

Caracterización de variantes necróticas del virus *PVY* detectadas en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Victoriano R. Ramírez Rodríguez¹, Gustavo Frías Treviño² y Juan P. Martínez Soriano³

¹Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ³ Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., Irapuato, Gto., México.

RESUMEN

Para analizar variantes del virus Y de la papa detectadas en plantas de papa en México, se sometieron cinco aislados a caracterización biológica y molecular. De acuerdo a sus propiedades serológicas, dos de ellos mostraron pertenecer a la variante "O" y los tres restantes a la variante necrótica "N". Los cinco aislados indujeron necrosis de nervaduras en *Nicotiana tabacum*. Se secuenciaron las regiones genómicas 5'UTR y P1 y se les comparó con otras secuencias reportadas en las bases de datos de los Bancos de Genes. La similitud de las secuencias nucleotídicas se ubicó entre el 47 al 100% en la región 5'UTR y entre el 63 al 100% en la región codificante P1. La más baja similitud de aminoácidos entre secuencias del gen P1 fue de 55%. En el análisis de árboles filogenéticos de la región 5'UTR, los dos aislados PVY^O y los tres aislados PVY^N de México se agruparon con sus respectivos grupos serológicos de las secuencias previamente reportadas. El análisis filogenético de secuencias del gen P1 (nucleótidos y aminoácidos) mostró a los dos aislados PVY^O en un agrupamiento O-N. Un análisis detallado de los aislados mexicanos PVY^O mostró dos sitios de recombinación potencial hacia el extremo 3' del gen P1, lo cual puede estar involucrado como determinante genética en la propiedad biológica que induce necrosis en plantas de tabaco.

Palabras clave: *Nicotiana*, necrosis de nervaduras, recombinación, PVY, NTN.

ABSTRACT

In order to analyze the necrotic strains of potato virus Y affecting potatoes in Mexico, five PVY isolates were submitted to biological and molecular characterization. Considering their serological properties, two belonged to the common strain O and three to the necrotic strain N. All isolates induced vein necrosis in *Nicotiana tabacum*. The 5'UTR and the P1 genomic regions were sequenced and compared to others reported to the Gen Bank databases. Nucleotide sequence similarity ranged from 47 to 100% in the 5'UTR and from 63 to 100% in the P1 coding region. The lowest amino acid similarity among sequences of the P1 gene was 55%. In phylogenetic trees of 5'UTR analysis, the two PVY^O and the three PVY^N isolates from Mexico clustered with their respective serological groups of previously reported sequences. The phylogenetic analysis of P1 sequences (nucleotide and amino acid) showed two PVY^O isolates in a O-N cluster. A detailed analysis of the Mexican PVY^O isolates showed two potential recombination regions in the 3' end of the P1 gene that may be involved as genetic determinants in the biological property of inducing tobacco necrosis.

Key words: *Nicotiana*, vein necrosis, recombination, PVY, NTN.

INTRODUCCIÓN

El virus Y de la papa (PVY), miembro tipo de la familia *Potyviridae*, infecta papa, tabaco, jitomate y chile así como especies silvestres, especialmente de la familia *Solanaceae* (De Bokx y Huttinga 1981). La clasificación fitopatológica convencional de los aislados de PVY está basada en los hospedantes primarios, en síntomas inducidos en hospedantes diferenciales y en su reacción serológica hacia anticuerpos monoclonales. Los aislados reportados hasta la fecha, han sido clasificados en tres variantes: PVY^N, PVY^O y PVY^C (Ellis *et al.* 1997). Los aislados que pertenecen a la variante PVY^N inducen una severa necrosis de nervaduras en hojas de *Nicotiana tabacum*. Esta

variante en particular ha sido dividida en dos grupos: uno (N) que produce un suave mosaico en muchos cultivares, mientras que el segundo causa la "enfermedad del anillo necrótico del tubérculo de la papa" (PTNRD: Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease) y un mosaico clorótico severo en las hojas (Chrzanowska 1991). Esta variante también es citada como PVY^{NTN} (NTN= aislados pertenecientes al grupo necrótico "N" que inducen necrosis en el tubérculo), conforme a la decisión de la Sección de Virología de la European Association of Potato Research (Beczner *et al.* 1984, Mc Donald y Kristjansson 1993). Los aislados PVY^O inducen mosaicos no necróticos en hojas de tabaco, en cambio inducen síntomas más severos

en papa, tal como deformación y marchitamiento de hojas o un severo mosaico necrótico. Los aislados *PVY^C* causan un rayado en forma de “líneas punteadas” en cultivares de papa que poseen el gen de resistencia “*Nc*” y no presentan síntomas de necrosis, parecido a los aislados *PVY^O*, en las hojas de *N. tabacum* (Le Romancer *et al.* 1994).

Hasta el día actual la clasificación serológica de los aislados del *PVY* es asunto de discusión. Los anticuerpos policlonales dirigidos a la proteína de la cápside no discriminan entre variantes del *PVY* determinadas con anticuerpos monoclonales específicos de las variantes O y N (Gugerli y Fries 1983, Hataya *et al.* 1994). Además, algunos aislados recombinantes han sido determinados serológicamente como *PVY^O* no obstante que inducen necrosis de nervaduras en plantas de tabaco. Este tipo de aislados se les ha denominado como aislados Wilga (*PVY^N-W*) (Chachulska *et al.* 1997). Esto muestra que las características serológicas y patogénicas de un determinado aislado del *PVY* parecieran no tener una relación absoluta.

