

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE AISLAMIENTOS DEL *POTATO VIRUS Y* (PVY) OBTENIDOS EN CULTIVOS DE PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM*) Y TOMATE DE ÁRBOL (*SOLANUM BETACEUM*) EN COLOMBIA

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *POTATO VIRUS Y* (PVY) ISOLATES OBTAINED IN POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM*) AND TAMARILLO (*SOLANUM BETACEUM*) CROPS FROM COLOMBIA

Emanuela Henao-Díaz^{1,3}, Pablo Gutiérrez-Sánchez^{2,4}, Mauricio Marín-Montoya^{1,5}

Resumen

El *Potato virus Y* (PVY) es el virus más limitante de los cultivos de solanáceas en el mundo. Este virus tiene una alta diversidad de variantes gracias a sus altas tasas de mutación y recombinación genética. En este estudio se realizó un análisis filogenético de 24 aislamientos de PVY obtenidos en cultivos de papa y tomate de árbol de tres regiones de Colombia, con base en la secuenciación parcial del gen de la cápside viral (CP). Adicionalmente, en 12 de los aislamientos, se secuenció completamente dicho gen, con el fin de evaluar su similitud a nivel de aminoácidos con respecto a secuencias de referencia mundial. Los resultados indicaron la presencia de tres variantes principales de PVY en el país (denominadas **I-Col**, **II-Int** y **IV-Col**), dos de las cuales (I-Col y IV-Col) no se asociaron con ninguna secuencia de referencia de las razas tradicionales de PVY; mientras que el tercer grupo hizo parte del clado representando el linaje PVY^{N/NTN}. Los tres grupos incluyeron conjuntamente cepas de papa y tomate de árbol, lo que permite inferir que ambas especies son hospedantes alternos de los mismos genotipos del virus. El análisis de aminoácidos de CP, reconfirmó la presencia de las tres variantes, aunque la variante I-Col se presentó asociada con dos aislamientos recombinantes (PVY^{NTN} x PVYNE-11) del Brasil, pero con un bajo soporte de *bootstrap*. Los resultados obtenidos señalan la necesidad de ajustar los sistemas de diagnóstico del PVY y profundizar en la caracterización biológica de las variantes de este virus en Colombia.

Palabras clave: cápside, Colombia, filogenia, *Potyvirus*, Solanaceae

Abstract

Potato virus Y (PVY) is the most limiting virus in solanaceous crops worldwide. This virus is highly variable due to a combination of high mutation and recombination rates. In this study, a phylogenetic analysis was performed on 24 PVY isolates obtained from potato and tamarillo crops from three regions of Colombia, using partial sequences of the viral coat (CP). Additionally, a complete gene sequence was obtained for 12 isolates and their similarities at the amino acid level were compared to PVY reference strains from the rest of the world. Our results revealed the presence of three main PVY variants in Colombia (named as **I-Col**, **II-Int**, and **IV-Col**). Two of them (I-Col and IV-Col) are not related to traditional PVY strains while II-Int is related to the PVY^{N/NTN} clade. All three groups comprise sequences from potato and tamarillo, suggesting that both plants can act as alternative hosts to the same PVY genotypes. Amino acid analysis of CP confirmed the presence of three PVY variants; however variant I-Col showed affinity, although with low bootstrap values, to recombinant strains PVY^{NTN} x PVYNE-11 from Brazil. The results indicate the need to adjust the systems for PVY detection and to undertake further biological studies of this virus in Colombia.

Key words: capsid, Colombia, phylogeny, *Potyvirus*, Solanaceae

Recibido: noviembre 2012; aceptado: agosto 2013.

¹ Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias.,

² Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Laboratorio de Microbiología Industrial, Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias.

Correos electrónicos: ³ <ehenaod@gmail.com>; ⁴ <paguties@unal.edu.co>; ⁵ <mamarinm@unal.edu.co>.

INTRODUCCIÓN

El *Potato virus Y* (PVY) (Potyviridae: *Potyvirus*) es el problema viral más limitante del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en el mundo, causando pérdidas que pueden reducir hasta en un 80% el rendimiento del cultivo, además de afectar la calidad de los tubérculos y su utilización como material de siembra (Valkonen 2007). Los síntomas inducidos por el virus dependen de las variantes del patógeno y de los cultivares de papa, pudiendo corresponder en mosaicos suaves a severos, acompañados con rugosidad de las hojas, necrosis sistémica de las plantas y finalmente su defoliación. En adición, algunos genotipos virales (ej., PVY^{NTN}, PVY^W) pueden inducir necrosis en la superficie de los tubérculos (Schubert et al. 2007). El conjunto natural y experimental de hospedantes de PVY incluye al menos 342 especies de 69 géneros en 27 familias botánicas (Boonham y Barker 1998). Económicamente, además de la papa, este virus también afecta diferentes solanáceas cultivables como tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*), pimentón (*Capsicum* spp.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) (Ayala et al. 2010, Singh et al. 2008). Este último cultivo, es drásticamente afectado por PVY y otros potyvirus en Colombia, a tal punto que se ha estimado en más del 80% la incidencia de estos virus en las plantaciones de este frutal en la región andina del país (Ayala et al. 2010). El PVY es transmitido mecánicamente y por más de 70 especies de áfidos de forma no persistente, siendo los individuos de la especie *Myzus persicae* sus más eficientes propagadores (Sigvald 1984). Estudios recientes realizados en Colombia con base en RT-PCR, hibridización *dot-blot* y pruebas biológicas, determinaron además que PVY es transmitido por semilla sexual en tomate de árbol (Álvarez et al. 2011).

Los viriones de PVY consisten de partículas filamentosas con una longitud cercana a 740

nanómetros (nm) y 11 nm de ancho. Posee un genoma de ARN de cadena sencilla positiva de aproximadamente 9.700 nucleótidos (nt), con un solo *Open Reading Frame* (ORF) que codifica para una poliproteína de 3.061 aminoácidos (aa), la que es subsecuentemente clivada por tres proteasas virales (NIa, HC-Pro y P1) en diez proteínas funcionales (Carrington et al. 1993, Verchot et al. 1992). En adición, este virus presenta una proteína de unión al genoma en el extremo 5' (VPg: *Genome Linked Protein*) y una cola de poli-adenina en el 3' (Glais et al. 2002).

