: Octubre 3, 2013

Aceptado: Mayo 5, 2014

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia. e-mail: paguties@unal.edu.co, mamarinm@unal.edu.co

<sup>2</sup> Centro Nacional de Secuenciación Genómica- CNSG, Facultad de Medicina, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. e-mail: jfernando.alzate@udea.edu.co

valores nutritivos (vitaminas A, B y C, niacina, tiamina), ciclo corto de producción (4 a 6 meses) y reducido período de dormancia de los tubérculos (MADR, 2006; Rodríguez et al., 2009). Recientemente, en Colombia se entregaron al mercado tres clones superiores de papa criolla registrados como los cultivares Criolla Latina, Criolla Paisa y Criolla Colombia. Este último ha sido el de mayor aceptación entre los agricultores, dada su excelente adaptación a las regiones montañosas del país, aceptables rendimientos (13 a 15 t·ha<sup>-1</sup>), y utilidad tanto para consumo en fresco como para la elaboración de papa precocida congelada (Rodríguez et al., 2009).

Uno de las principales limitantes del cultivo de *S. phureja* es su alta susceptibilidad a algunas de las enfermedades más importantes de la papa, incluyendo las virosis (MADR, 2006). Sin embargo, de este último aspecto es escasa la información disponible con respecto a las especies de virus presentes y sus efectos sobre los rendimientos de las variedades locales de este cultivo en Colombia y otros países andinos, siendo hasta el momento reportados como los virus más incidentes en este hospedante: *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus S* (PVS), *Potato leafroll virus* (PLRV) y *Potato yellow vein virus* (PYVV) (Franco et al., 2009; Guzmán et al., 2010; 2013). Guzmán et al. (2010) utilizando la técnica de Elisa sobre dicha colección, encontraron que el 82 % de las muestras presentaban una infección mixta con PVS y PLRV; el 7,1 % registraba la infección de PVS, PVY y PLRV; el 5,9 % presentaba PVS, PVX y PLRV y el 1,8 % los cuatro virus bajo evaluación.

Si se considera que unos 38 virus y viroides han sido descritos por afectar cultivos de papa a nivel mundial (Kerlan, 2008) y que al menos 14 especies dependen de este hospedante para su supervivencia y dispersión (Salazar, 1996), es lógico considerar que el viroma de *S. phureja* en su centro de origen (región andina entre Ecuador y Colombia) presenta una mayor complejidad que la reportada hasta ahora; más aun cuando muchas de las enfermedades virales en la papa resultan en infecciones latentes o asintomáticas que reducen paulatinamente el vigor de los tubérculos-semilla y los rendimientos de los cultivos infectados (Halterman et al., 2012). En este sentido, Kerlan (2008) registró la ocurrencia de cerca de 16 virus

hasta ahora sólo encontrados en Latinoamérica y cuya importancia económica está por definirse en las diferentes variedades de papa cultivadas en los países de esta región. Un ejemplo que ilustra el desconocimiento de la complejidad viral presente en los cultivos de papa de nuestro continente es el estudio realizado por Vásquez et al. (2006) en Costa Rica, en el que mediante pruebas de Elisa se evaluó la incidencia de virus en cultivos de papa de 30 fincas ubicadas a tres altitudes, detectándose la presencia en niveles del 8 al 77 %, de 12 de los 13 virus evaluados, siendo la excepción el *Andean potato latent virus* (APLV). De forma interesante, en dicho trabajo se registraron por primera vez para este país centroamericano los virus PMTV, PAMV, PVV, PVT y APMoV.

Un aspecto fundamental que ha impedido un mejor conocimiento del viroma de papa en nuestros países es la necesidad de disponer de cebadores, sondas y anticuerpos específicos para detectar mediante pruebas moleculares y/o serológicas las variantes virales de cada especie presentes en las diferentes regiones de cultivo. Esto no siempre es fácil de lograr, dado el bajo número de secuencias disponibles para los genomas de dichos virus. En adición, el uso de estas técnicas tradicionalmente se reduce a la detección de los virus que históricamente se reconocen como los de mayor importancia económica para cada cultivo, lo que resulta en la subestimación de los verdaderos componentes etiológicos de las enfermedades virales (Coetzee et al., 2010).

En los últimos años se ha desarrollado un conjunto de técnicas de secuenciación masiva de genomas, metagenomas y transcriptomas, denominadas genéricamente como Secuenciación de nueva generación (NGS) y que presentan como principales plataformas los sistemas Illumina/Solexa y Roche 454 GS-FLX. Este último se basa en la detección lumínica de los nucleótidos como resultado de la actividad de la enzima luciferasa tras la incorporación de las bases durante la polimerización del ADN y la posterior redirección de la energía del pirofosfato para alimentar la catálisis de la luciferina (Mokili et al., 2012). Recientemente nuestro grupo secuenció completamente con este método, una variante del virus PVS infectando plantas de *S. phureja* en Colombia y que no fue posible asociar filogenéticamente con las dos razas conocidas

para este virus en el mundo (PVS<sup>A</sup> y PVS<sup>O</sup>) (Gutiérrez et al., 2012; 2013).

