

Detección serológica y molecular del *Potato virus X* (PVX) en tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) en Antioquia, Colombia

Serological and molecular detection of *Potato virus X* (PVX) in seed potato tubers (*Solanum tuberosum* L. and *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) from Antioquia, Colombia

Daniela García Ruíz*, Manuel Andres Olarte Quintero**, Pablo Gutiérrez Sánchez***, Mauricio Marín Montoya****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.51389

Resumen

El *Potato virus X* (PVX) es uno de los virus más limitantes del cultivo de la papa en el mundo. Es transmitido solamente por contacto y por tubérculo-semilla. Su control se fundamenta en la siembra de tubérculos certificados por su sanidad viral y en la disponibilidad de metodologías de diagnóstico altamente sensibles. En este trabajo se evaluó la prevalencia del PVX en cuatro diferentes tejidos de tubérculos de *Solanum tuberosum* subsp. andígena var. Diacol-Capiro y *S. phureja* var. Criolla Colombia utilizando pruebas de DAS-ELISA para 128 submuestras y de RT-qPCR para 32 grupos de submuestras (4 submuestras/grupo). Los resultados de las pruebas serológicas indicaron la presencia de PVX en el 6,25 y 50% de las submuestras analizadas para la variedad Diacol-Capiro y Criolla Colombia, respectivamente; mientras que los niveles de prevalencia del PVX utilizando la detección por RT-qPCR fueron del 93,75%, independientemente de la variedad de papa y del tejido evaluado. Los valores promedio del ciclo umbral (Ct) en las RT-qPCR fueron de 25,6 (Ct=18,02 a 34,49) y el análisis de las curvas de desnaturalización permitió identificar dos variantes del virus con valores de Tm de 79,5±1°C y 83,7±1°C. La secuenciación de los amplicones obtenidos por RT-qPCR para los controles positivos y para dos de las muestras, confirmó su naturaleza viral. Estos resultados señalan unos muy altos niveles de prevalencia de PVX en el material de siembra de papa en Antioquia y la necesidad de fortalecer los programas de certificación de semilla con pruebas de detección como RT-qPCR.

Palabras clave: DAS-ELISA, *Potexvirus*, RT-qPCR, Solanaceae.

Abstract

Potato virus X (PVX) is one of the most important virus affecting potato crops worldwide. The virus is only transmitted mechanically and through tuber-seeds. Control of PVX is based on the usage of certified tubers, which in turn depends on the availability of sensitive diagnostic tests that allow its direct detection on seeds. In this work, the prevalence of PVX in four different tuber tissues of *Solanum tuberosum* subsp. andígena var. Diacol-Capiro and *S. phureja* var. Criolla was evaluated using DAS-ELISA (128 subsamples) and RT-qPCR (4 subsamples per group). DAS-ELISA revealed the presence of PVX in 6.25 and 50% of Diacol-Capiro and Criolla Colombia subsamples; in contrast, RT-qPCR detected PVX in 93.75% of the samples independent of the potato variety or type of tissue. Ct values were in the 18.02 to 34.49 range with a mean value of 25.6. Melting curve analysis allowed the identification of two virus variants with Tm values of 79.5±1°C and 83.7±1°C. Sanger

* Ingeniera Biológica. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. dagarciaaru@unal.edu.co

** Estudiante de Zootecnia. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. maolarteq@unal.edu.co

*** Biólogo, PhD, Profesor Asociado. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. paguties@unal.edu.co

**** Ingeniero Agrónomo, MSc., PhD, Profesor Asociado. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. mamarinm@unal.edu.co

sequencing of the positive controls and two of the samples confirmed RT-qPCR amplicons to be PVX. These results reveal a high level of prevalence of PVX in potato tuber seeds used in Antioquia and the need to strengthen seed certification programs in Colombia through RT-qPCR detection assays.

Key words: DAS-ELISA, *Potexvirus*, RT-qPCR, Solanaceae.

Recibido: noviembre 18 de 2015 **Aprobado:** abril 30 de 2016

Introducción

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) en Colombia ocupa cerca de 160.000 ha distribuidas en 14 departamentos. Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño son responsables del 85 % de la producción, que asciende a cerca de 2,9 millones de t/año y de la que dependen cerca de 69.000 familias del sector rural del país (DANE, 2013). Las enfermedades virales se constituyen en uno de los problemas fitosanitarios más importantes para este cultivo en Colombia y otros países del mundo; siendo los virus más limitantes el *Potato virus Y* (PVY) (Género *Potyvirus*, Familia *Potyviridae*), *Potato virus S* (PVS) (Género *Carlavirus*, Familia *Betaflexiviridae*), *Potato leafroll virus* (PLRV) (Género *Polerovirus*, Familia *Luteoviridae*), *Potato yellow vein virus* (PYVV) (Género *Crinivirus*, Familia *Closteroviridae*) y *Potato virus X* (PVX) (Género *Potexvirus*, Familia *Alphaflexiviridae*) (Salazar, 2006; Kerlan, 2008).