El PVY es altamente variable a nivel biológico y molecular, debido a sus altas tasas de mutación y recombinación (Glais et al. 2002, Singh et al. 2003). Tradicionalmente, los aislamientos del virus han sido dividido en tres razas principales con base en sus reacciones sobre plantas de papa y tabaco: PVY^O corresponde a la raza ordinaria y causa un mosaico general en papa y tabaco; PVY^N causa necrosis de venas en tabaco y mosaicos suaves en papa; y PVY^C produce estriado puntiforme en papa (Blanco-Urgoiti et al. 1998). Esta última, se divide a su vez en dos genotipos principales denominados PVY^{C1} y PVY^{C2} (Blanco-Urgoiti et al. 1998). Posteriormente, se identificó la raza PVY^Z por sus diferencias en patogenicidad con respecto a las razas PVY^O y PVY^C sobre un grupo de plantas diferenciales de papa (Singh et al. 2008) y al menos dos variantes del PVY^N, denominadas PVY^{NTN} y PVY^W (Singh et al. 2008). Este último genotipo es nombrado en América del Norte como PVY^{N:O}, ya que induce necrosis de venas en tabaco, pero tiene una reacción serológica similar a la raza PVY^O (Lorenzen et al. 2006). Se ha demostrado que dicha variante es producto de eventos recombinatorios entre aislamientos de PVY^N y PVY^O (Schubert et al. 2007). La variante PVY^{NTN} es la más importante a nivel mundial desde el punto de vista económico, al causar la enfermedad denominada como anillo necrótico de los tubérculo o *tuber necrotic ringspot disease of potato* (PTNRD, por sus

siglas en inglés) (Glais et al. 2005). Además de estas razas, también se ha detectado un conjunto de genotipos virales de PVY que no pueden ser transmitidas mecánicamente a la papa, pero que sí infectan pimentón, tomate y tabaco, siendo denominadas como PVY^{NP} (*No-Potato*, por sus siglas en inglés) (Blanco-Urgoiti et al. 1996).

Estudios recientes realizados con base en la secuenciación de genomas completos de diferentes cepas de PVY, han detectado la existencia de nuevas variantes del virus que han resultado fundamentalmente de eventos recombinatorios entre cepas de diferentes razas o de variantes dentro de razas. Así por ejemplo, Lorenzen et al. (2008) comunicaron que en América del Norte, la cepa de PVY NE-11 representa un aislamiento intermedio entre el genotipo clásico de PVY^N y el genotipo PVY^{NTN}; mientras que Galvino-Costa et al. (2011) identificaron a los aislamientos PVY-AGA y PVY-MON de Brasil, como recombinantes de PVY no caracterizados previamente en otros países, al presentar quimeras genómicas entre PVY^{NTN} y PVY-NE-11. La presencia de aislamientos recombinantes de PVY afecta el manejo de la enfermedad, al aumentar la probabilidad que las nuevas variantes puedan sobrepasar los genes de resistencia introducidos en variedades de papa, así como dificultar su detección con métodos serológicos o moleculares convencionales (Galvino-Costa et al. 2011).

El PVY es uno de los pocos virus de plantas en los cuales es posible asociar características biológicas como el conjunto de hospedantes y la sintomatología con su filogenia (Moury 2010), siendo el gen de la cápside (**CP**) el más utilizado para estos fines, al presentar altas tasas de variación como resultado del papel de su producto proteico en la interacción con sus hospedantes y vectores (Feki y Bouslama 2010, Shukla et al. 1994). En la actualidad, se utilizan las secuencias del gen CP para la demarcación de especies dentro de la familia Potyviridae, cuando no se cuenta

con la totalidad del genoma secuenciado; siendo aceptado que aislamientos virales que comparten niveles de identidad superiores al 76-77%, hacen parte de la misma especie (Adams et al. 2005).

En Colombia, el PVY se ha identificado como uno de los principales virus que afecta los cultivos de papa y tomate de árbol del país (Ayala et al. 2010, Gil et al. 2011, Jaramillo et al. 2011). Estudios recientes realizados por Gil et al. (2011) tendientes a evaluar la afinidad filogenética de aislamientos de PVY obtenidos en las principales regiones cultivadoras de papa de Colombia, identificaron un clado de aislamientos, aparentemente no asociado con los genotipos característicos de las razas conocidas de PVY. Por otra parte, Álvarez et al. (2011) al realizar un análisis filogenético con aislamientos de PVY obtenidos en cultivos de tomate de árbol del municipio de Córdoba (Nariño), encontraron que estos se separaron en dos clados, uno asociado a la raza PVY^N, mientras que el otro se presentaba como un grupo externo con respecto a las razas de PVY identificadas hasta el momento.

Se desarrolló el presente estudio con el fin de incrementar la información sobre los genotipos de PVY que afectan cultivos de papa y tomate de árbol de Colombia y el diseño de métodos de diagnóstico y manejo de este virus en el país. Para esto se secuenciaron 480 nt del gen CP en 24 cepas de PVY, seleccionándose 12 de ellas para la secuenciación completa de dicho gen, de manera que se compararan a nivel de secuencias de aa de CP, con respecto a cepas del virus de referencia mundial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Se realizó una recolección de muestras foliares de plantas con síntomas de mosaicos presumiblemente asociados a la infección de 24 cepas de PVY de papa

y tomate de árbol en cultivos de Antioquia (**Ant**): La Unión; la sabana cundiboyasense (**Boy**): Turmeque, Nuevo Colón y Tunja; Cundinamarca (**Cun**): Villa Pinzón y Granada; y Nariño (**Nar**): Ipiales y Pasto (tabla 1). Las muestras fueron transportadas al laboratorio para la determinación y evaluación de la presencia de PVY mediante pruebas de DAS-ELISA con anticuerpos específicos de la compañía Agdia

(Indiana, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada prueba incluyó un *control positivo* (suministrado en forma liofilizada) y un *blanco* (*buffer* de extracción). Los pozos con reacción positiva fueron considerados como aquellos en los cuales la lectura de absorbancia a 405 nm en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia), tuvo un valor mínimo al doble de la lectura obtenida en el blanco (Matthews 1993).

Tabla 1. Aislamientos de PVY recolectados en cultivos de papa y tomate de árbol colombianos y secuenciados en esta investigación (* = **Ant** = Antioquia, **Boy** = Boyacá, **Cun** = Cundinamarca, **Nar** = Nariño; ** = para todas las cepas se secuenciaron 480 pb del gen CP, mientras que en los aislamientos señalados con 801 nt se secuenció completamente el gen CP)

Muestra	Procedencia*	Hospedante	Secuencias**
SP3	La Unión (Ant)	Papa	480 pb, 801pb
SP4	La Unión (Ant)	Papa	480 pb, 801pb
SP5	La Unión (Ant)	Papa	480 pb, 801pb
SP9	La Unión (Ant)	Papa	480 pb, 801pb
TS2	La Unión (Ant)	Tomate de árbol	480 pb, 801pb
BOY11	Nuevo Colón (Boy)	Tomate de árbol	480 pb
BOY12	Nuevo Colón (Boy)	Tomate de árbol	480 pb
BOY9	Nuevo Colón (Boy)	Tomate de árbol	480 pb
CUN1	Villa Pinzón (Cun)	Tomate de árbol	480 pb
CUN3	Granada (Cun)	Tomate de árbol	480 pb
CUN2	Villa Pinzón (Cun)	Tomate de árbol	480 pb
TUN AV	Tunja (Boy)	Papa	480 pb
TUN7	Tunja (Boy)	Papa	480 pb, 801pb
TV AV	Turmequé (Boy)	Papa	480 pb
NAR1	Ipiales (Nar)	Tomate de árbol	480 pb, 801pb
NAR2.1	Ipiales (Nar)	Tomate de árbol	480 pb, 801pb
S1	Pasto (Nar)	Tomate de árbol	480 pb, 801pb
S2	Pasto (Nar)	Tomate de árbol	480 pb, 801pb
S3	Pasto (Nar)	Tomate de árbol	480 pb, 801pb
IP1AV	Ipiales (Nar)	Papa	480 pb, 801pb
IP EF	Ipiales (Nar)	Papa	480 pb
P6 11-15	Pasto (Nar)	Papa	480 pb
P7 MR	Pasto (Nar)	Papa	480 pb

