

PIROSECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE UNA CEPA ANDINA DE *Potato virus S* (PVS, *Carlavirus*) INFECTANDO *Solanum phureja* (Solanaceae) EN COLOMBIA

Fecha de recepción: 4 de marzo de 2012 • Fecha de aceptación: 25 de mayo de 2012

PYROSEQUENCING OF AN ANDEAN STRAIN OF *Potato virus S* (PVS, *Carlavirus*) INFECTING *Solanum phureja* (Solanaceae) IN COLOMBIA

Pablo Andrés Gutiérrez Sánchez Ph.D.¹ • Juan Fernando Alzate Ph.D.² • Mauricio Marín Montoya Ph.D.^{3,4}

RESUMEN

El *Potato virus S* (PVS) es uno de los virus prevalentes en los cultivos de papa del mundo. En Colombia este virus es de los más incidentes en diferentes variedades de *S. tuberosum subsp. andigena* y *S. phureja*. Estudios previos basados en análisis de secuencias del gen de la cápside viral (CP) de aislamientos colombianos de PVS, detectaron la presencia de las dos razas del patógeno (PVS^O y PVS^A), así como un alto nivel de variación entre aislamientos de PVS^A. En esta investigación se secuenció el 98% (8330 nt) del genoma de la cepa RL5 de PVS obtenida a partir de una planta naturalmente infectada de *S. phureja* var. Criolla Colombia en el municipio de La Unión (Antioquia). Para esto se realizó una pirosecuenciación del ADNc obtenido a partir del ARNm de dicha planta, utilizando el sistema 454 *Life Sciences* (Roche). El genoma del aislamiento RL5 de PVS^A (Número de Acceso JX683388) fue ensamblado a partir de un total de 10899 *reads*, con una profundidad promedio de 470.8 y resultó filogenéticamente relacionado con la cepa BB-AND de PVS^A de Brasil, con la que compartió una identidad genética del 94%. Un análisis de agrupamiento basado en el gen CP, permitió identificar a dicha cepa como perteneciente al clado III de PVS^A. La información de este genoma puede ser utilizada para el diseño de cebadores y sondas específicas que apoyen los programas de certificación de tubérculo-semilla y manejo del PVS en Colombia.

Palabras clave: Cápside viral, Papa, Secuenciación de nueva generación (NGS), Virus de ARN.

- 1 Profesor Asociado, Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- 2 Profesor Asociado, Centro Nacional de Secuenciación Genómica- CNSG, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.
- 3 Profesor Asociado, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- 4 Autor para correspondencia: mamarinm@unal.edu.co

ABSTRACT

Potato virus S (PVS) is one of the most prevalent viruses in potato crops around the world. In Colombia, PVS has been shown to be one of the viruses with highest incidence in varieties of *S. tuberosum subsp. andigena* and *S. phureja*. Previous sequence analysis of the CP gene from colombian isolates, detected the presence of two PVS strains, PVS^O y PVS^A, and a high variation within PVS^A isolates. In this work, we report 98% (8330 nt) of the genome sequence of PVS isolate RL5 obtained from a naturally infected plant of *S. phureja* var. Criolla Colombia collected at the municipality of La Unión (Antioquia). The sequence was obtained by pyrosequencing a cDNA library from the infected plant using a 454 Life Sciences sequencer (Roche). The genome of isolate RL5 (Accession number JX683388) was assembled from a total of 10899 reads with an average depth of 470.8 nt and shares 94% identity to strain BB-AND (PVS^A) from Brazil. Cluster analysis using the CP gene assigns this novel strain to clade III of PVS^A. This genomic information can be used for the design of specific primers and probes that support tuber-seed certification and PVS control programs in Colombia.

Key words: Virus coat, Potato, Next Generation Sequencing, RNA viruses.