Los viriones de PVX consisten de varillas flexuosas de 470-580 nm de longitud y 13 nm de diámetro, con un genoma de ARN de cadena sencilla positiva de 6435 nt (Accesión NC_011620), en cuyo extremo 5' se presenta una caperuza de m7G y en el 3' una cola de poli-A. Su genoma consiste de cinco marcos de lectura abiertos (ORFs); el ORF1 codifica para una replicasa viral (RdRp) (*RNA dependent RNA polymerase*), mientras que los ORFs 2 a 4, se presentan traslapados y son denominados como triple bloque de genes (TGB), que codifican para tres proteínas, TGBp1, TGBp2 y TGBp3, involucradas en el movimiento célula a célula del virus; en adición se ha demostrado que TGBp1 también participa como supresor del mecanismo de defensa de las plantas mediado por silenciamiento de ARN (Bayne *et al.*, 2005; King *et al.*, 2011). Finalmente, el ORF5 codifica para la proteína de la cápside viral (CP) de 21 kDa, que además de cumplir funciones estructurales, es un inductor de la respuesta hipersensible en plantas con genes específicos de resistencia a este virus (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Kutnjak *et al.*, 2014). El ORF1 es traducido directamente del ARN genómico produciendo la replicasa viral de 165,7 kDa, con sus dominios funcionales de metil-transferasa, unión a nucleótidos, helicasa y RdRp; por su parte, los ORFs 2 a 5 son expresados a partir de ARN subgenómicos (ARNsg) con extremos 3' co-terminales (King *et al.*, 2011).

PVX es uno de los virus más ampliamente distribuidos en los cultivos de papa del mundo y en otras plantas

solanáceas incluyendo el tomate y tabaco; también infecta diversas especies indicadoras de las familias Chenopodiaceae, Amaranthaceae y Fabaceae. Recientemente, se ha reportado la infección natural de PVX en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*) en Colombia (Gutiérrez *et al.*, 2015), así como de arveja (*Pisum sativum*) en Irán (Esfandiari *et al.*, 2009) y de la arvense medicinal *Sanicula chinensis* (Apiaceae) en China (Cox y Jones, 2010), lo que es un claro indicativo que el rango de hospedantes de este virus es más amplio de lo que inicialmente se había considerado.

En plantas de papa, PVX causa síntomas suaves que incluyen mosaicos intervenales y amarillamientos tenues en hojas jóvenes; sin embargo en variedades altamente susceptibles puede inducir mosaicos severos, enanismos y pérdidas en los rendimientos del 5 al 20 % (Moriera *et al.*, 1980; Cox y Jones, 2010). Adicionalmente, se ha encontrado que la ocurrencia de infecciones mixtas de PVX con potyvirus como el *Potato virus A* (PVA) y PVY resultan en mayores pérdidas para los cultivos de papa, gracias al sinergismo entre estos virus (Nie y Singh, 2013).

En términos biológicos, el PVX se ha subdividido en cuatro grupos de razas definidas por la respuesta a la inoculación de los aislamientos en cultivares diferenciales de papa conteniendo los genes dominantes de respuesta hipersensible Nb y Nx (Moriera *et al.*, 1980). De esta forma, la raza 1 se caracteriza por no sobrepasar ninguno de estos genes, mientras que las razas 2 y 3 lo hacen para Nx y Nb, respectivamente; y la raza 4 para ambos genes. Adicionalmente, el aislamiento andino HB, sobrepasa Nx y Nb y el gen de resistencia extrema Rx (Cox y Jones, 2010). Análisis filogenéticos basados tanto en la región CP como en el genoma completo de PVX, han demostrado la presencia de dos linajes principales del virus en el mundo: I, también denominado como Euroasiático y II ó Americano; dicha nomenclatura no excluye la ocurrencia de aislamientos de estas regiones en los otros clados, tal como ocurre con el subclado II-1 que siendo denominado como Americano, presenta aislamientos de Inglaterra (Cox y Jones, 2010; Mandal *et al.*, 2012).