RT-PCR del gen CP. Se extrajo el ARN total del tejido foliar seleccionado en las pruebas de ELISA, empleando el *kit RNeasy Plant Mini* (Qiagen, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el ARN en 40 μ l de agua destilada estéril con DEPC. Posteriormente, se realizaron las reacciones de RT-PCR en dos etapas. Para la síntesis de ADNc se empleó como cebador un Oligo-dT (Fermentas, Lituania), en un volumen total de reacción de 20 μ l, conteniendo 0,5 μ l de agua destilada estéril, 1,5 μ l de PBST (0,5%), 4 μ l de Buffer RT (5X), 4 μ l de $MgCl_2$ (25 mM), 2 μ l de dNTPs (10 mM), 1 μ l del cebador (10 μ M), 0,5 μ l de inhibidor de RNasa (40U/ μ l), 0,5 μ l de enzima M-MuLV Transcriptasa Reversa (20 U/ μ l) (Fermentas) y 5 μ l de ARN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador T 3000 (Biometra, Alemania) con la siguiente programación: 37 °C por 60 min, 75 °C por 15 min y almacenamiento a 4 °C. La PCR consistió de 25 μ l conteniendo 2,5 μ l de *buffer* $(NH_4)_2SO_4$ (10X), 1,8 μ l de $MgCl_2$ (25 mM), 0,5 μ l de dNTPs (10 mM), 0,5 μ l (10 μ M) de los cebadores dirigidos a amplificar el gen completo (801 nt) de CP (PVYCPF: 5'-ACC ATC AAG SAAATG ACACA-3') y PVYCPR: 5'-CGG AGA GAC ACT ACA TCA CA-3') (Glais et al. 2002) y una región parcial de 480 nt de CP (PVYF: 5'-ACG TCCAAAATG AGA ATG CC-3' y PVYR: 5'-TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT-3') (Nie y Singh 2001), 0,2 μ l de *Taq* ADN polimerasa (5 U/ μ l) (Fermentas), 1 μ l de ADNc en diluciones de 1:5 y 1:10, y 18 μ l de agua destilada estéril.

Para las muestras de tomate de árbol se presentaron problemas de inhibidores de la reacción de PCR, por lo que se adicionaron 0,2 μ l de BSA (10 mg/ml) (Promega, EE. UU.). El programa de amplificación consistió en 95 °C por 60 s, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 53 °C por 45 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 min. Posterior a la amplificación, se separaron los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% suplementado con bromuro

de etidio (10 mg/ml), visualizándose en un transiluminador de UV (Biometra) y verificándose su tamaño por comparación con el marcador de peso molecular *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas).

Secuenciación y análisis filogenético. Los amplicones del tamaño esperado fueron purificados directamente del producto de PCR con el *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen), o alternativamente cuando se presentaron inespecificidades, se separaron las bandas, a partir del gel mediante el *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). La secuenciación se realizó en ambos sentidos utilizando los mismos cebadores del RT-PCR, en un secuenciador ABI Prism 3730xl (PE Applied Biosystems) en la compañía Macrogen (Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas con cada cebador se editaron mediante el *software* BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999), se construyeron consensos empleando la opción *Cap contig assembly* y se confirmaron sus identidades con genes virales con la herramienta *BLAST* (Altschul et al. 1990). Esta información sirvió como base para realizar el análisis de las relaciones filogenéticas de las cepas de PVY obtenidas en este estudio con aquellas de Colombia previamente obtenidas por Álvarez et al. (2011) y Gil et al. (2011), y de otros países del mundo, cuyas secuencias se encuentran depositadas en el *GenBank*. Para esto se alinearon las secuencias mediante el programa Clustal incluido en Bioedit (Hall 1999) y la matriz generada fue utilizada para realizar dos análisis filogenéticos independientes: uno basado en el método de *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou y Nei 1987), y el otro utilizando el criterio de *Máxima verosimilitud* (ML: *Maximum Likelihood*) con un número máximo de 1.000 árboles, adición de secuencias al azar, 1.000 réplicas y algoritmo de estrategia de búsqueda múltiple (TBR, por sus siglas en inglés) (Tamura et al. 2011). El soporte de las ramas para ambos métodos, se evaluó mediante 1.000 repeticiones de *bootstrap*

(Felsenstein 1985) y para el cálculo de las distancias evolutivas se utilizó el método de Kimura 2-parámetros (Kimura 1980). Estos análisis se realizaron con el programa Mega 5.0 (Tamura et al. 2011). Las secuencias del gen CP obtenidas en esta investigación, tienen los números de acceso del GenBank KC677682 a KC677693.

RESULTADOS

Análisis filogenético de secuencias parciales de CP. Los árboles filogenéticos obtenidos mediante NJ y ML para las secuencias de 480 nt del gen CP, tuvieron topologías similares —por lo que sólo se presentan los de NJ—, con cuatro clados principales, denominados como: **I-Col**, **II-Int**, **III-Int** y **IV-Col**, por presentar cepas de PVY de diferentes países (**Int** = Internacional) o sólo de Colombia (**Col** = Colombia) (figura 1). Estos clados estuvieron soportados por valores de *bootstrap* superiores a 70%. Adicionalmente, se presentaron dos ramas con secuencias únicas que representan dos linajes independientes (**Ind**) de PVY de Brasil (JF928458 PVY-MON y JF928459 PVY-AGA) y Chile (FJ214726, PVY-Chile3), siendo la ubicación de dichas ramas en el dendrograma, la única diferencia que se presentó entre ambos análisis. Los aislamientos colombianos de PVY se presentaron distribuidos en tres de los clados (I-Col, II-Int y IV-Col). La distancia genética global determinada por el promedio de sustituciones por cada sitio bajo análisis fue de 0,102 (S. E = 0,01). Los niveles de identidad con respecto al potyvirus *Bean yellow mosaic virus* (**BYMV**) utilizado como grupo externo de análisis, fueron inferiores a 67% en todos los casos.

El clado I-Col, agrupó 13 de las cepas de PVY obtenidas en este estudio y procedentes tanto de cultivos de papa como de tomate de árbol de diferentes departamentos del país, además de dos aislamientos (JF939837 y HQ335239) previamente secuenciados por Álvarez et al.