Los sistemas NGS son actualmente reconocidos como una poderosa herramienta para el diagnóstico molecular de virus de plantas y otros hospedantes, al no requerir conocimiento *a priori* de las especies y variantes virales a detectar y ofrecer un formato no sesgado para determinar las proporciones de los componentes virales que participan en co-infecciones (Adams et al., 2009; Kreuze et al., 2009). En esta investigación se utilizó el sistema de pirosecuenciación 454 GS-FLX para identificar los virus presentes en raíces de una planta de *S. phureja* cultivar Criolla Colombia, obtenida de un cultivo del municipio de La Unión (Antioquia) en el marco de un estudio metagenómico que busca identificar los principales componentes microbiológicos de la rizosfera de cultivos de papa afectados por la sarna polvosa, una enfermedad causada por el protozooario habitante del suelo *Spongospora subterranea*, en agroecosistemas de Colombia y otros países andinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó a partir de una planta de *S. phureja* cultivar Criolla Colombia en período de floración, obtenida en un cultivo del municipio de La Unión (Antioquia) (05°58'37" N, 75°21'52" W), seleccionado por presentar registro de altos niveles de incidencia y severidad de sarna polvosa, cuyo agente causal transmite el virus *mop-top* de la papa (PMTV, *Pomovirus*). Las raíces fueron colectadas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta su uso posterior. Para el estudio del viroma de ARN se procedió a la extracción del ARN total utilizando el método del Trizol (Chomczynski y Sacchi, 1987) y ARN poliA+ con el kit oligotex de Qiagen. El ADN copia (ADNc) se obtuvo con el kit *cDNA synthesis system* (Roche) utilizando cebadores aleatorios hexámeros. Posteriormente, se preparó la librería de ADNc con el kit *GS Rapid Library Prep* (Roche) y se procedió a la pirosecuenciación utilizando los reactivos Titanium (Roche) en un equipo GS-FLX 454 Life Sciences (Roche) del Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la Universidad de Antioquia (Colombia).

Mediante el análisis bioinformático, las

lecturas de secuencia (*reads*) fueron depuradas con el fin de eliminar las secuencias adaptadoras utilizando la rutina disponible en [http://bioinf.comav.upv.es/sff\\_extract/index.html](http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/index.html).

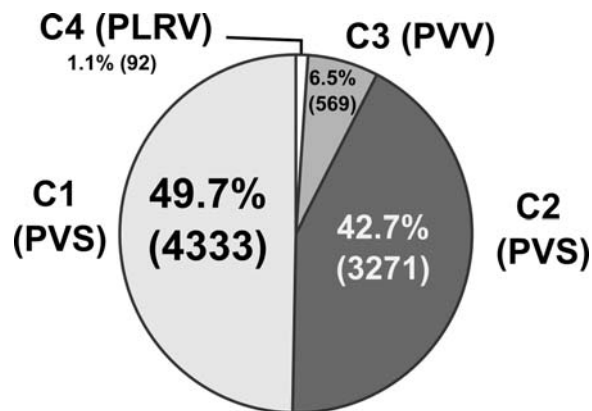
Con el fin de identificar las secuencias de origen viral se construyó una base de datos con 15.157 secuencias putativas de genes de la cápside (CP) de virus de plantas, disponibles en GenBank. Posteriormente, en una búsqueda de BlastX con respecto a la base de datos anterior, se identificaron los posibles *reads* codificantes para CP, y donde se empleó un alto valor para el parámetro *E* (0,01) con el fin de no descartar ninguna secuencia relacionada con dicho gen. Los *reads* seleccionados junto con sus archivos de calidad fueron extraídos de la totalidad de las secuencias utilizando rutinas en *Perl* diseñadas con este propósito por los autores y se procedió a su ensamblaje con el programa CAP3 utilizando los parámetros por defecto del programa (Huang y Madan, 1999). Los *contigs* resultantes fueron anotados inicialmente con el programa Blast2GO (Conesa et al. 2005) para luego realizar una búsqueda confirmatoria en GenBank con BlastX y proceder a definir la región codificante completa (Coding DNA sequence-CDS) de CP para los virus detectados.