En Colombia, la ocurrencia de PVX en papa se reportó inicialmente en infecciones mixtas con PVY, PVS, PLRV y PYVV (Guerrero *et al.*, 1980) y, posteriormente, en la evaluación mediante pruebas de DAS-ELISA de un grupo de 581 accesiones de papa de la Colección Central Colombiana, se encontró en el 13,9 % de las muestras

(Guzmán *et al.*, 2010). Más recientemente, Gil *et al.* (2012) evaluaron la presencia de este virus mediante DAS-ELISA en 320 muestras foliares, representando diez zonas productoras de cuatro Departamentos de Colombia (Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño), y determinaron un índice de detección promedio del 8 %, siendo Nariño la región con mayores niveles de detección (15 %). En este mismo estudio se encontró a partir de la secuenciación de una región de 562 pb de CP, la ocurrencia de aislamientos Colombianos de PVX relacionados filogenéticamente tanto con el linaje Eurasiático (Clado I) como con el Americano (Clado II) y con niveles de variación hasta del 23 % en la región bajo estudio, lo que representa un amplio rango de diversidad genética de este virus en el país.

Ya que el PVX es transmitido por vía mecánica (ej. contacto de plantas, herramientas agrícolas) y por tubérculos-semilla infectados, el desarrollo de metodologías de diagnóstico de este virus que permitan su detección directamente a partir de tejidos de tubérculos, es un aspecto fundamental para el manejo integrado de esta enfermedad. En este estudio se evaluó la prevalencia del PVX en cuatro tipos de tejidos de tubérculos de *S. tuberosum* ssp. andigena var. Diacol-Capiro y *S. phureja* var. Criolla Colombia utilizando pruebas de DAS-ELISA y de PCR cuantitativa con retro-transcripción previa (RT-qPCR). La presencia del PVX en estos tejidos, fue además confirmada mediante secuenciación de algunos de los amplicones obtenidos en las pruebas de RT-qPCR.

Materiales y métodos

Muestras

Esta investigación se realizó con 16 muestras de tubérculos-semilla de *S. tuberosum* subsp. andigena var. Diacol-Capiro y 16 de *S. phureja* var. Criolla Colombia, obtenidas directamente de campos de agricultores y comercializadores de semilla en los municipios de La Unión (Vereda Chuscalito y Cabecera urbana) y Yarumal (corregimiento de Llanos de Cuivá y Cabecera urbana) (Antioquia). Cada uno de los tubérculos se subdividió en cuatro submuestras, correspondientes a porciones de 0,5 a 1 cm² de tejidos de piel, yemas no brotadas, base de brotes y ápice de brotes.

Pruebas de DAS-ELISA

En cada una de las 128 submuestras bajo estudio, se evaluó la presencia de PVX mediante pruebas de DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich*) de la compañía Agdia (Indiana, EEUU) que utilizan anticuerpos policlonales tanto para la captura como para el conjugado a fosfatasa alcalina utilizado en el revelado. Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia), incluyendo en cada prueba dos controles positivos consistentes de una

muestra liofilizada de papa infectada con PVX (Agdia) y una muestra de tejido foliar de *S. phureja* con síntomas de mosaicos tenues obtenida en el municipio de La Unión (Antioquia). Como control negativo de la prueba de DAS-ELISA, se utilizó una muestra liofilizada de tejido de papa libre de virus (Agdia). Los resultados de las pruebas de ELISA fueron analizados a partir del procedimiento estadístico descrito por la compañía serológica Bioreba (Suiza), que utiliza un histograma de distribución de frecuencias, como base para la definición del sitio de corte (*Cut-off*) que diferencia las muestras negativas de aquellas positivas, utilizando la fórmula:

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

La naturaleza viral del control positivo local de *S. phureja* fue confirmada por RT-PCR convencional y secuenciación Sanger siguiendo el protocolo reportado por Gil *et al.* (2012), con los cebadores PVXF (5'-TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG-3') y PVXR (5'-GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC- 3') que se unen a las posiciones del genoma de PVX 5664-5683 y 6225-6205, respectivamente, y amplifican un producto de 562 pb de la región CP (Nie y Singh, 2001).

Pruebas de RT-qPCR

Para la detección de PVX utilizando RT-qPCR se utilizaron grupos (*bulks*) de cuatro submuestras correspondientes a cada tipo de tejido de los tubérculos procedentes de cada localidad bajo estudio, para un total de 32 muestras bajo análisis (tabla 1). El ARN total se extrajo utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher Scientific, EEUU), a partir de 100 mg del tejido macerado, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN así obtenido fue eluido en 50 µL de agua tratada con DEPC y determinada su concentración y pureza por lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific).