(2011) y Gil et al. (2011) de ambos cultivos. El nivel de identidad al interior de este grupo fue superior a 98% (distancia promedio de 0,0028, S. E. = 0,0011); y con respecto a los demás grupos, fue superior al 90%, siendo los aislamientos más distantes los del tipo PVY^{NP} y aquellos del clado IV-Col.

El clado II-Int, incluyó las cepas de referencia de las razas PVY^N y de la variante PVY^{NTN}, con cuatro de los aislamientos de papa y uno de tomate de árbol de cultivos de papa del municipio de la Unión (Antioquia), así como con el aislamiento HQ335230 obtenido por Gil et al. (2011) en cultivos de papa del municipio de Sonsón (Antioquia). Los niveles de identidad al interior de este grupo fueron superiores al 97% y su distancia genética promedio de 0,013 (S. E. = 0,003). Los menores valores de identidad de los miembros de este clado con respecto a los demás aislamientos incluidos en el análisis, correspondieron a aquellos representando las razas PVY^O, PVY^{C1,2} y PVY^{NP}, con un promedio de 90-92%.

El clado III-Int, se subdividió en tres subgrupos (IIIA-Int, IIIB-Int y IIIC-Int) soportados por valores de *bootstrap* superiores al 92%. El clado IIIA-Int presentó dos aislamientos de PVY^{C2}, mientras que el IIIB-Int agrupó las cepas de referencia de PVY^O con las recombinantes del tipo Wilga, además del único aislamiento encontrado en el GenBank en tomate de árbol de un país diferente a Colombia (FM244834, Taiwán). El subclado IIIC-Int agrupó indistintamente cepas de PVY^{NP} obtenidas en pimentón y tomate de mesa con la raza PVY^{C1}. El nivel de identidad al interior de este clado fue superior al 92% y el promedio de sustituciones por sitio fue de 0,054 (S. E. = 0,007) y 0,033 (S. E. = 0,006) para IIIB-Int y IIIC-Int, respectivamente. Ninguno de los aislamientos colombianos de PVY se ubicaron en este clado.

Finalmente, el clado IV-Col, sólo incluyó aislamientos de PVY de Colombia secuenciados en este estudio y en aquel de Álvarez et al (2011)

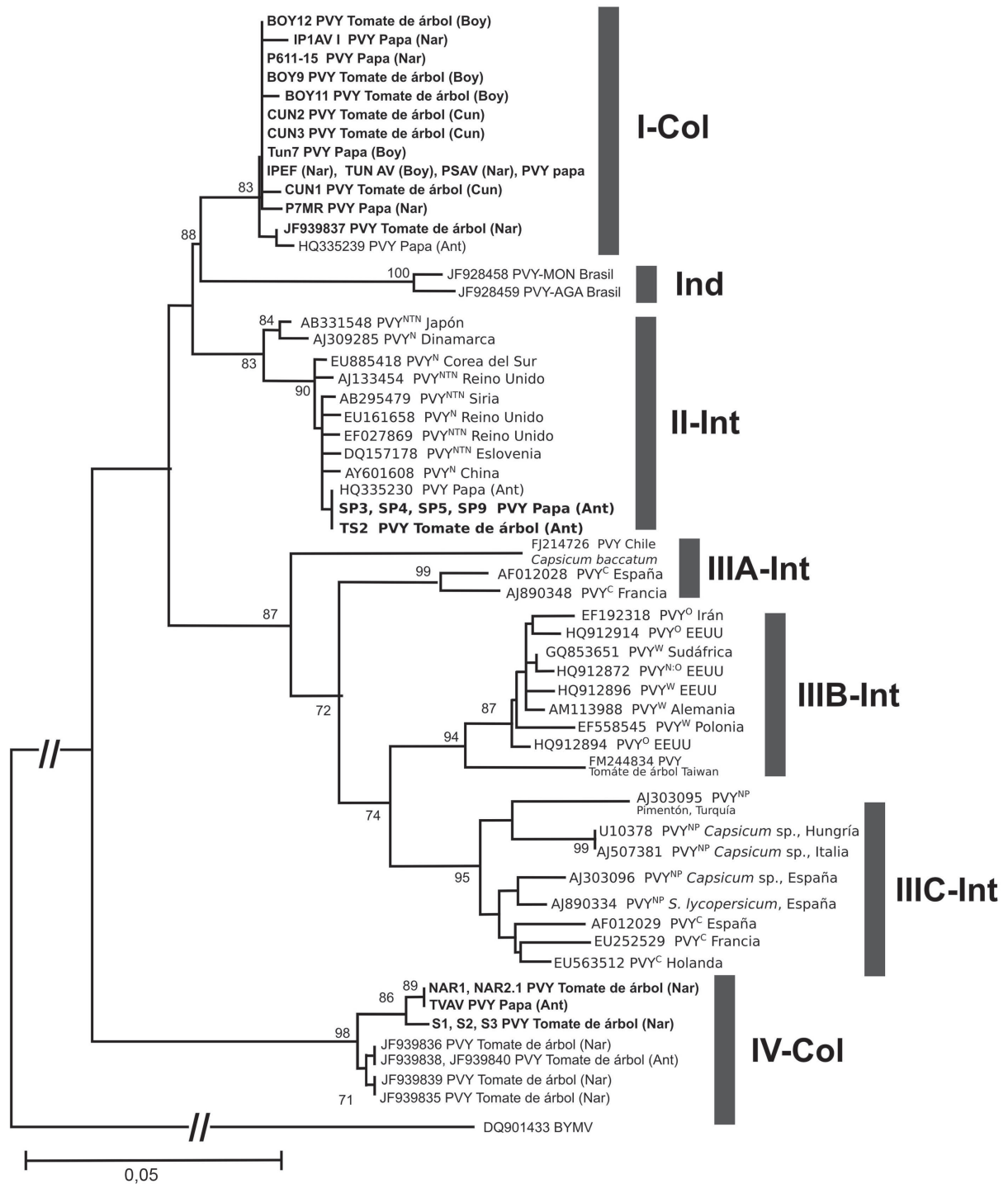


Figura 1. Árbol filogenético *Neighbor-Joining* (NJ) basado en secuencias parciales (480 nt) del gen de la cápside viral de aislamientos de PVY obtenidos en cultivos de papa, tomate de árbol y otras solanáceas en Colombia y otros países del mundo. Los valores de *bootstrap* (> 70%) se indican en la parte inferior de las ramas. Cuando no se indica el hospedante, se refiere a papa. En el margen derecho se presentan las denominaciones de los clados y subclados (los aislamientos colombianos de PVY se presentan en **negrita** y se identifican por el departamento de recolección: **Ant** = Antioquia, **Boy** = Boyacá, **Cun** = Cundinamarca, **Nar** = Nariño).

(F939836, JF939838, JF939840, JF939839, JF939835), y con excepción de un aislamiento de papa, todos fueron obtenidos en plantas de tomate de árbol de Antioquia y Nariño. Los niveles de identidad al interior de este clado oscilaron entre 97 y 99%, con un promedio de sustituciones por sitio de 0,01 (S. E. = 0,003). Los miembros de este clado presentaron altos niveles de divergencia con respecto a los demás clados del dendrograma, con un rango de identidad del 87 al 92% y distancias promedias de 0,091 (clado II-Int) a 0,150 (clado IIIC-Int).