La calidad del ensamblaje y la presencia de polimorfismos en estas secuencias fue analizada con el programa Tablet (Milne et al., 2010). Finalmente, se construyeron árboles filogenéticos mediante el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980) y una distribución gama de cinco categorías (+G, = 0,3013) utilizando el programa Mega versión 5.0 (Tamura et al., 2011). Los alineamientos de secuencias fueron realizados con la herramienta Muscle (Edgar, 2004). El soporte de la topología interna de los dendrogramas fue determinado mediante la aproximación del sesgo o varianza del análisis (*bootstrap*) con 1000 remuestreos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la pirosecuenciación se obtuvo un total de 97.817.836 bases secuenciadas correspondientes a 307.942 *reads* identificados mediante Blast y 8.265 *reads* asociados a genes CP de virus de ARN de plantas, aunque también se detectaron otros genes de origen viral como

aquellos que codifican para la RdRp (polimerasa de ARN dependiente de ARN), triple bloque de genes y diferentes proteasas de origen viral (datos no mostrados). Luego de utilizar diferentes sistemas de ensamblaje y filtración de datos, se observó que diferentes porciones de los genomas de dichos virus no estaban representadas en las bases de datos obtenidas, por lo que se obtuvo sólo una información fragmentada de éstas. Por el contrario, los genes de las cápsides virales sí se encontraron completas, como resultado de su mayor abundancia y ubicación hacia el extremo 3' de los genomas virales, posibilitándose el análisis de variabilidad. Con base en las secuencias de CP se detectaron tres virus en las raíces de la planta analizada: dos linajes de PVS ( $PVS^{Col}$  y  $PVS^A$ ), que además resultaron ser los virus prevalentes en el análisis, con 49,7% ( $PVS^{Col}$ ) y 42,7% ( $PVS^A$ ); así como los virus *Potato virus V* (PVV) y PLRV que se encontraron en el 6,5 % y 1,1 % de los *reads*, respectivamente (Figura 1). Para nuestro conocimiento, este trabajo es el primero que reporta la ocurrencia del potyvirus PVV en cultivos de papa de Colombia; aunque dicho virus es reconocido como una especie de distribución mundial, al ser registrada en cultivos de Bolivia y Perú, y diferentes países de Europa (Salazar, 1996; Oruetebarria et al., 2000; Kerlan, 2008).



**Figura 1.** Virus de ARN detectados en raíces de una planta de *S. phureja* mediante pirosecuenciación del ADNc. Se presentan las proporciones y la totalidad de lecturas de secuencia (*reads*) asociadas al gen de la cápside viral

De forma interesante, a pesar de que la planta analizada presentaba gran cantidad de agallas en

las raíces causadas por *S. subterranea*, en este trabajo no se detectó el virus PMTV, pero sí dos linajes del carlavirus PVS, previamente identificados por nuestro grupo en tejido foliar de plantas de *S. phureja* (Gutiérrez et al., 2012; 2013). Aunque la ocurrencia de infecciones virales mixtas en plantas de papa es frecuente (Salazar, 1996; Nie y Singh, 2001; Halterman et al., 2012), su detección se ha realizado principalmente en tejido foliar o en brotes de tubérculos, por lo cual el reporte de co-infecciones virales en raíces de *S. phureja* aporta un componente epidemiológico adicional que debe ser considerado cuando se analiza el viroma de este cultivo, ya que bajo nuestras condiciones de producción existe una importante cantidad de plantas “voluntarias” que traslapan sus ciclos de vida entre cultivos sucesivos de papa u otras especies, constituyéndose así el tejido radicular en una fuente adicional de inóculo viral para las nuevas siembras.

Especial atención merece el hecho que no se detectó en las raíces de la planta bajo estudio la ocurrencia de virus tradicionalmente considerados altamente incidentes en cultivos de papa de la región Andina, como PVY y PVX. En estudios previos realizados en muestras foliares de campo o bancos de germoplasma de esta especie, en diferentes departamentos de Colombia, se detectó la presencia en mayor o menor grado de estos virus (Franco et al., 2009; Gil et al., 2012). Sin embargo, dichos hallazgos no pueden ser comparados de forma directa con los resultados obtenidos en el presente estudio el cual involucró el análisis de una sola planta de *S. phureja*.

**PVS.** El PVS (*Carlavirus, Betaflexiviridae*) es uno de los virus prevalentes en los cultivos de papa de Colombia y otros países del mundo (Salazar, 1996; Cox y Jones, 2010; Gil et al., 2013). Este virus causa síntomas moderados sobre las plantas de papa que incluyen moteados cloróticos y rugosidades en el envés de los folíolos. Su efecto sobre el rendimiento de los cultivos puede alcanzar reducciones del 10-20 % (Gil et al., 2013), siendo aun mayores cuando se presenta en infecciones mixtas con virus como PVX (Nyalugwe et al., 2012). El PVS es transmitido de forma no persistente por especies de áfidos como *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Aphis fabae* y *A. nasturtii*; además su transmisión mecánica y por propagación vegetativa es bastante eficiente,