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en dos pasos utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores PVX_101-2_FP: (5' AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC 3') y PVX_101-2 RP: (5' GCT TCA GAC GGT GGC CG 3') que generan un amplicon de 101 pb correspondiente a la región de CP ubicada entre las posiciones 6110 y 6211 del genoma de referencia de la accesión del GenBank M38480 (Agindotan *et al.*, 2007). La transcripción reversa se realizó en 20 µL con 200 U de la enzima Maxima Transcriptasa reversa (Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 pmol del cebador reverso PVXR, 20 U de inhibidor de ribonucleasas (ARNasas) (RiboLock, Thermo Fisher Scientific) y 4 µL del ARN total. Las reacciones se incubaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) a 65 °C por 5 min, seguido de 50 °C por 30 min y 85 °C por 5 min para desnaturar la enzima. Las reacciones de

Tabla 1. Detección por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) del *Potato virus X* (PVX) en tubérculos-semilla de papa procedentes de diferentes localidades en Antioquia.

Muestra	Localidad de procedencia	Variedad	Tejido de tubérculo	Valor de Ct*	Valor de Tm**
C-				>35**	
C+ (Agdia)				20,49	83,7
<u>C+ (<i>S. phureja</i>)</u>				20,06	83,7
<u>C+ (<i>P. peruviana</i>)</u>				26,8	80,6
1	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Piel	22,83	81,0
2	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Yemas	>35	
3	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Base de Brotes	25,99	80,7
4	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	23,24	80,5
5	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Piel	25,33	80,5
6	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Yemas	25,02	80,5
7	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Base de Brotes	25,65	80,3
8	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	24,68	80,7
9	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Piel	25,67	80,5
10	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Yemas	25,44	80,5
11	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Base de Brotes	25,26	80,5
12	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	24,26	80,3
13	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Piel	28,02	85,3
14	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Yemas	27,39	85,0
15	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Base de Brotes	24,88	85,2
16	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	22,09	85
17	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Piel	32,78	79,8
18	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Yemas	31,68	79,5
19	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Base de Brotes	>35	
20	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Ápice Brotes	25,20	82
21	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Piel	34,49	78,2
22	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Yemas	32,65	78,7
23	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Base de Brotes	28,81	80,3
24	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Ápice Brotes	25,3	80,5
25	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Piel	24,24	84,5
26	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Yemas	23,68	84,3
27	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Base de Brotes	21,76	84,2
28	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Ápice Brotes	18,02	84,5
29	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Piel	24,89	84,5
30	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Yemas	27,36	84,5
31	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Base de Brotes	23,32	84,5
32	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Ápice Brotes	18,65	84,7

* Ct corresponde al ciclo umbral de amplificación; Ct>35 representa resultados negativos en las pruebas de RT-qPCR.

** Tm indica la temperatura de fusión, es decir aquella en la que el 50% de la doble hélice de los amplicones se encuentran desnaturalizados. Las muestras subrayadas corresponden a los amplicones obtenidos por RT-qPCR que fueron secuenciados y confirmados como parte de la región que codifica para la cápside de PVX.

qPCR se realizaron en 25 μ L conteniendo 12,5 μ L del kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 10 μ L de agua estéril tratada con DEPC, 0,3 μ M de los cebadores PVX_101-2_FP y PVX_101-2_RP y 50-100 ng de ADN copia (ADNc). La amplificación se adelantó en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen) y consistió de 95 °C por 10 min para activar la Taq-polimerasa (*Hot-start*), seguido por 35 ciclos de 95 °C por 10 s y 50 °C por 45 s. La adquisición de fluorescencia se realizó después de cada ciclo de amplificación y los valores de ciclo umbral (Ct) para cada muestra fueron definidos utilizando los valores por defecto del programa Rotor-Gene Q ver. 1.7., siendo consideradas como positivas aquellas muestras que superaron el Ct antes del ciclo 35 (Schna et al., 2004). Posteriormente, los amplicones fueron sometidos a un análisis de desnaturalización utilizando la herramienta del equipo HRM (*High Resolution Melting*) entre 50 y 99 °C y comparados los valores de Tm (*melting temperature*) con respecto a los alcanzados para los controles positivos de *S. tuberosum* (Agdia), *S. phureja* y *S. peruviana*, infectados con PVX; este último corresponde a la muestra utilizada por Gutiérrez et al. (2015) para obtener el primer reporte del genoma completo de este virus en Colombia. Todas las reacciones incluyeron además una muestra blanco (libre de ADN copia).

Finalmente, cinco de los amplicones correspondientes a dos muestras de tejido de tubérculo, al PVX de *S. peruviana* y a los dos controles positivos, fueron secuenciados por el método de Sanger, previa purificación con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Las secuencias fueron editadas con el software Mega 6.0 (Tamura et al., 2013) y comparadas con GenBank mediante BLASTN (Altschul et al., 1990).