Análisis filogenético de secuencias completas de CP. Los dendrogramas generados mediante

NJ y ML a partir del análisis completo de nt y aa del gen CP de PVY, presentaron estructura similar al obtenido para las secuencias parciales de nt de CP, aunque se evidenciaron algunas diferencias en la posición de los grupos dentro del árbol (figuras 2 y 3). En este caso, las únicas diferencias que presentaron las topologías de ambos dendrogramas (NJ y ML) correspondieron a las ubicaciones del subclado IIIA-Int y la rama independiente con los dos aislamientos recombinantes de PVY de Brasil. Con el fin de unificar la nomenclatura de los clados entre dendrogramas, se mantuvo aquella utilizada en la figura 1. El promedio global de sustituciones de aa por sitio fue de 0,052 (S. E. = 0,009).

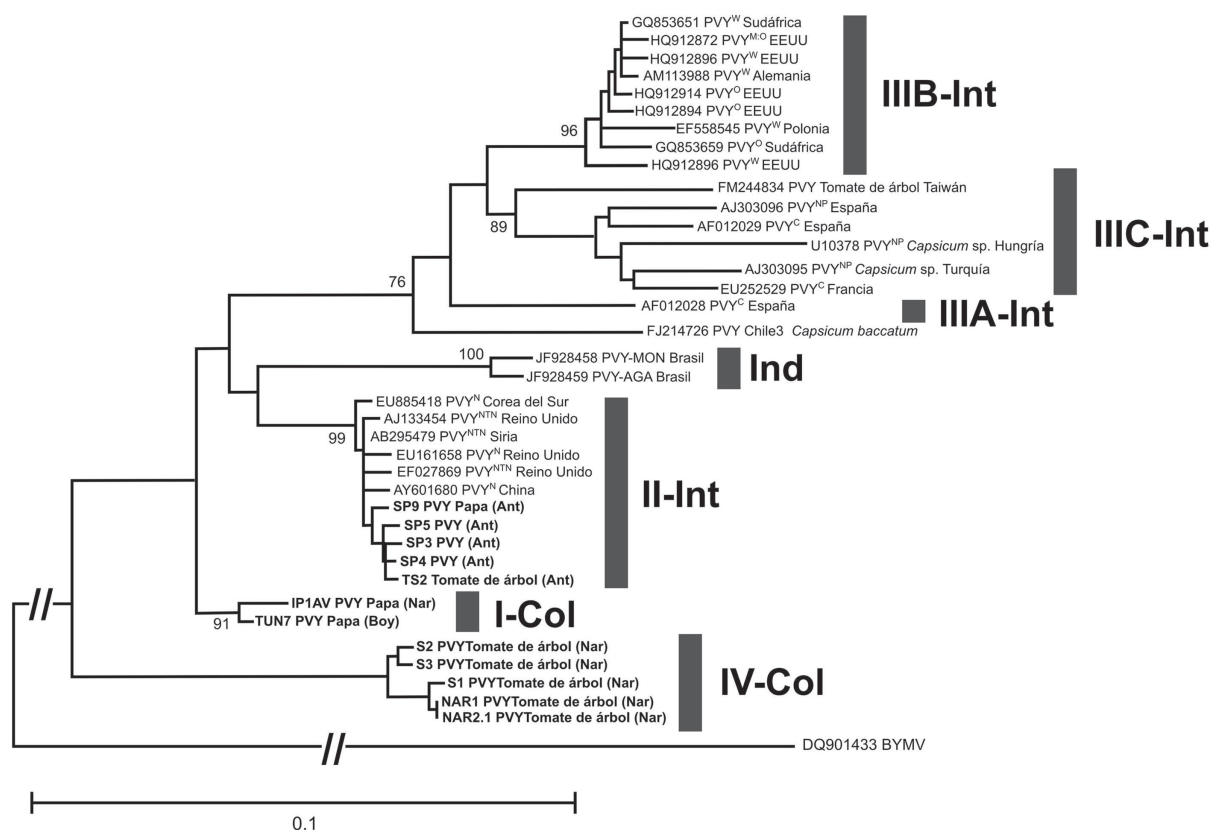


Figura 2. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) basado en secuencias completas (801 nt) del gen de la cápside viral de aislamientos de PVY obtenidos en cultivos de papa, tomate de árbol y otras solanáceas, en Colombia y otros países del mundo. Los valores de *bootstrap* (> 70%) se indican en la parte inferior de las ramas. En el margen derecho se presentan las denominaciones de los clados y subclados referidos a la figura 1 (los aislamientos colombianos de PVY se presentan en **negrita** y se identifican por el departamento de recolección: **Ant** = Antioquia, **Boy** = Boyacá, **Cun** = Cundinamarca, **Nar** = Nariño).