pudiendo incluso alcanzar incidencias del 100 % en los cultivos de papa (Matoušek et al., 2005). Este virus presenta viriones filamentosos de 610-710 nm y un genoma monopartita de cerca de 8500 nt de ARN de cadena sencilla positiva (ARNss+). El extremo 5' del ARN está protegido con una caperuza y el 3' presenta una cola de poli-A (Cox y Jones, 2010). En el presente estudio fueron detectados dos linajes genéticos de este virus en raíces de *S. phureja*, el mayoritario es denominado en este trabajo como PVS<sup>Col</sup>, dado que su registro hasta ahora sólo se ha realizado en Colombia y que presenta bajos niveles de identidad (<80 %) con respecto a la secuencia genómica de cepas representativas de los linajes PVS<sup>A</sup> y PVS<sup>O</sup> (Gutiérrez et al., 2013). Dicho linaje fue inicialmente inferido por Gil et al. (2013) a partir de análisis parciales de secuencias de CP de aislamientos colombianos de PVS procedentes de diferentes departamentos de Colombia y en el presente estudio, su diferenciación fue plenamente confirmada a partir del análisis filogenético de la secuencia del gen CP de PVS (Figura 2). En adición, los análisis de variación de los *reads* utilizados en los ensamblajes para este virus indicaron la ocurrencia de un genotipo predominante en las raíces de la planta analizada con una proporción de 96-98 % del total de *reads* obtenidos; aunque en dos posiciones ubicadas en el extremo 3' (780 y 858) se presentaron dos cambios con relaciones porcentuales de 58/42 y 60/40. Dicha situación se ajusta al modelo de cuasiespecies virales, en el sentido que se presenta una secuencia maestra y diferentes variantes que en su conjunto se complementan en un esquema de equilibrio de selección metaestable (Hull, 2014). El análisis de variación indicó además que de los nueve sitios polimórficos a nivel de nucleótidos, sólo uno (el 116) representó un cambio en la secuencia de aminoácidos (Q39P) en la proteína CP de este virus.

El otro linaje de PVS detectado en el trabajo se agrupó en el análisis filogenético con aislamientos de Colombia y otros países representativos de la raza Andina de PVS (PVS<sup>A</sup>) (Figura 2). En este caso, el nivel de variación encontrado entre *reads* representativos de este virus fue mayor que el encontrado para PVS<sup>Col</sup>, al identificarse dos grupos de cepas en proporciones cercanas al 55 y 45 %, respectivamente.

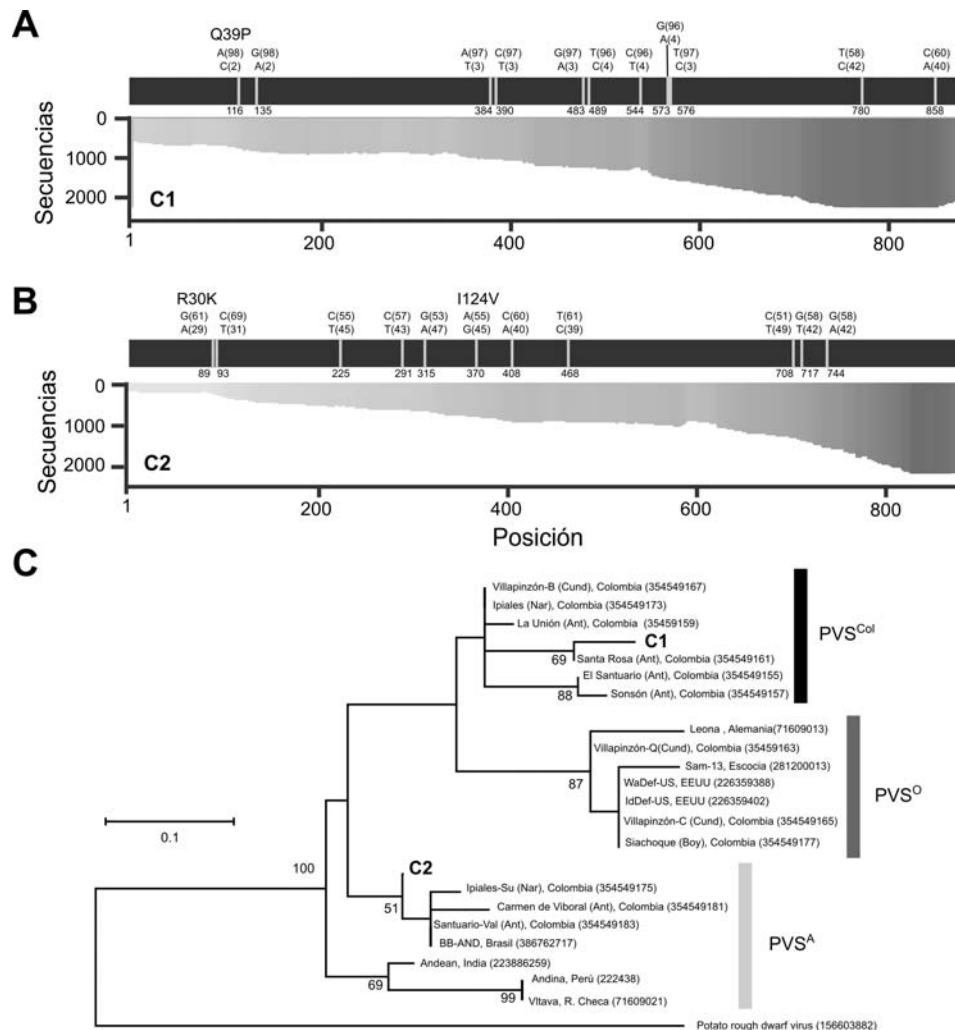
Los niveles de identidad encontrados entre los

dos linajes de PVS detectados en este estudio fueron del 79 % (matriz no mostrada), lo que conduce a recomendar la evaluación independientemente de ambos linajes en programas de certificación de tubérculo-semilla y mejoramiento genético de *S. phureja* por resistencia a PVS, siendo además necesario diseñar cebadores y sondas específicas para su diagnóstico mediante RT-PCR convencional y en tiempo real (qRT-PCR).