Resultados y discusión

Pruebas de DAS-ELISA

El PVX fue detectado utilizando las pruebas de DAS-ELISA con anticuerpos policlonales, en el 6,24 % y 50 % de las submuestras de tubérculos de la variedad Diacol-Capiro y Criolla Colombia, respectivamente; en la primera variedad, PVX sólo fue encontrado en tejidos de brotes (base y ápices), mientras que en Criolla-Colombia fue encontrado en los cuatro tipos de tejidos evaluados (figura 1). La validez de la prueba de DAS-ELISA fue confirmada por que se obtuvieron valores esperados tanto para los controles positivos (2,77 para Agdia y 2,88 para *S. phureja* foliar) como para los controles negativos (promedio=0,115; SD=0,025); definiéndose en el histograma de frecuencias de absorbancias a 405 nm el nivel de 0,173, como el valor de corte del ensayo. La naturaleza viral del control positivo de *S. phureja* utilizado en el estudio, fue confirmada por secuenciación Sanger del amplicon de 562 pb, que presentó niveles de identidad del 99 % con

respecto a diferentes accesiones de CP de PVX (Ej. X65015, HG518657 y HQ433257, valor $e=0,0$). La accesión HQ433257 corresponde a la región CP de un aislamiento reportado por Gil et al. (2012) del municipio de la Ceja del Tambo (Antioquia).

Las diferencias evidentes encontradas entre los niveles de prevalencia de PVX detectados mediante pruebas de DAS-ELISA en los dos materiales de papa evaluados, deben registrarse con cautela, dados los niveles moderados de sensibilidad de esta prueba y los bajos rangos de título que alcanzan los virus en tejidos tubérculos en dormancia (Mumford et al., 2000; Agindotan et al., 2007; Fageria et al., 2013). Por esta razón, también se evaluó la infección del PVX utilizando pruebas de RT-qPCR a partir de ARN total extraído de *bulks* de tejidos constituidos a partir de las mismas submuestras utilizadas en las pruebas de DAS-ELISA. Reportes de literatura de detección de virus en papa, dan cuenta de grandes diferencias entre los niveles de sensibilidad alcanzados en dichas pruebas. Así por ejemplo, Mumford et al. (2000), registran que el uso de RT-qPCR para detectar el *Potato mop-top virus* (PMTV) ofrecía niveles de detección superiores en 10^4 veces a los obtenidos con pruebas convencionales de ELISA; mientras que Kogovsek et al. (2008), en un estudio tendiente a diseñar pruebas de RT-qPCR para diferenciar aislamientos recombinantes de PVY^{NTN}, encontraron que las pruebas en tiempo real presentaban niveles de sensibilidad superiores entre 10^5 y 10^7 veces, con respecto a las pruebas de ELISA tradicionalmente empleadas para detectar este virus.

Pruebas de RT-qPCR

Utilizando pruebas de RT-qPCR con el sistema SYBR Green I y cebadores específicos que amplifican un segmento de 101 pb de la región CP, fue posible detectar el PVX en 30 de las 32 (93,75 %) muestras evaluadas de ambas variedades de papa, independientemente del tipo de tejido utilizado y de la localidad de procedencia de los tubérculos. Los valores de ciclo umbral (Ct) encontrados para las muestras se presentaron en el rango de 18,02 a 34,49, con un promedio de 25,6, mientras que dichos valores fueron de 20,49, 20,06 y 26,8 para los controles positivos de *S. tuberosum* (Agdia), *S. phureja* y *P. peruviana*, respectivamente (tabla 1). El análisis de las curvas de desnaturalización, permitió identificar dos grupos de valores de Tm entre las muestras analizadas: Tm₁=79,5 \pm 1°C y Tm₂=83,7 \pm 1°C, lo que representa la ocurrencia de al menos dos variantes de este virus en los cultivos de papa de Antioquia. El amplicon generado para el control positivo de *P. peruviana* presentó el Tm₁ (80,6°C), mientras que aquellos de *S. tuberosum* y *S. phureja* correspondían al Tm₂ (83,7°C) (figura 2). Trabajos moleculares previos, realizados por Gil et al. (2012) a partir de análisis de secuencias de la cápside viral de aislamientos de PVX procedentes de tejido foliar de papa de diferen-