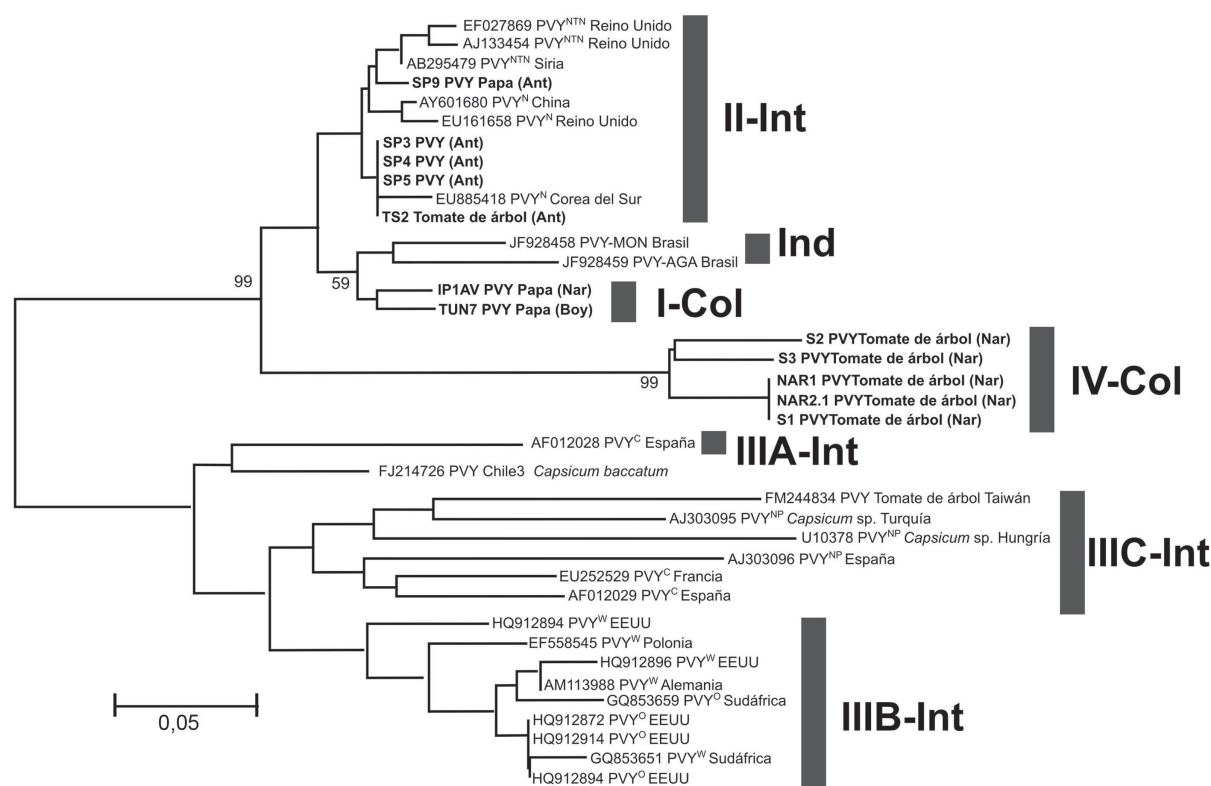


Figura 3. Árbol filogenético *Neighbor-Joining* (NJ) basado en secuencias completas (267 aa) de la proteína de la cápside viral de aislamientos de PVY obtenidos en cultivos de papa, tomate de árbol y otras solanáceas, en Colombia y otros países del mundo. Los valores de *bootstrap* (> 70%) se indican en la parte inferior de las ramas. En el margen derecho se presentan las denominaciones de los clados y subclados referidos a la figura 1 (los aislamientos colombianos de PVY se presentan en **negrita** y se identifican por el departamento de recolección: **Ant** = Antioquia, **Boy** = Boyacá, **Cun** = Cundinamarca, **Nar** = Nariño).

Este análisis filogenético nuevamente separó a los aislamientos colombianos de PVY en tres clados, pero para el caso de las secuencias de aa (figura 3), los aislamientos del clado I-Col se presentaron asociados con los recombinantes de PVY^N x PVY-NE11 de Brasil (Galvino-Costa et al. 2012), aunque con soporte de *bootstrap* inferior a 70%. Similarmente, los miembros del clado II-Int del análisis parcial de CP, se presentaron asociados con la raza PVY^N y la variante PVY^{NTN}, mientras que aquellos del clado IV-Col, se presentaron como un grupo independiente distantemente relacionado con los demás clados, al presentar niveles de identidad para aa, en el ámbito de 90 (PVY^{NP}) al 95% (PVY^{N/NTN}) y distancia genéticas de 0,054 (PVY^{N/NTN}) a 0,08 (PVY^{O,C,W} y PVY^{NP}). En

la tabla 2, se presenta la matriz de identidad para secuencias completas de nt y aa de CP, de aislamientos de PVY representativos de cada uno de los *clados* identificados en el análisis filogenético.

DISCUSIÓN

En este estudio con base en análisis filogenéticos del gen CP de PVY, se identificaron tres variantes (I-Col, IV-Col y II-Int) de este virus afectando plantas de papa y tomate de árbol en Colombia. La variante asociada al clado II-Int, aunque minoritaria en número de aislamientos, se asoció con los miembros representativos de la raza PVY^N y específicamente con la variante PVY^{NTN}, causante de la enfermedad PTNRD,

Tabla 2. Matriz de identidad de aminoácidos (*abajo de la diagonal*) y nucleótidos (*arriba de la diagonal*) de la cápside viral de aislamientos de PVY representativos de los clados obtenidos en los análisis filogenéticos

	EU161658	AJ133454	EU252529	U10378	HQ912914	EF558545	IP1AV	Nar 2.1	S2	SP5	SP9	Tun7-6-10
	PVYN	PVYNTN	PVYC1	PVYNP	PVYO	PVYW	(Nar)	(Nar)	(Nar)	(Ant)	(Ant)	(Boy)
	II-Int	II-Int	IIIA-Int	IIIC-Int	IIIB-Int	IIIB-Int	I-Col	IV-Col	IV-Col	II-Int	II-Int	I-Col
EU161658												
PVYN	ID	1,00	0,90	0,89	0,92	0,91	0,95	0,91	0,91	0,99	0,99	0,95
II-Int												
AJ133454												
PVYNTN	0,99	ID	0,90	0,89	0,92	0,91	0,95	0,91	0,91	0,99	0,99	0,96
II-Int												
EU252529												
PVYC1	0,94	0,93	ID	0,95	0,92	0,92	0,89	0,87	0,87	0,90	0,90	0,90
IIIA-Int												
U10378												
PVYNP	0,93	0,92	0,96	ID	0,91	0,91	0,89	0,86	0,87	0,89	0,89	0,89
IIIC-Int												
HQ912914												
PVYO	0,94	0,94	0,97	0,94	ID	0,98	0,90	0,86	0,87	0,92	0,91	0,91
IIIB-Int												
EF558545												
PVYW	0,94	0,93	0,97	0,94	0,99	ID	0,91	0,87	0,87	0,91	0,91	0,91
IIIB-Int												
IP1AV (Nar)												
I-Col	0,98	0,98	0,94	0,93	0,94	0,94	ID	0,92	0,91	0,95	0,95	0,99
Nar 2.1												
(Nar)	0,95	0,95	0,91	0,90	0,92	0,92	0,96	ID	0,99	0,91	0,91	0,91
IV-Col												
S2 (Nar)	0,95	0,95	0,91	0,90	0,91	0,92	0,96	0,99	ID	0,91	0,91	0,92
IV-Col												
SP5 (Ant)	0,99	0,99	0,94	0,93	0,94	0,94	0,99	0,96	0,96	ID	1,00	0,96
II-Int												
SP9 (Ant)	0,99	0,99	0,94	0,93	0,94	0,94	0,99	0,96	0,96	1,00	ID	0,96
II-Int												
Tun7-6-10 (Boy) I-Col	0,98	0,98	0,94	0,93	0,94	0,94	0,99	0,95	0,96	0,99	0,99	ID

que afecta drásticamente la calidad de los tubérculos en cultivos de papa de todo el mundo (Nie y Singh 2003). Las otras dos variantes (I-Col y IV-Col) no se presentaron asociadas con ningún aislamiento de referencia incluido en el análisis, siendo el grupo I-Col el más numeroso, con 13 de los aislamientos de papa y tomate de árbol obtenidos en este trabajo, además de dos cepas previamente registradas en el país por Álvarez et al. (2011) y Gil et al. (2011). Dichos aislamientos compartieron niveles de identidad superiores a 98%, lo que supone corresponden al mismo genotipo, y por tanto, presumiblemente son patogénicos sobre ambos hospedantes, aunque esto requiere ser probado experimentalmente en ensayos dirigidos de inoculación mecánica y transmisión por áfidos vectores.