INTRODUCCIÓN

El *Potato virus S* (PVS) (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*) es uno de los virus prevalentes en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* y *S. phureja*) de Colombia y otros países del mundo (Salazar, 1996; Stevenson et al. 2001; Gil et al. 2012). 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% (Stevenson et al. 2001), siendo aún mayores cuando se presenta en infecciones mixtas con otros virus como PVX (Nyalugwe et al. 2012). El PVS es transmitido de forma no persistente por diversas especies de áfidos incluyendo *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Aphis fabae* y *A. nasturtii* (Wardrop et al. 1989); además su transmisión mecánica y por propagación vegetativa es bastante eficiente (Franc y Bantari, 1996), pudiendo incluso alcanzar incidencias del 100% en los cultivos de papa (Matoušek et al. 2005)

Con base en su reacción local o sistémica sobre plantas indicadoras de *Chenopodium quinoa*, se han descrito dos razas de este virus: la Ordinaria (PVS^O) y la Andina (PVS^A) (Mackenzie et al. 1989; Fletcher, 1996; Cox y Jones, 2010). PVS^A induce síntomas más severos en las plantas infectadas, incluyendo senescencia prematura y defoliación (Jeffries, 1998); además es más eficientemente transmitido por los áfidos que las cepas de PVS^O. A pesar de que la sistemicidad del virus sobre esta planta indicadora fue considerada por muchos años como el principal criterio para la identificación de las razas de PVS, en estudios recientes se han encontrado variantes de PVS^O con capacidad de generar invasión sistémica en *C. quinoa*, pero filogenéticamente distantes de PVS^A (Matoušek et al. 2000, 2005; Lambert et al. 2012); estos aislamientos han sido denominados como PVS^{O-CS} (CS: *Chenopodium systemic*). Por lo anterior, Cox y Jones (2010), proponen

utilizar el acrónimo PVS^A exclusivamente para definir miembros del clado genéticamente diferenciado de las variantes ordinarias de PVS, y no para indicar su reacción sobre plantas de *C. quinoa*.

Los viriones de PVS consisten de varillas flexuosas de 610-710 nm y un genoma de ARN de cadena sencilla positiva (ARNss+) con cerca de 8500 nucleótidos; su extremo 5' está protegido con una caperuza, mientras que el 3' presenta una cola de poli-A similar al del ARNm de los eucariotes. El genoma presenta seis ORF: el ORF1 codifica para un polipéptido de 223 kDa que contiene motivos conservados para Helicasa, Metiltransferasa y Polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp); los ORF 2, 3 y 4 comprenden el triple bloque de genes (TGB), que participan en el movimiento célula a célula del virus; el ORF5 codifica para la cápside viral (CP) de 34 kDa y el ORF6 lo hace para una proteína de 11 kDa rica en cisteína, involucrada en la transmisión por áfidos (Lin *et al.* 2009; Salari *et al.* 2011). A pesar de la amplia distribución mundial de PVS y de su importancia económica para la agroindustria de papa y de producción de tubérculo-semilla, hasta el momento sólo han sido secuenciados completamente cinco genomas de este virus, tres representando miembros de PVS^O (Id4106-US-FJB13513, Wadef-US-FJ813512, Leona-AJ863509) y dos de PVS^A (Vltava-AJ863510 y BB-AND-647830) (Matoušek *et al.* 2005; Lin *et al.* 2009; Duarte *et al.* 2012).

En Colombia, recientemente Gil *et al.* (2012), obtuvieron 15 secuencias parciales del gen CP de aislamientos de PVS obtenidos en cultivos de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño, encontrando que 12 estaban filogenéticamente relacionados con la raza PVS^A, mientras que los tres restantes correspondían a PVS^O. De manera interesante, en este estudio se definieron dos nuevos clados (I y III) de PVS^A no identificados en otros lugares del mundo. Al evaluar los niveles de identidad genética de nucleótidos, se encontró que los

aislamientos colombianos identificados como PVS^O, compartieron tan sólo entre el 76 y 80% con respecto a las secuencias de las cepas clasificadas como PVS^A. Estos valores fueron superiores a 91% (máximo 99%) para todos los aislamientos PVS^O (colombianos e internacionales), mientras que para las secuencias de los aislamientos de PVS^A, se encontraron valores de identidad de 88 a 99%.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas metodologías moleculares tendientes a obtener en un sólo corrido, una gran proporción, sino la totalidad, de las secuencias de un organismo. Dichas tecnologías se conocen en forma genérica como Secuenciación de Nueva Generación (NGS); siendo algunas de ellas basadas en principios de pirosecuenciación (Adams *et al.* 2009; Kobayashi *et al.* 2012). Existen diferentes formatos de NGS, incluyendo 454 *Life Sciences* (Roche, Suiza), *illumina* (San Diego, EEUU) y *Solid* (Applied biosystems, Carlsbad, EEUU) (Kobayashi *et al.* 2012).