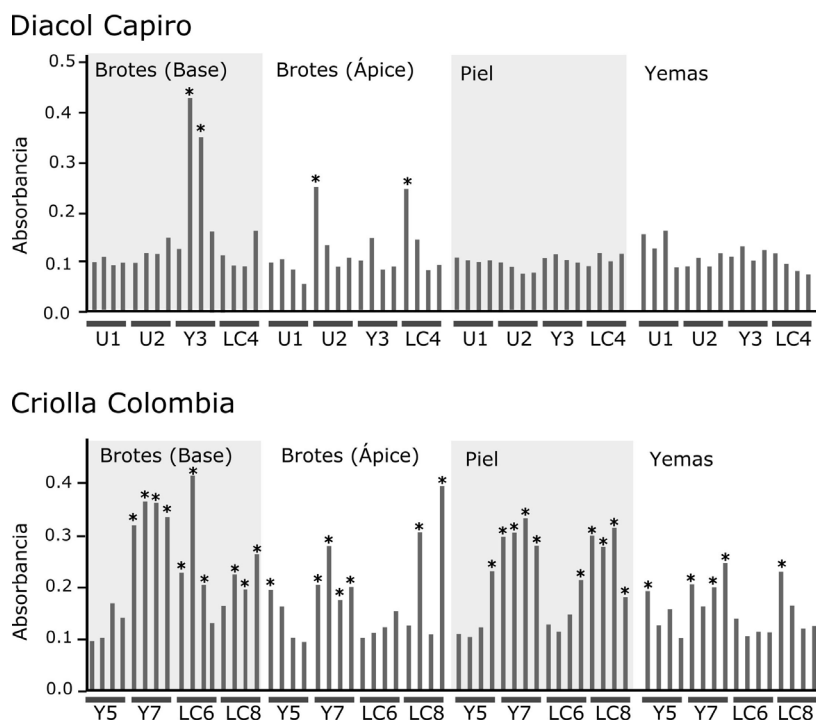


Figura 1. Resultados de las pruebas de DAS-ELISA para la detección de *Potato virus X* (PVX) en diferentes tejidos de tubérculos de papa variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, obtenidos en el Departamento de Antioquia (Colombia). Los asteriscos (*) representan los resultados positivos, utilizando como valor de corte del ensayo una absorbancia de 0,173. Los nombres en el eje X representan los sitios de muestreo. Y3, 5, 7: Yarumal-Cabecera; LC4, 6, 8: Yarumal-Llanos de Cuivá; U1: La Unión-Cabecera; U2: La Unión-Chuscalito.

tes departamentos del país, demostraron la ocurrencia de cepas asociadas filogenéticamente a los dos linajes de este virus reportados en el mundo (I: Eurasiático y II: Americano). Además, los análisis de identidad utilizando las secuencias de CP indicaban la presencia de niveles de disimilitud de hasta el 23 % entre cepas colombianas de PVX, lo que señalaba un alto nivel de variación de esta especie viral en el país.

La naturaleza viral de los amplicones obtenidos en las reacciones de RT-qPCR fue confirmada por secuenciación Sanger, encontrándose un 100 % de identidad entre las secuencias de los controles positivos de *S. tuberosum* y *S. phureja*, y de dos de las muestras de tubérculos, con respecto a secuencias de aislamientos del clado de Eurasia de PVX (ej. KF568900 y GU144348, valor $e=4 \times 10^{-19}$). Por su parte, la secuencia del control positivo de *P. peruviana* presentó alta identidad con la accesión correspondiente al genoma completo de PVX (KM659859, valor $e=2 \times 10^{-15}$) reportada por Gutiérrez *et al.* (2015).

Los altos niveles de infección de PVX detectados en este trabajo a partir de tubérculos de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia no resultan sorprendentes, por cuanto trabajos previos realizados en Colombia utilizando técnicas menos sensibles que la RT-qPCR como ELISA (Guzmán *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2012) e inmu-

noimpresión (Franco-Lara *et al.*, 2009) habían señalado la prevalencia de este virus en tejido foliar de diferentes variedades de papa en niveles de entre 8 y 20 %; mientras que en trabajos adelantados en otros países en desarrollo como China (Wang *et al.*, 2011), Pakistán (Abbas *et al.*, 2012) y Camerún (Njukeng *et al.*, 2013), los niveles reportados de infección por PVX alcanzan valores de 12,4 % (en tejido foliar), 53,6 % (en tejido foliar) y 90 % (en tubérculos), respectivamente. Estos hallazgos de infección de PVX, son un indicador de los problemas que se tienen en Colombia y en otros países con respecto a los programas de manejo integrado de enfermedades virales y de certificación por su sanidad viral de los tubérculos-semilla de papa, pues se ha demostrado que virus como el PVX que no son transmitidos por áfidos u otros artrópodos, pueden ser efectivamente controlados a partir de la utilización de material de siembra libre de virus y prácticas culturales genéricas (ej. desinfección de herramientas, restricción a ingreso de lotes, etc.) (Halterman *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2013). Así por ejemplo, en países como EEUU y Canadá, los niveles de detección de este virus en los cultivos de papa son marginales, siendo reportado que aún en grandes regiones cultivadoras como Wisconsin (EEUU), de 500.000 plantas evaluadas en el programa de certificación de semilla entre los años 1990 a 2000, ninguna resultó positiva para la infección de PVX; así