**PVV.** El PVV es un miembro del género *Potyvirus* (*Potyviridae*), cuyos viriones consisten de partículas flexuosas de 760 x 11 nm y un genoma de ARNss+ de 9,8 kb, que codifica para una poliproteína que una vez clivada por tres proteasas virales (P1, HC-Pro y NIa), da origen a 10 proteínas maduras (Oruetxebarria et al., 2000). Este virus aparentemente solo ocurre en un número limitado de cultivares de papa causado síntomas moderados (mosaicos suaves, clorosis), aunque presenta una aparente distribución mundial (Oruetxebarria et al., 2000). Salazar (2003) considera que el PVV es un virus limitante para el cultivo de papa, capaz de ocasionar pérdidas cercanas al 40 % y representar alto riesgo para el cultivo debido a sus diferentes medios de dispersión (áfidos, tubérculos). Estudios filogenéticos de los potyvirus registrados en cultivos de papa del Perú han determinado claramente que el PVV representa una especie viral diferente de PVY, *Peru tomato virus* (PTV), *Wild potato mosaic virus* (WPMV) (Spetz et al., 2003) y *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Inoue-Nagata et al., 2002); esto a pesar de que inicialmente se consideraba como una cepa relacionada serológicamente con PVY<sup>C</sup> y PTV (Salazar, 1996). Los resultados del análisis filogenético del presente trabajo confirmaron su separación de dichos virus e indicaron bajos niveles de variación entre las cepas que infectaban la planta estudiada, con tan sólo tres cambios en la secuencia de nucleótidos del gen CP (Figura 3). Sin embargo, los niveles de identidad encontrados entre las cepas de PVV aquí detectadas y aquellas cuyas secuencias se encuentran depositadas en GenBank fueron inferiores al 90 %, lo que debe ser considerado en estudios futuros que aborden la diversidad genética mundial de este virus. Dado que este es el primer reporte formal del PVV en Colombia, de gran interés resultará evaluar la presencia de este

virus en tejido foliar no sólo de *S. phureja*, sino en las diferentes variedades de *S. tuberosum* subsp. andigena cultivadas en Colombia, así como

determinar su posible impacto económico sobre la producción de papa en las diferentes regiones cultivadoras del país.



**Figura 2.** (A y B) *Contigs* que representan el gen de la cápside de los virus PVS<sup>Col</sup> (C1) y PVS<sup>A</sup> (C2) detectados en raíces de una planta de *S. phureja* en Colombia. Se presenta la proporción de lecturas de secuencia (*reads*) identificadas en el estudio para los diferentes segmentos de este gen. (C) Árbol filogenético de máxima verosimilitud, generado a partir del alineamiento de secuencias de referencia del gen de la cápside viral de cepas de PVS con respecto a los *contigs* (C1 y C2) obtenidos en este estudio. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap*. PVS<sup>Col</sup>, PVS<sup>O</sup> y PVS<sup>A</sup> se refieren a la denominación de los linajes de PVS: Colombia, ordinario y Andino, respectivamente