La virología vegetal no ha sido ajena a la utilización de los sistemas NGS, y por el contrario en dicho campo se han comenzado a realizar análisis metagenómicos de tejidos e incluso de plantas individuales, resultando en el descubrimiento de nuevos virus y en la definición de perfiles de virus asociados al material biológico bajo estudio, lo que se conoce como "viroma" (Al Rwahnih *et al.* 2011). Así por ejemplo, análisis de NGS se han utilizado para evaluar los virus presentes en una planta de vid presentando síntomas de decaimiento (Al Rwahnih *et al.* 2009); en la identificación de virus de la planta ornamental *Liatis spicata* (Adams *et al.* 2009); en la determinación de las secuencias de los genomas de virus inoculados en plantas de batata (Kreuze *et al.* 2009) y en la evaluación del viroma de un cultivo de vid cv. Merlot en la región de Stellenbosch (Sudáfrica) (Coetzee *et al.* 2010).

Los altos niveles de detección que presenta el PVS en los cultivos de papa de Colombia y su gran diversidad (Gil *et al.* 2012), así como las deficiencias

de información sobre las características genómicas de este virus en la región Andina, centro de origen de la papa, justifican continuar con su estudio más detallado, siendo de especial interés la evaluación de cepas del virus afectando especies y variedades locales de papa. En este trabajo se utilizó el sistema GS FLX 454 *Life Sciences* (Roche), para secuenciar el genoma de una cepa de PVS^A infectando bajo condiciones naturales una planta de *S. phureja* var. Criolla Colombia, obtenida en el municipio de La Unión (Antioquia). Esta información podrá ser utilizada como base para el desarrollo de métodos de diagnóstico específicos para la detección de las variantes de PVS presentes en Colombia y otros países andinos, así como para el apoyo a los programas de mejoramiento genético de papa por resistencia a virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

La investigación se realizó a partir de una planta de dos meses de edad de *S. phureja* var. Criolla Colombia, naturalmente infectada por PVS en un cultivo del municipio de La Unión (Antioquia) (05°58'38"N, 75°21'54"O, 2510 m.s.n.m). Los folíolos fueron conservados a -80°C hasta su uso posterior. El ARN total fue extraído a partir de la maceración con nitrógeno líquido de una mezcla de folíolos de diferentes partes de la planta, utilizando el método del Trizol (Chomczynski y Sacchi, 1987). Posteriormente, dada la presencia de poli-A en el extremo 3' del PVS, se realizó una purificación del ARNm usando el kit *oligotex Direct mRNA* (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La generación del ADN copia (ADNc) se realizó utilizando cebadores aleatorios con el kit *cDNA synthesis system* (Roche). La librería correspondiente se generó con el kit *GS Rapid Library Prep* (Roche) y fue titulada por fluorimetría utilizando el estándar de dicho kit.

Secuenciación y análisis bioinformático

El ADNc amplificado fue purificado utilizando el kit *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, EEUU). El tamaño de los fragmentos de la librería fue determinado en un *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, San José (CA), EEUU) utilizando un chip *High sensitivity DNA* (Agilent). Finalmente, la muestra fue pirosecuenciada en un equipo GS FLX 454 *Life Sciences* (Roche) usando la plataforma del Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la Universidad de Antioquia. Para el secuenciamiento se utilizaron los reactivos TITANIUM (Roche). Las lecturas (*reads*) de pirosecuenciación fueron depuradas con el fin de eliminar las secuencias adaptadoras utilizando la rutina *sff_extract* disponible en http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/index.html. Antes del ensamblaje se eliminaron las secuencias de origen ribosomal y aquellas con una longitud inferior a 50 nt, utilizando rutinas en Perl diseñadas con este propósito. El ensamblaje de las secuencias de origen viral fue realizado con CAP3 usando los parámetros por defecto del programa (Huang y Madan, 1999). La secuencia del genoma del aislamiento RL5 de PVS presentada en este estudio, fue identificada utilizando el programa Blast2GO (Conesa et al. 2005) y depositada en el GenBank bajo el número de accesión: JX683388. La calidad del ensamblaje de la secuencia fue analizada utilizando el programa Tablet (Milne et al. 2010).