Por otra parte, el grupo IV-Col se presentó como el más distante con respecto a los demás incluidos en los dendrogramas, con divergencias promedio entre el 8 y 14% en nt. De interés resultó que de las once cepas de este grupo, incluyendo cinco del trabajo de Álvarez et al. (2011), 10 fueron obtenidas en tomate de árbol en cultivos de Antioquia y Nariño, y tan sólo una procedía de un cultivo de papa de Antioquia, lo que podría indicar especialización sobre este frutal andino. Estos resultados fueron confirmados en gran parte mediante el análisis filogenético realizado con base en la totalidad de nt y aa de CP en 12 de los aislamientos colombianos de PVY y otros de referencia mundial; aunque los dendrogramas presentaron topologías con algunas diferencias, especialmente con relación a la asociación entre los representantes del clado I-Col con dos secuencias de referencia de variantes recombinantes de PVY^{NTN} x PVY-NE-11, recientemente informadas en Brasil por Galvino-Costa et al. (2012). En adición, los niveles de identidad genética fueron ligeramente superiores para las secuencias de aa (90 a 99%), al presentarse valores en el análisis de nt de 86 a 99%, lo cual era de esperarse dada la redundancia del código genético.

Al comparar los resultados aquí obtenidos con análisis filogenéticos basados en secuencias de CP de PVY, como los realizados por El-Absawy et al. (2012), Felki y Bouslama (2008) y Moury (2010), resultan muy similares las afinidades filogenéticas y niveles de divergencia encontrados entre los clados representando las cepas de PVY registradas internacionalmente, así como evidente la ocurrencia de linajes (I-Col y IV-Col) de este virus no identificados previamente en otros lugares del mundo. Así por ejemplo, Felki y Bouslama (2008) al evaluar la filogenia molecular de 107 cepas de PVY cuyas secuencias de CP han sido depositadas en GenBank, encontraron que los niveles de divergencia entre aislamientos no necrosantes (PVY^{O, N:O, C y NP}) con respecto a las variantes necrosantes (PVY^{N,NTN}) fueron de 11%, siendo la máxima divergencia encontrada (14,2%), la presente entre aislamientos de PVY^{C1} y PVY^{NP} con respecto al clado conteniendo a PVY^N y PVY^{NTN}. En nuestro estudio, la divergencia promedio entre cepas necrosantes y no necrosantes fue de 9% con respecto al clado IIIB-Int y 11% con el clado IIIC-Int, mientras que los dos nuevos grupos detectados, presentaron divergencias que variaron desde 5% entre el clado I-Col y el clado II-Int (PVY^{N,NTN}) hasta el 14% entre el clado IV-Col y el IIIA-Int (PVY^{C2}), siendo la divergencia entre los dos grupos de cepas colombianas del 9%.

Felki y Bouslama (2008), encontraron al interior de los grupos de PVY, que la raza PVY^N y la variante PVY^{NTN} fueron las que presentaron niveles menores de divergencia (de 1,8 a 3,7%), mientras que en el clado que agrupó las razas no necrosantes, estos valores alcanzaron divergencias de hasta 9% (clado PVY^{C1} y PVY^{NP}). En nuestro estudio, las divergencias intra-clados fueron tan bajas como 2% para el clado I-Col y 3% para los clados II-Int (PVY^{N,NTN}) y IV-Col.

El hallazgo de nuevos linajes de PVY se ha intensificado en los últimos años con la

disponibilidad de técnicas moleculares (Singh et al. 2008). Así por ejemplo, Moery (2010) encontró una nueva variante de PVY en Chile a partir de plantas de *Capsicum baccatum* L. cv. *crystal*, que presenta propiedades biológicas y genómicas únicas. En los análisis filogenéticos realizados por este autor, dicho linaje se presentó en un clado independiente, con niveles de identidad de 92,7 a 94,3% con respecto a cepas de referencia de las diferentes razas de PVY. Similarmente, Glavino-Costa et al. (2012) identificaron dos aislamientos de PVY con un nuevo tipo de patrón genómico, en cultivos de papa de Brasil (PVY-AGA y PVY-MON) y que luego del análisis completo de su genoma, resultaron ser recombinantes entre PVY^{NTN} x PVY-NE-11. En el presente trabajo, nuevamente ambos linajes se presentaron como grupos independientes de PVY, que incluso se ubicaron en posiciones diferentes dentro de los dendrogramas realizados mediante algoritmos NJ y ML, lo que confirma su carácter recombinante y plantean la necesidad de ser caracterizados bajo los parámetros empleados para la evaluación intraespecífica de esta especie viral. En este sentido, de gran interés resultará la secuenciación completa de aislamientos representativos de los clados identificados en nuestro estudio conteniendo cepas de Colombia de PVY, de manera que se evalúe su estructura genómica y más importante, la realización de pruebas de patogenicidad sobre plantas de tabaco y papa, para obtener su identificación a nivel de razas, según los criterios planteados por Singh et al. (2008). Igualmente, resultará muy útil evaluar la presencia de sitios de recombinación (**RJ**: *recombinant junctions*) en sus genomas, tales como los encontrados en las variantes PVY^{NTN}, que se presentan entre los genes HC/Pro-P3, 6K2-N1a, y el extremo C-terminal de CP (Nie y Singh 2003).

En el corto plazo, la información generada en este estudio permitirá plantear el desarrollo de métodos de diagnóstico de las diferentes

variantes de PVY presentes en Colombia afectando papa y tomate de árbol, de manera que se apoyen los programas de certificación de semilla, mejoramiento genético y vigilancia cuarentenaria. Para el caso de la detección de la raza PVY^N y de la variante PVY^{NTN} se han desarrollado diferentes métodos serológicos y moleculares que permiten su detección específica e incluyen el uso de anticuerpos monoclonales en pruebas de ELISA, análisis de *Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)*, RT-PCR en tiempo real y RT-PCR múltiple (Balme-Sinibaldi et al. 2006, Cerovska 1998, Jacquot et al. 2005, Schubert et al. 2007). Para el caso de las cepas colombianas de PVY representando los dos nuevos linajes detectados en este estudio, resulta fundamental el diseño de pruebas de diagnóstico altamente sensibles, rápidas y económicamente viables, para su aplicación por parte de los gremios de agricultores, agroindustrias y organismos de sanidad vegetal estatal. En este sentido, paralelamente al presente estudio, Gallo et al. (2012) desarrollaron anticuerpos específicos para su uso en pruebas de ELISA y flujo lateral, que permiten detectar en forma específica la variante de PVY representada por el clado IV-Col, a partir de la identificación de regiones antigénicas ubicadas en la región N-terminal de la proteína CP. Dichos anticuerpos fueron inicialmente evaluados en una prueba piloto con 20 muestras de papa y 20 de tomate de árbol, obtenidas en el municipio de la Unión (Antioquia), siendo posible la detección de esta variante de PVY en seis de las muestras de papa y en la totalidad de las muestras de tomate de árbol. De interés para el sector agrícola nacional, resultará la utilización rutinaria de estos anticuerpos en laboratorios de diagnóstico públicos y privados, así como el desarrollo de pruebas específicas dirigidas a la detección de las cepas de PVY representadas por el clado I-Col.