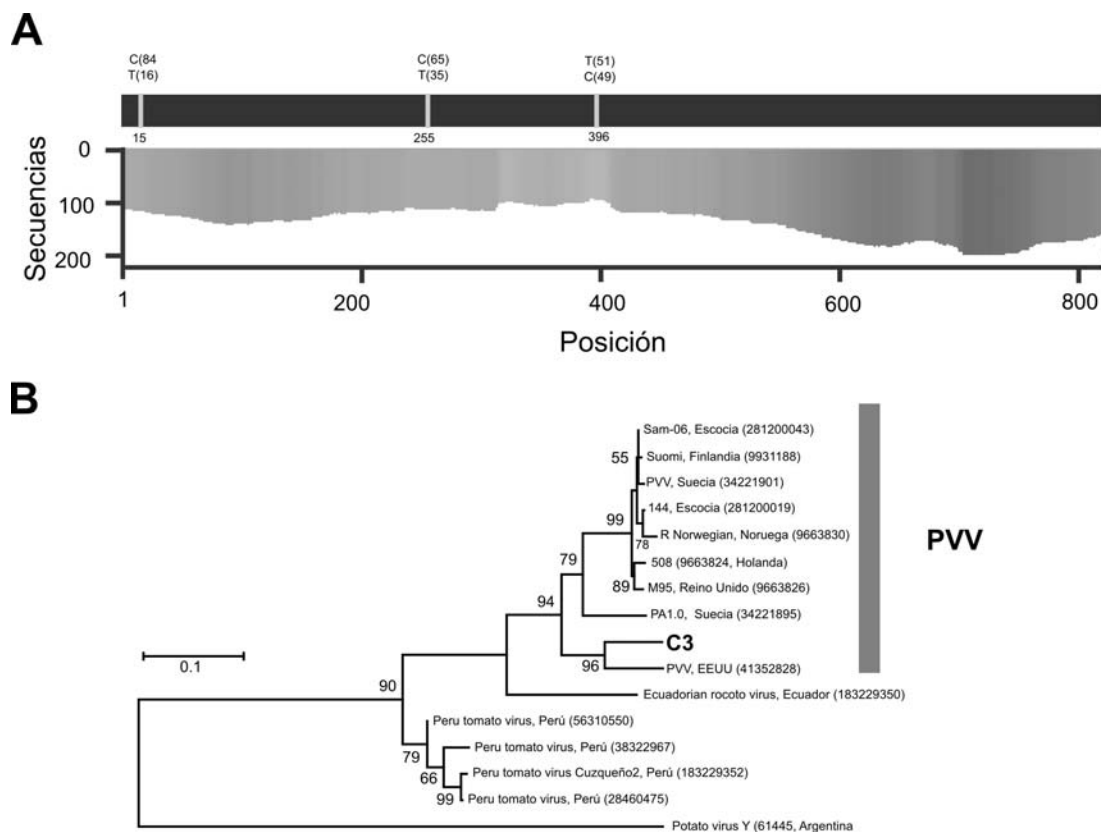
**PLRV.** PLRV es la especie tipo del género *Polerovirus* (*Luteoviridae*) y se caracteriza por presentar partículas icosaédricas de 24 nm y un genoma de ARNs+con cerca de 5900 nt, cuyo extremo 5' se encuentra asociado a VPg (Taliensky et al., 2003). Este virus está restringido al floema de las plantas y es transmitido de forma

persistente no propagativa por áfidos de las especies *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* (Guyader y Ducray, 2002). Los síntomas que induce incluyen enanismos, enrollamiento de hojas, amarillamientos y reducciones en el rendimiento de hasta un 90 % (Kerlan, 2008). PLRV ha sido uno de los virus

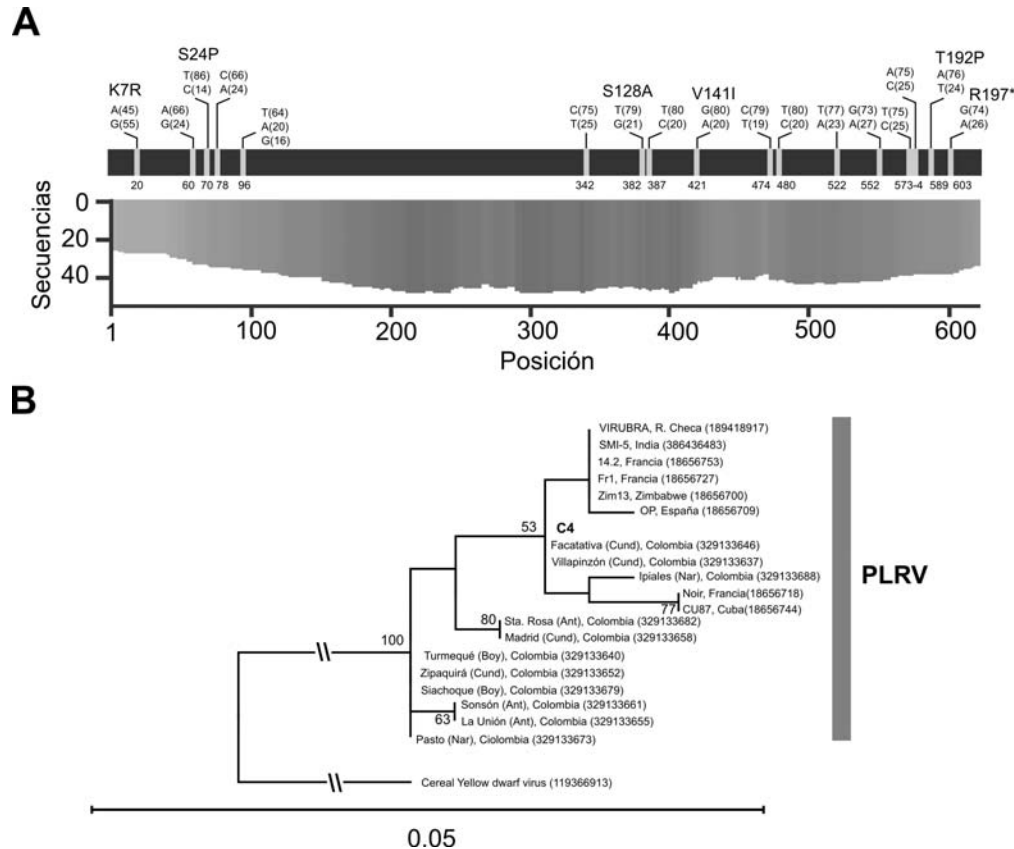
más estudiados y prevalentes en el cultivo de la papa a nivel mundial, así como uno de los que probablemente causan mayores daños (Taliensky et al., 2003; Plchova et al., 2009). El nivel de variación encontrado en las secuencias de aislamientos de PLRV de diferentes orígenes geográficos es muy bajo (Guyader y Ducray, 2002; Plchova et al., 2009), situación que nuevamente se repitió en este trabajo, pues al analizar las secuencias obtenidas de la región que codifica para CP se encontró que éstas compartían más del 99 % de identidad con respecto a secuencias reportadas para otras cepas de PLRV obtenidas en *S. tuberosum* en Colombia (Gil et al., 2011) y otros países del mundo (Guyader y Ducray, 2002; Plchova et al., 2009). Sin embargo a pesar de esto, resultó muy llamativo el hecho que el análisis de pirosecuenciación permitió