La secuencia obtenida para el genoma de la cepa RL5, se alineó con los genomas disponibles en GenBank para este virus, mediante el software Clustal W (Larkin et al. 2007) y se realizó un análisis filogenético con el método Neighbor-Joining utilizando el software MEGA versión 5.0 (Tamura et al. 2011). El soporte de la topología interna del dendrograma fue determinado por análisis de *bootstrap* con 1000 remuestreos (Felsenstein, 1985). Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético utilizando secuencias del gen CP de aislamientos de PVS reportados por Cox y Jones

(2010) y un análisis de recombinación utilizando el método Bootscan (Martin *et al.* 2005) implementado en el programa RDP3 (Martin *et al.* 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pirosecuenciación

En total se obtuvieron 47'030716 nt de datos de secuencias, correspondientes a 140.168 reads. Posterior al ensamblaje en *contigs*, el análisis BLAST indicó que 603 secuencias únicas (su) correspondieron a secuencias putativamente de origen viral, siendo detectados en la planta de *S.*

phureja bajo análisis los virus PVS (573 su), *Potato virus Y* (PVY, 12 su), *Potato virus V* (PVV, 12 su) y *Potato leafroll virus* (PLRV, 6 su), lo cual confirma los múltiples estudios que reportan la ocurrencia frecuente de infecciones virales mixtas en plantas de papa (Jones 1981; Salazar, 1996; Nie y Singh, 2001). El genoma del aislamiento RL5 de PVS^A fue ensamblado a partir de un total de 10899 reads, con una profundidad promedio de 470.8 (Figura 1). La comparación de dicha secuencia con respecto a los genomas depositados en GenBank para PVS, indicó que se logró una cobertura del 98% (8330 nt) del genoma de este virus, faltando los 61 nt del UTR 5' y 234 nt del inicio del ORF1.

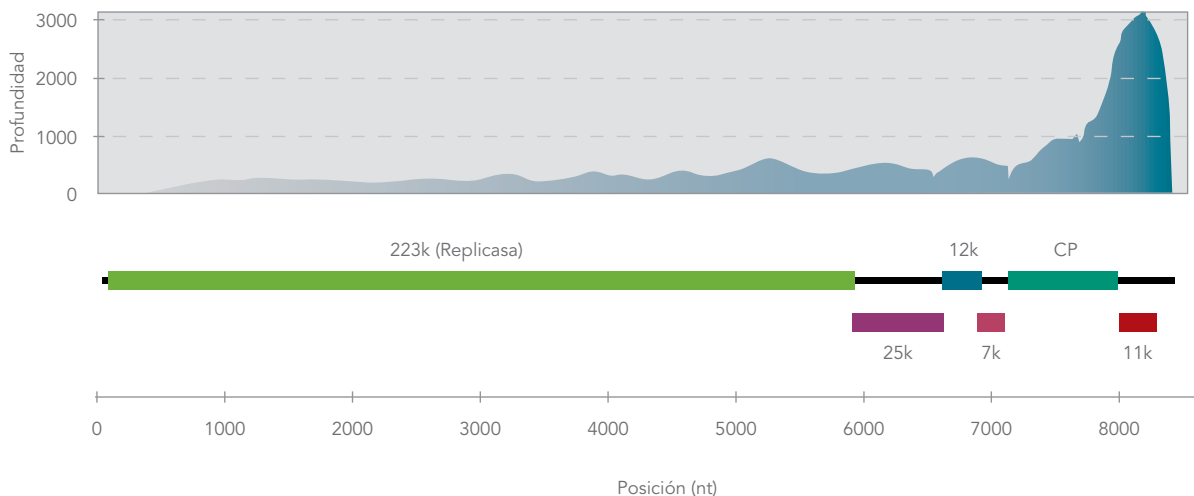


Figura 1. Perfil de profundidad de la pirosecuenciación realizada a partir del ARNm de una planta de *Solanum phureja* naturalmente infectada con PVS en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). En la parte inferior se representa la estructura del genoma de PVS.