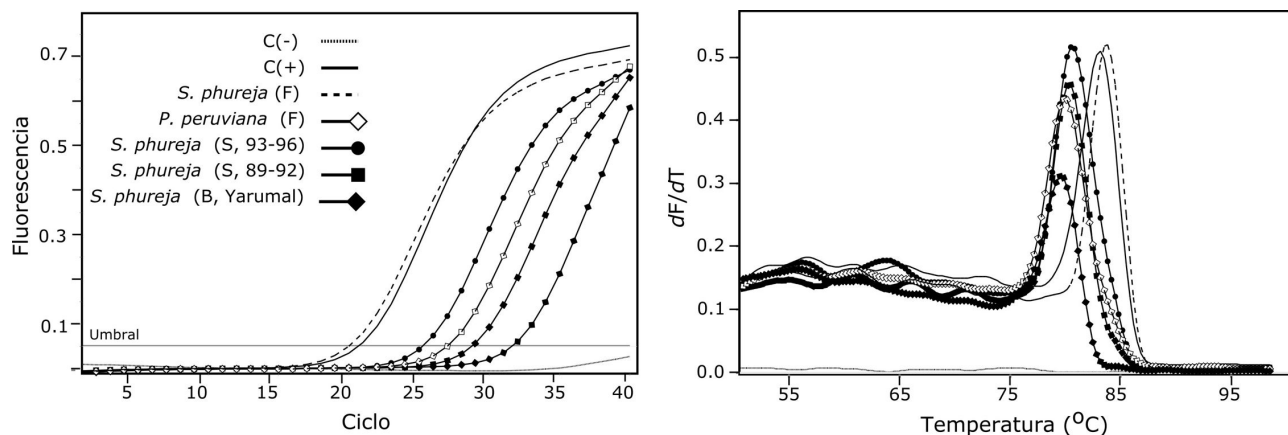


Figura 2. (A) Curvas de amplificación por RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores PVX_101-2_FP y PVX_101-2 RP para la detección del *Potato virus X* (PVX) en tejidos de tubérculos de papa obtenidos en el Departamento de Antioquia (Colombia). (B) Perfiles de las curvas de desnaturalización de amplicones específicos de PVX obtenidos por RT-qPCR, mostrando los dos grupos de valores de T_m ($T_{m1}=79,5\pm 1^\circ\text{C}$ y $T_{m2}=83,7\pm 1^\circ\text{C}$) que identifican dos variantes de este virus en Antioquia.

como tampoco se detectó este virus en evaluaciones realizadas en 2010 a partir de 2100 plantas procedentes de 20 lotes cultivados con nueve variedades de papa en este estado (Frost *et al.*, 2013).

Como se puede inferir de los resultados obtenidos en este estudio, los niveles de prevalencia de PVX en tubérculos-semilla de las variedades Diacol-Capiro y Criolla-Colombia procedentes de diferentes localidades de Antioquia, son muy altos, por lo que es imperativo el fortalecimiento de los programas de certificación de semilla de papa en el país y la utilización de metodologías de detección de virus altamente sensibles, como la RT-qPCR aquí evaluada, para de esta forma garantizar la sanidad de los materiales de plantas madre *in vitro*, Super-Elite y Elite, utilizados como material para la obtención de la semilla básica, registrada y certificada de papa que es comercializada en el país.

Conclusiones

Utilizando pruebas de DAS-ELISA y RT-qPCR, en este trabajo se detectaron altos niveles de prevalencia del PVX en diferentes tejidos de tubérculos-semilla de papa de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, por lo que es necesario el fortalecimiento de los programas de certificación de semilla de papa en Colombia y facilitar el acceso a dicho material por parte de los pequeños agricultores de este tubérculo en el país.

La técnica de RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores específicos PVX_101-2_FP y PVX_101-2 RP, permitió la detección del PVX en los cuatro diferentes tejidos de tubérculos de papa evaluados (piel, yemas no brotadas, base de brotes y ápice de brotes); presentándose amplificaciones positivas en valores de ciclo umbral (C_t) tan bajos como 18,02 y

con un promedio de 25,6, lo que implica la ocurrencia de altos niveles de título viral en dichos tejidos. Con el uso de la herramienta de análisis de curvas de desnaturalización acoplada a esta prueba, se determinó la ocurrencia de al menos dos variantes de este virus en Colombia, diferenciados por valores de T_m de $79,5\pm 1^\circ\text{C}$ y $83,7\pm 1^\circ\text{C}$.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia a través del proyecto 19438 de la Convocatoria: Nuevos proyectos de investigación, creación o innovación (Modalidad 2).