Los hallazgos del presente estudio llaman la atención sobre la necesidad de reforzar en el

sector agrícola colombiano los esquemas de vigilancia cuarentenaria de fitopatógenos y especialmente de aquellos de naturaleza viral. En el caso particular de PVY, la ocurrencia de linajes no detectados en otros lugares del mundo, amerita su inclusión en los procesos de certificación de semilla, así como la evaluación de sus efectos sobre la producción de los cultivos de papa y tomate de árbol, para lo que se requiere darle continuidad a la investigación sobre este patosistema (PVY/Solanaceae), así como la aplicación de los conocimientos hasta ahora generados, con miras al mejoramiento de las condiciones fitosanitarias de dichos cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al apoyo económico de la Dirección de investigaciones de Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín a través del proyecto: DIME BICENTENARIO 2008-2009: código 20101007745. Se agradece a Luz Estela Lagos, de la Universidad de Nariño por su apoyo con la recolección de muestras en el Departamento de Nariño y a Yuliana Gallo García por su apoyo con las reacciones de RT-PCR.

REFERENCIAS

- Adams MJ, Antoniw JF, Fauquet CM. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, 150 (3): 459-479.
- Álvarez J, Cotes JM., Marín M. 2011. Detección molecular de virus en material de siembra de tomate de árbol en Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 26 (2): 80-91.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3): 403-410.
- Ayala M, González P, Gutiérrez P, Cotes JM, Marín, M. 2010. Caracterización serológica y molecular de potyvirus asociados a la virosis del tomate de árbol en Antioquia (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15 (3): 143-162.
- Balme-Sinibaldi V, Tribodet M, Croizat F, Lefeuvre P, Kerlan C, Jacquot E. 2006. Improvement of *Potato virus Y* (PVY) detection and quantitation using PVY^N and PVY^O specific real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods*, 134 (1): 261-266.
- Blanco-Urgoiti B, Sanchez F, Dopazo J, Ponz F. 1996. A strain-type clustering of *Potato virus Y* based on the genetic distance between isolates calculated by RFLP analysis of the amplified CP gene. *Archives of Virology*, 141 (12): 2425-2442.
- Blanco-Urgoiti B, Sánchez F, Pérez de San Roman C, Dopazo J, Ponz F. 1998. *Potato virus Y* group C isolates are a homogenous pathotype but two different genetic strains. *Journal of General Virology*, 79 (8): 2037-2042.
- Boonham N, Barker I. 1998. Strain specific recombinant antibodies to *Potato virus Y* potyvirus. *Journal of Virological Methods*, 74 (4): 193-199.
- Carrington JC, Haldeman R, Dolja VV, Restrepo-Hartwig MA. 1993. Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *Journal of Virology*, 67 (12): 6995-7000.
- Cerovska, N. 1998. Production of monoclonal antibodies to potato virus Y NTN strain and their use for strain differentiation. *Plant Pathology* 47 (4): 505-509.
- El-Absawy EA, Mahmoud A, Hemeida AA, Helmy M. 2012. Molecular Variation of *Potato virus Y* Isolated from Egypt. *International Journal of Virology*, 8 (1): 81-89.
- Feki S, Bouslama L. 2008. Molecular phylogeny and genetic variability of the *Potato virus Y* (PVY) strains on the CP-encoding region. *Annals of Microbiology*, 58 (3): 433-437.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 (4): 783-791.
- Galvino-Costa SBF, dos Reis Figueira A, Camargos VV, Geraldino PS, Hu XJ, Nikolaeva OV, Kerlan C, Karasev AV. 2012. A novel type of *Potato virus Y* recombinant genome, determined for the genetic strain PVY^E. *Plant Pathology*, 61 (2): 388-398.
- Gallo YM, Gutiérrez P, Marín M. 2012. Generación de anticuerpos policlonales para la detección de la variante genotípica GIII de PVY, en cultivos de tomate de árbol y papa de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1): 245-255.
- Gil JF, Cotes JM, Marín M. 2011. Incidencia de potyvirus y caracterización molecular de PVY en regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13 (1): 85-93.
- Glais L, Tribodet M, Kerlan C. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. *Archives of Virology*, 147 (2): 363-378.
- Glais L, Tribodet M, Kerlan C. 2005. Specific detection of the PVY^{NW} variant of *Potato virus Y*. *Journal of Virological Methods*, 125 (2): 131-136.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Jacquot E, Tribodet M, Croizat F, Balme-Sinibaldi V, Kerlan C. 2005. A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of PVY^O and

- PVY^N isolates of *Potato virus Y* (PVY). *Journal of Virological Methods*, 125: 83-93.
- Jaramillo MM, Gutiérrez P, Lagos LE, Cotes JM, Marín M. 2011. Detection of a complex of viruses in tamarillo (*Solanum betaceum*) orchards in the Andean region of Colombia. *Tropical Plant Pathology*, 36 (3): 150-159.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16 (2): 111-120.
- Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P. 2006. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease*, 90 (7): 935-940.
- Lorenzen J, Nolte P, Martin D, Pasche J, Gudmestad N. 2008. NE-11 represents a new strain variant class of *Potato virus Y*. *Archives of Virology*, 153 (3): 517-525.
- Matthews REF. 1993. *Diagnosis of plant virus diseases*. Boca Ratón (EE. UU.): CRC Press. p. 374.
- Moury B. 2010. A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. *Molecular Plant Pathology*, 11 (1): 161-168.
- 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 (1): 37-49.
- Nie X, Singh RP. 2003. Evolution on North American PVY^{NTN} strains Tu 660 from local PVY^N by mutation rather than recombination. *Virus Genes*, 26 (1): 39-47.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.
- Schubert J, Fomitcheva V, Sztangret-Wisniewska J. 2007. Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR primers. *Journal of Virological Methods*, 140 (1): 66-74.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA. 1994. *The Potyviridae*. Wallingford (UK): CAB International. p. 516.
- Sigvald R. 1984. The relative efficiency of some aphid species as vectors of *Potato virus Y*. *Potato Research*, 27 (3): 285-290.
- Singh RP, McLaren DL, Nie X, Singh M. 2003. Possible escape of a recombinant isolate of *Potato virus Y* by serological indexing and methods of its detection. *Plant Disease*, 87 (6): 79-685.
- Singh RP, Valkonen JPT, Gray SM, Boonham N, Jones RAC, Kerlan C, Schubert J. 2008. Brief review: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of Virology*, 153 (1): 1-13.
- 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 (10): 2731-2739.
- Valkonen JPT. 2007. Potato viruses: Economical losses and biotechnological potential. En: Viola R, Gebhardt C, Govers F, Vreugdenhil D, MacKerron D, editores. *Potato biology and biotechnology*. San Diego (EE. UU.): Elsevier, p. 619-641.
- Verchot J, Herndon KL, Carrington JC. 1992. Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology*, 190 (1): 298-306.