Análisis del genoma del aislamiento RL5 de PVS

Al realizar comparaciones del genoma de la cepa RL5 con respecto a cinco genomas de PVS^O reportados en GenBank, tres correspondientes a PVS^O (WaDef-US - FJ813512 e Id4106-US - FJ813513, EEUU y Leona - AJ863509, Alemania), además de dos genomas de PVS^A (BB-AND - JQ647830, Brasil y Vltava - AJ863510, República Checa), se encontró un nivel de identidad para los

8330 nt secuenciados que osciló entre 78 y 94%, siendo los más distantes los aislamientos representando PVS^O y la máxima identidad (94%) la presentada con el aislamiento BB-AND de PVS^A. El árbol filogenético realizado con base en dichas secuencias, ubicó al aislamiento RL5 con BB-AND en un clado soportado por 100% de valor de bootstrap, y distantemente relacionado del otro aislamiento bajo análisis de esta raza (Vltava), así como también de los aislamientos representando PVS^O (Figura 2).

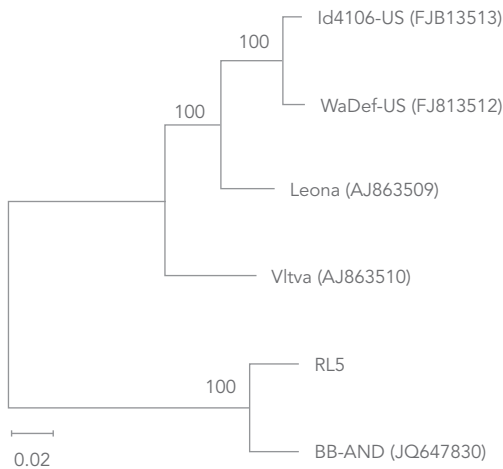


Figura 2. Árbol filogenético generado a partir del alineamiento de cinco genomas de referencia de PVS con respecto a la cepa RL5 obtenida en una planta de *Solanum phureja* var Criolla Colombia, en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). Los números sobre las ramas corresponden a los valores de bootstrap.

Los ORFS secuenciados presentaron las siguientes posiciones en la porción secuenciada del genoma de RL5: ORF1 – Replicasa (1-5694), ORF2 – TGB1 (5684-6412), ORF3 –TGB2 (6393-6716), ORF4 – TGB3 (6683-6880), ORF5 - Cápside (6925-7806) y ORF6 - 11K (7806-8087). El análisis individual para cada ORF determinó que el aislamiento RL5 de PVS^A de Colombia compartió con la cepa BB-AND de Brasil niveles de

identidad de nt y aminoácidos (aa) superiores a 94% y 95.4%, respectivamente, para todos los ORF; siendo el ORF3 que codifica para la proteína de movimiento *tgpb2*, el más similar (97.5% nt y 100% aa), mientras que el ORF1, que presenta motivos de Helicasa, RdRP y Metiltransferasa, fue la región con menor identidad entre ambas cepas (94.1% en nt y 95.4% en aa). Con respecto al otro aislamiento de PVS^A (Vltava), fueron evidentes los bajos niveles de identidad que éste presentó con respecto a la cepa RL5, con valores como 77.7% (82% para aa) para el ORF1. Sin embargo, el ORF5 que codifica para la cápside viral, presentó altos valores entre ambas cepas (91.7% para nt y 98.3% para aa) (Tabla 1). Estos resultados permiten asociar inequívocamente al aislamiento RL15 con el nuevo linaje suramericano de PVS^A, recientemente reportado por Duarte *et al.* (2012) y confirman la observación de dichos autores, en el sentido que el ORF1 del genoma de PVS es la región más variable de este virus a nivel de nt y no aquellas ubicadas en el extremo 3' (CP y 11K), tal como se desprendería del análisis realizado por Lin *et al.* (2009), a partir de genomas de cepas de PVS^O obtenidos en genotipos de papa con resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en EEUU.