Referencias bibliográficas

- Abbas, M. F., Hameed, S., Rauf, A., Nosheen, Q., Ghani, A., Qadir, A., & Zakia, S. (2012). Incidence of six viruses in potato growing areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 24(1), 44-47.
- Agindotan, B. O., Shiel, P. J., & Berger, P. H. (2007). Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 142(1-2), 1-9.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Bayne E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y., & Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*, 44(3), 471-482.
- Cox A., & Jones, R. (2010). Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus X* and the current relationship between phylogenetic placement and resistance groupings. *Archives of Virology*, 155(8), 1349-1356.
- DANE. (2013). Encuesta Nacional Agropecuaria-ENA. En: Departamento Nacional de Estadística, <http://www.dane.gov.co>. Consultado en: mayo 2015.
- Esfandiari, N., Kohi-Habibi, M., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2009). Complete genome sequence of an Iranian isolate of *Potato vi-*

- rus X* from the legume plant *Pisum sativum*. *Virus Genes*, 39(1), 141-145.
- Fageria, M. S., Singh, M., Nanayakkara, U., Pelletier, Y., Nie, X., & Wattie, D. (2013). Monitoring current-season spread of *Potato virus Y* in potato fields using ELISA and real-time RT-PCR. *Plant Disease*, 97(5), 641-644.
- Franco-Lara, L., Soto, C. A., & Guzmán, M. (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(1), 130-139.
- Frost, K., Groves, R. L., & Charkowski, A. O. (2013). Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision of clean seed potatoes. *Plant Disease*, 97(10), 1268-1280.
- Gil J. F., Cotes, J. M., & Marín, M. (2012). Detección y caracterización molecular del Virus X de la Papa (PVX) en regiones productoras de papa de Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 69-76.
- Guerrero, O., & Martínez, G. (1980). Evaluación de pérdidas ocasionadas en la variedad de papa Puracé por los virus *Potato virus X*, *Potato virus Y* y *Potato leafroll virus*. *Fitopatología Colombiana*, 9(1), 3-40.
- Gutiérrez, P. A., Alzate, J. F., & Marín, M. (2015). Complete genome sequence of an isolate of *Potato virus X* (PVX) infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Virus Genes*, 50(3), 518-522.
- Guzmán, M., Román, V., Franco, L., & Rodríguez, P. (2010). Presencia de cuatro virus en algunas accesiones de la Colección Central Colombiana de papa mantenida en campo. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 225-233.
- Halterman, D., Charkowski, A., & Verchot, J. (2012). Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Technology*, 6(1), 1-14.
- Kerlan, C. (2008). Potato viruses. pp. 458-471. En: Mahy, B. W. y M. H. van Regenmortel (eds.). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Oxford, Reino Unido: Academic Press, p 632.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2011). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, p 1327.
- Kogovsek P., Gow, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N., & Ravnikar, M. (2008). Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates. *Journal of Virological Methods*, 149(1), 1-11.
- Kutnjak D., Silvestre, R., Cuellar, W., Pérez, W., Müller, G., Ravnikar, M., & Kreuze, J. (2014). Complete genome sequences of new divergent potato virus X isolates and discrimination between strains in a mixed infection using small RNAs sequencing approach. *Virus Research*, 191(1), 45-50.
- Mandal, B., Kumar, A., Rani, P., & Kumar, R. (2012). Complete genome sequence, phylogenetic relationships and molecular diagnosis of an Indian isolate of *Potato virus X*. *Journal of Phytopathology*, 160(1), 1-5.
- Moriera, A., Jones, R. A. C., y Fribourg, C. E. (1980). Properties of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Annals of Applied Biology*, 95(1), 93-103.
- Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I., & Boonham, N. (2000). Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 90(5), 448-453.
- Nie X., & Singh, R. P. (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(1), 37-49.
- Nie X., & Singh, M. (2013). Response of potato, tobacco and *Physalis floridana* plants to mixed infection with PVX, PVYNTN and PVY° strains. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3): 390-401.
- Njukeng, P. A., Chewachong, G. M., Sakwe, P., Chofong, G., Nkeabeng, L. W., Demo, P., & Njuaem, K. D. (2013). Prevalence of six viruses in potato seed tubers produced in informal seed system in the North West region of Cameroon. *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 9(1), 44-49.
- Salazar, L. F. (2006). Emerging and re-emerging potato diseases in the Andes. *Potato Research*, 49(1), 43-47.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110(9), 893-908.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C. M., & Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88(6), 1643-1655.
- Wang, B., Ma, Y., Zhang, Z., Wu, Z., Wu, Y., Wang, Q., y Li, M. 2011. Potato viruses in China. *Crop Protection*, 30(9), 1117-1123.