identificar 17 posiciones variables, seis de las cuales representan cambios en la secuencia de aminoácidos de CP (Figura 4), lo cual puede indicar que los niveles de variación entre cepas de este virus está subestimada y podría ser mejor abordada a partir del uso de herramientas NGS.

Se espera que los resultados de esta investigación incentiven la utilización de sistemas NGS para profundizar en análisis de viomas en diferentes cultivos de importancia económica en Colombia y otros países latinoamericanos, de manera que se cierre la brecha de conocimiento que actualmente se posee sobre la diversidad de virus que afectan a cultivos como la papa. Esta información será un insumo importante a ser considerado en los programas de certificación de tubérculo-semilla, manejo cultural y mejoramiento genético por resistencia a virus.



**Figura 3.** (A) *Contig* que representa el gen de la cápside del virus PVV detectado en raíces de una planta de *S. phureja* en Colombia. Se presenta la proporción de lecturas de secuencia (*reads*) identificadas en el estudio para los diferentes segmentos de este gen. (B) Árbol filogenético de máxima verosimilitud, generado a partir del alineamiento de secuencias de referencia del gen de la cápside viral de cepas de PVV con respecto al *contig* C3 obtenido en este estudio. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap*



**Figura 4.** (A) *Contig* que representa el gen de la cápside del virus PLRV detectado en raíces de una planta de *S. phureja* en Colombia. Se presenta la proporción de lecturas de secuencia (*reads*) identificadas en el estudio para los diferentes segmentos de este gen. (B) Árbol filogenético de máxima verosimilitud, generado a partir del alineamiento de secuencias de referencia del gen de la cápside viral de cepas de PLRV con respecto al *contig* C4 obtenido en este estudio. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap*

## CONCLUSIONES

En este estudio, utilizando la técnica de pirosecuenciación de ADNc procedente de ARN total de raíces de una planta de *S. phureja* cultivar Criolla Colombia, de una región cultivadora de papa del departamento de Antioquia (Colombia), se detectó la coinfección de tres virus de ARN (PVS, PVV y PLRV) en dichos tejidos, siendo este el primer registro formal de PVV en Colombia.

El análisis bioinformático de los *reads* generados en la pirosecuenciación, permitió identificar diferentes variantes genómicas para los tres virus encontrados, lo que debe ser considerado al momento de diseñar cebadores o sondas para la detección de dichas especies virales. En adición algunos de los polimorfismos

identificados en el gen CP de estos virus, conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante, lo cual podría representar diferencias biológicas entre las variantes de dichos virus y por tanto debería ser abordado en estudios fitopatológicos futuros.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia y por el Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la Universidad de Antioquia.