Con respecto a las comparaciones realizadas entre el aislamiento RL5 y aquellos de PVS^O, se encontraron

Tabla 1. Porcentajes de identidad de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) entre el genoma de la cepa de PVS RL5 obtenida en *Solanum phureja* var. Criolla Colombia y otros aislamientos de PVS de diferentes razas y orígenes geográficos.

Cepa	ORF1+		ORF2		ORF3		ORF4		ORF5		ORF6	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
BB-AND*	94.1	95.4	96.2	97.9	97.5	100	97.0	95.5	95.5	98.3	95.8	96.8
WaDef**	77.3	84.5	86.3	94.6	83.8	95.4	82.6	84.8	80.7	92.9	80.0	77.7
Leona**	77.3	83.1	86.1	94.2	83.8	94.4	81.6	86.4	79.6	92.9	81.4	80.8
Vltava*	77.7	82.0	89.5	97.9	89.9	100	87.1	95.5	91.7	98.3	88.1	96.8
Id4106**	77.5	84.6	86.5	93.8	84.9	96.1	82.7	86.1	82.1	93.5	81.1	79.8

* Aislamientos de PVS^A; ** Aislamientos de PVS^O. + El ORF1 fue secuenciado parcialmente (5694 nt de 5928 nt).

niveles moderados de identidad a nivel de aa (84.8 a 96.1%) en los ORF codificando para el tgb (2, 3 y 4) y muy inferiores a nivel del ORF1 (77.3-77.5 para nt y 83.1-84.6% para aa) y del ORF6 (80-81.1% para nt y 77.7-80.8 para aa) (Tabla 1).

Por otra parte, con el fin de evaluar la ubicación del aislamiento RL5 en el contexto de los análisis realizados por Cox y Jones (2010) y Gil *et al.* (2012) con base en secuencias del gen CP de aislamientos de PVS de diferentes países del mundo y de Colombia, respectivamente, se realizó un análisis filogenético, que indicó que dicha cepa hace parte del clado III de PVS^A, agrupándose nuevamente con el aislamiento BB-AND (Figura 3). Este resultado soporta la utilidad del análisis de las secuencias de CP para inferir filogenias en la especie PVS, cuando no es posible contar

con la totalidad del genoma (Cox y Jones, 2010; Salari *et al.* 2011). Sin embargo, el alto nivel de variación encontrado a nivel de nt en este gen (82.1 a 95.5%) también conduce a plantear la necesidad de realizar análisis bioinformáticos que incorporen las nuevas secuencias obtenidas para PVS^A, de manera que sea posible ubicar regiones conservadas que permitan una amplificación más eficiente de CP en los estudios de variabilidad genética de este virus. En este sentido, Gil *et al.* (2012) reportaron la imposibilidad de amplificar la totalidad del gen CP en su estudio de variación de PVS en Colombia, razón por la cual debieron combinar dos cebadores (PVSCPF y PVSR) registrados en estudios independientes (Nie y Singh 2001; Ali *et al.* 2008) para obtener 629 nt de los ~885 nt que hacen parte de este gen.

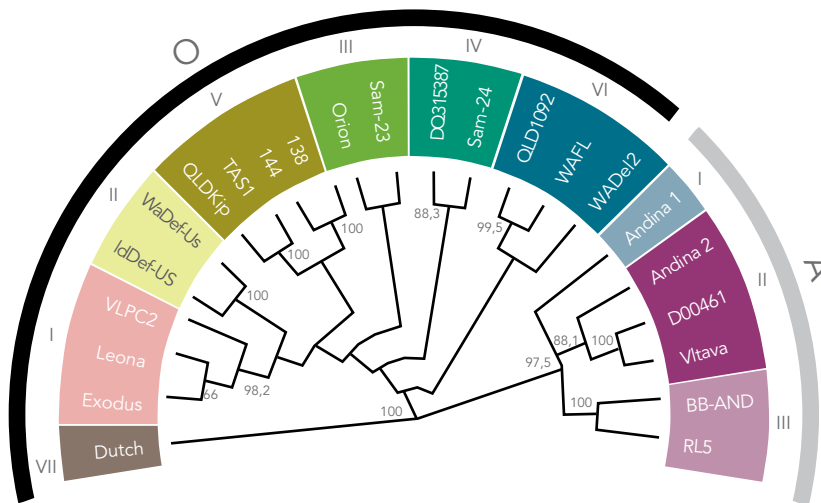


Figura 3. Filograma generado a partir del alineamiento de secuencias del gen de la cápside viral del aislamiento RL5 de PVS de Colombia y otros de referencia procedentes de diferentes países del mundo. Las denominaciones de los clados para la raza PVS^O corresponden a aquellas referidas por Cox y Jones (2010), mientras que para la raza PVS^A se utilizó la nomenclatura de Gil *et al.* (2012). Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap*.

Finalmente, ante las diferencias encontradas en los niveles de identidad presentes a lo largo de los seis ORF del genoma del aislamiento RL5 con respecto a las otras cepas de PVS secuenciadas, se realizó un análisis de recombinación. Sin embargo, con excepción de la cepa Vltava, no se detectó ningún evento recombinatorio en los genomas de dichos aislamientos, incluyendo el de RL5 (Figura 4). Un resultado

similar había sido reportado por Duarte *et al.* (2012), quienes al encontrar un alto nivel de variación entre las secuencias del aislamiento BB-AND de Brasil con secuencias disponibles en GenBank, descartaron la recombinación como principal fuente de variación en dicha cepa; aunque si detectaron la naturaleza recombinante de una importante porción del genoma del aislamiento Vltava de PVS^A de República Checa.

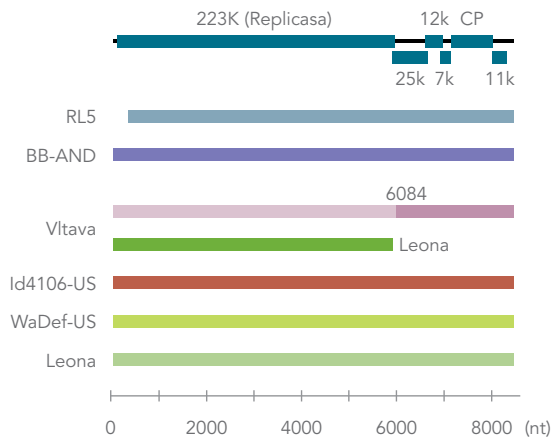


Figura 4. Análisis de recombinación utilizando el método *BootsScan* (Martin *et al.* 2005), para la cepa RL5 de PVS de Colombia y otras de diferentes orígenes geográficos, cuyos genomas se encuentran depositados en GenBank.

Este trabajo representa el primer estudio en el que se obtiene cerca de la totalidad del genoma de una cepa viral afectando el cultivo de papa de Colombia. Para esto se utilizó una estrategia novedosa, como lo es la aplicación de la tecnología GS FLX 454 *Life Sciences* para evaluar el viroma de una planta de *S. phureja* var. Criolla Colombia naturalmente infectada. Los resultados permitieron identificar a la cepa RL5, como perteneciente a un nuevo linaje de PVS^A recientemente