## LITERATURA CITADA

1. Adams, I.P., R.H. Glover, W.A. Monge, R.



- Mumford, E. Jackeviciene, M. Navalinskiene, M. Samuitiene y N. Boonham. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10: 537-545.
2. Chomczynski, P. y N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
  3. Coetzee, B., M.J. Freeborough, H.J. Maree, J.M. Celton, D.J. Rees y J.T. Burger. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* 400: 157-163.
  4. Conesa, A., S. Gotz, J.M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón y M. Robles. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.
  5. Milne, I., M. Bayer, L. Cardle, P. Shaw, G. Stephen, F. Wright y D. Marshall. 2010. Tablet-Next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* 26: 401-402.
  6. Cox, B.A. y R.A. Jones. 2010. Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Archives of Virology* 155: 1163-1169.
  7. Franco, L., C.A. Soto y M. Guzmán. 2009. Detección de los virus PVX, PVS, PVY y PLRV en la Colección Central Colombiana de papa por medio de la técnica de inmunopresión (IMI). *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 5: 130-139.
  8. Edgar, R.C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.
  9. Gil, J.F., J.M. Cotes y M. Marín. 2011. Incidencia y caracterización molecular del Potato leafroll virus (PLRV) en las principales regiones productoras de papa de Colombia. *Fitosanidad* 15: 17-24.
  10. Gil, J.F., J.M. Cotes y M. Marín. 2012. Detección y caracterización molecular del Virus X de la Papa (PVX) en regiones productoras de papa de Colombia. *Revista Protección Vegetal* 27(2): 69-76.
  11. Gil, J.F., J.M. Cotes y M. Marín. 2013. Detección serológica y caracterización molecular de Potato virus S (PVS, Carlavirus) en cultivos de papa de Colombia. *Revista de Biología Tropical* 61(2): 565-575.
  12. Gutiérrez P.A., J.F. Alzate y M. Marín. 2012. Pirosecuenciación del genoma de una cepa andina de Potato virus S (PVS, Carlavirus) infectando *Solanum phureja* (Solanaceae) en Colombia. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 8(1): 84-93.
  13. Gutiérrez P.A., J.F. Alzate y M. Marín. 2013. Complete genome sequence of a novel Potato virus S strain infecting *Solanum phureja* in Colombia. *Archives of Virology* 158: 2205-2208.
  14. Guyader, S. y D.G. Ducray. 2002. Sequence analysis of Potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *Journal of General Virology* 83: 1799-1807.
  15. Guzmán, M., V. Román, L. Franco y P. Rodríguez. 2010. Presencia de cuatro virus en algunas accesiones de la Colección Central Colombiana de papa mantenida en campo. *Agronomía Colombiana* 28(2): 225-233.
  16. Guzmán, M., A.K. Hernández y L. Franco. 2013. Tracking foliar symptoms caused by tuber-borne Potato yellow vein virus (PYVV) in *Solanum phureja* (Juz et Buk) cultivar 'Criolla Colombia'. *American Journal Potato Research* 90: 284-293.
  17. Halterman, D., A. Charkowski y J. Verchot. 2012. Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Technology* 6(1): 1-14.
  18. Huang, X. y A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.
  19. Hull, R. *Plant virology*. 2014. Academic Press, New York. 1104 p.
  20. ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de papa. ICA, Bogotá. 35 p.
  21. Inoue-Nagata, A.K., M.E. Fonseca, R.O. Resende, L.S. Boiteux, D.C. Monte, A.N. Dusi,

- A.C. de Ávila y R.A. van der Vlugt. 2002. Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. Archives of Virology 147: 849-855.
22. Kerlan, C. 2008. Potato viruses. In: Brian W. Mahy y Marc H. van Regenmortel (eds.). Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Academic Press. Oxford. pp. 458-471.
23. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.
24. Kreuze, J.F., A. Perez, M. Untiveros, D. Quispe, S. Fuentes, I. Barker I y R. Simon. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. Virology 388: 1-7.
25. Matoušek, J., J. Schubert, J. Ptáček, P. Kozlová y P. Dědič. 2005. Complete nucleotide sequence and molecular probing of Potato virus S genome. Acta Virologica 49: 195-205
26. MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural). 2006. Observatorio Agrociencias Colombia. <http://www.agrociencias.gov.co>. (consulta del 03/10/2013).
27. Mokili, J., F. Rohwer y B. Dutilh. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. Current Opinion in Virology 2: 63-77.
28. Nyalugwe, E.P., C.R. Wilson, B.A. Coutts y R.A. 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 Disease 96: 43-54.
29. Nie, X. y R.P. Singh. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. Journal of Virological Methods 91: 37-49.
30. Oruetebarria, I., T. Kekkarainen, C. Spetz y J. Valkonen. 2000. Molecular characterization of Potato virus V genomes from Europe indicates limited spatiotemporal strain differentiation. Phytopathology 90: 437-444.
31. Plchova, H., N. Cerovska, T. Moravec y P. Dedic. 2009. Molecular Analysis of Potato leafroll virus isolates from the Czech Republic. Virus Genes 39: 153-155.
32. Rodríguez, L.E., C.E. Ñustez y N. Estrada. 2009. Criolla Latina, Criolla Paisa y Criolla Colombia, nuevos cultivares de papa criolla para el departamento de Antioquia (Colombia). Agronomía Colombiana 27(3): 289-303.
33. Salazar, L.F. 1996. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima. 214 p.
34. Salazar, L.F. 2003. Potato viruses after the XXth century: effects, dissemination and their control <http://www.crawfordfund.org/assets/files/awards> (consulta del 03/10/2013).
35. Spetz, C., A.M. Taboada, S. Darwich, J. Ramsell, L.F. Salazar y J.P. Valkonen. 2003. Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the centre of origin in Peru. Journal of General Virology 84: 2565-2578.
36. Taliensky, M., M.A. Mayo y H. Barker. 2003. Potato leafroll virus: a classic pathogen shows new tricks. Molecular Plant Pathology 4: 81-89.
37. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
38. Vásquez, V., M. Montero-Astúa y C. Rivera. 2006. Incidencia y distribución altitudinal de 13 virus en cultivos de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) en Costa Rica. Revista de Biología Tropical 54(4):1135-1141.