reportado en cultivos de papa de Brasil (Duarte *et al.* 2012). De esta forma se amplía el rango de conocimiento que se tiene en Suramérica de este virus y se plantean diferentes retos, incluyendo el diseño de pruebas de diagnóstico ajustadas a las características genómicas propias de las cepas de PVS afectando los cultivos de papa de Colombia, así como la necesidad de realizar evaluaciones biológicas del virus que incluyan su rango de hospedantes, eficiencia de transmisión por áfidos, propagación vía tubérculo-semilla y sus efectos agronómicos: reducción en el rendimiento, sintomatología en las principales variedades de papa y posibles sinergismos con otros virus.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al apoyo financiero de la Universidad Nacional de Colombia en la Convocatoria Nacional para el fortalecimiento de los grupos de investigación y creación artística de la Universidad Nacional de Colombia (Modalidad 2: Alianzas de grupos) y del Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la Universidad de Antioquia. Se agradece a la compañía Roche S.A. (Colombia) por su apoyo económico para adelantar la secuenciación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E, Navalinskiene M, Samuitiene M, Boonham N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10:537-545.
2. Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Rowhani A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387:395-401.
3. Al Rwahnih M, Daubert S, Urbez-Torres JR, Cordero F, Rowhani A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Archives of Virology*, 156:397-403.
4. Ali M, Maoka T, Natsuaki KT. 2008. The Occurrence of potato viruses in Syria and the molecular detection and characterization of Syrian *Potato virus S* isolates. *Potato Research*, 51:151-161.
5. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.
6. Coetzee B, Freeborough MJ, Maree HJ, Celton JM, Rees DJ, Burger JT. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400:157-163.
7. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21:3674-3676.
8. Cox BA, Jones RA. 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.
9. Duarte P, Ferreira S, Rodrigues S, dos Reis A. 2012. Complete genome sequence of the first Andean strain of *Potato virus S* from Brazil and evidence of recombination between PVS strains. *Archives of Virology*, 157:1357-1364.
10. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
11. Fletcher JD. 1996. *Potato virus S^A* - Characteristics of an isolate from New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24:335-339.
12. Franc GD, Banttari EE. 1996. Translocation and mechanical spread of a Minnesota isolate of *Potato virus S* in potatoes. *American Potato Journal* 73:123-133.
13. Gil, J.F., J.M. Cotes & M. Marín. 2012. Detección serológica y caracterización molecular de *Potato virus S* (PVS, *Carlavirus*) en cultivos de papa de Colombia. *Revista Biología Tropical* (En prensa).
14. Huang, X, Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9:868-877.
15. Jeffries CJ. 1998. Potato FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm No 19. FAO/IPGRI, Roma, Italia.
16. Jones RAC. 1981. The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in the Andean Region of South America. P. 89-107. En: Thresh JM (ed). *Pests, pathogens and vegetation*. Pitman, London.
17. Kreuze JF, Perez A, Untiveros M, Quispe D, Fuentes S, Barker I, Simon R. 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.
18. Kobayashi K, Atsumi G, Yamaoka N, Sekine K. 2012. Review: Sequencing-based virus hunting and virus detection. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 46:123-128.
 19. Lambert SJ, Scott J, Pethybridge S, Hay FS. 2012. Strain characterization of *Potato virus S* Isolates from Tasmania, Australia. *Plant Disease* 96:813-819.
 20. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
 21. Lin Y, Druffel K, Whitworth J, Pavek M, Pappu H. 2009. Molecular characterization of two *Potato virus S* isolates from late-blight-resistant genotypes of potato (*Solanum tuberosum*). *Archives of Virology*, 154:1861-1863.
 22. Mackenzie DJ, Tremaine JH, Stace-Smith R. 1989. Organization and internal homologies of the 3'-terminal portion of *Potato virus S* RNA. *Journal of General Virology*, 70:1053-1063.
 23. Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C. 2005. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 21: 98-102.
 24. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26:2462-2463.
 25. Matoušek J, Schubert J, Dědič P, Ptáček J. 2000. A broad variability of *Potato virus S* (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22:29-37.
 26. Matoušek J, Schubert J, Ptáček J, Kozlová P, Dědič P. 2005. Complete nucleotide sequence and molecular probing of *Potato virus S* genome. *Acta Virologica*, 49:195-205.
 27. Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, Wright F, Marshall D. 2010. Tablet - next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics*, 26:401-402.
 28. Nie X, Singh RP. 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.
 29. Nyalugwe EP, Wilson CR, Coutts BA, Jones RAC. 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.
 30. Salazar LF. 1996. *Potato viruses and their control*. International Potato Center, Lima, Perú, 214 p.
 31. Salari K, Massumi H, Heydarnejad J, Hosseini A, Varsani A. 2011. Analysis of Iranian *Potato virus S* isolates. *Virus Genes*, 43:281-288.
 32. Stevenson WR, Loria R, Franc GD, Weingartner DP. 2001. *Compendium of potato diseases*. APS Press, St. Paul, EEUU, 106 p.
 33. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731-2739.
 34. Wardrop EA, Gray AB, Singh RP, Peterson JF. 1989. Aphid transmission of *Potato virus S*. *American Potato Journal*, 66:449-459.