Los métodos convencionales de clasificación del *PVY* no resultan en un criterio universal de agrupamiento de los aislados de virus dentro de las especies. El análisis genómico completo de aislados ha mostrado el grado de variación de similitud a lo largo del genoma, siendo el segmento terminal 5' no traducido (*5'UTR*) la región más variable del genoma del *PVY* (Marie-Jeanne *et al.* 1995). Esto ha conducido a una revaloración de los

subgrupos basada en el análisis de secuencias de genes. Un análisis comparativo de secuencias de aislados necróticos y no necróticos ha conducido a la hipótesis donde la determinante de necrosis de nervaduras se localiza en la región terminal 3', incluyendo al gen de la proteína de la cápside (*CP*) y la región 3' no traducida (*3'UTR*) (Van Der Vlugt *et al.* 1993). Otros estudios donde se han analizado los genes de la *CP* y *PI* y las regiones no traducidas 5' y 3' han concluido que tales regiones no están involucradas en la inducción de necrosis de nervaduras en tabaco (Chachulska *et al.* 1997). En otro trabajo se concluyó que las secuencias determinantes para inducir necrosis de nervaduras en tabaco, pudieran localizarse en la mitad 5' del RNA viral, específicamente en el gen de la proteína *HC-Pro* (Glais *et al.* 2002).

Se ha sugerido que la variante NTN resultó de una recombinación natural entre *PVY^O*, o *PVY^C* y *PVY^N* (Revers *et al.* 1996). Se han reportado aislados de *PVY*, los cuales pudieran ser formas intermedias de los grupos *PVY^O* y *PVY^N*, que muestran síntomas similares así como propiedades serológicas y genómicas de ambos grupos (Mc Donald y Singh 1996). Además, a partir de la comparación de secuencias del gen *PI* y la región *5'UTR* entre aislados *PVY^N* y *PVY^{NTN}* provenientes de América y Europa, se encontró una similitud del 98% entre ellos a pesar de pertenecer a grupos geográficos separados (Nie y Singh 2002). Esto sugiere que la variante NTN detectada en algunas regiones geográficas pudo haber surgido de una

variante N de la misma región lo cual pudiera explicar las diferencias entre aislados NTN de diferentes regiones geográficas en el mundo. Un hallazgo similar se reportó del análisis de secuencias de aminoácidos del gen de la CP entre aislados de América y Japón (Ohshima *et al.* 2000).

En el presente trabajo reportamos las relaciones entre aislados mexicanos de PVY y aislados de otras partes del mundo sobre la comparación de las regiones genómicas 5'UTR y PI. También analizamos su capacidad para inducir necrosis en tabaco con determinantes genéticas potenciales en el gen PI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de aislados y bioensayos

Se seleccionaron cinco aislados de PVY de una colección de virus detectados en plantas de papa del Estado de México, México. Las plantas de papa originales mostraban un moteado verde y hojas deformadas. Las plantas se mantuvieron en los invernaderos de la Dirección General de Sanidad Vegetal durante la realización de este estudio.

Todos los aislados de PVY se inocularon en seis especies de hospedantes y a las plantas inoculadas se les mantuvo en condiciones de invernadero con periodos de luz naturales (12 horas de luz aproximadamente) dentro de un rango de temperatura entre 15° y 26°. Los hospedantes usados en los bioensayos fueron *Chenopodium quinoa*, *Capsicum annuum* (var. Serrano),

Lycopersicon esculentum (var. Bola), *Nicotiana tabacum* (cv. Burley), *Physalis floridana* y *Solanum tuberosum* (cv. Alpha). Se inocularon diez plantas de cada especie de hospedante con cada uno de los aislados. Se usó como control positivo un aislado de PVY^N de origen canadiense donado por la Dirección General de Sanidad Vegetal de la SAGARPA en México, DF.

Prueba de ELISA

Se realizaron pruebas serológicas por la técnica de DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la detección de los virus PVA, PLRV, PVS, PVX y PVY con los anticuerpos y soluciones amortiguadoras de AGDIA (el número de catálogo de los anticuerpos se muestra entre paréntesis). Las pruebas se realizaron con anticuerpos policlonales (Pab) para PVA (SRA-60000), PLRV (SRA-30002), PVS (SRA-40000), PVX (SRA-10000), PVY (SRA-20001) y anticuerpos monoclonales (Mab) para PVY^{O+C} (SRA-20600), PVY^C (SRA-20700), PVY^N (SRA-26000).

La lectura de la prueba serológica se leyó a una absorbancia de 405 nm luego de una incubación de la placa por una hora a temperatura ambiente. El resultado se tomó como positivo cuando el valor de la lectura fue igual o mayor a tres veces la media de las lecturas del control negativo.

RT-PCR y secuenciación de DNA

El RNA del tejido vegetal se extrajo usando el método del TRIZOL[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA,

USA). La amplificación del DNA de las regiones 5'UTR y *PI* se hizo en dos etapas: primero la RT (reverse transcription) y después la PCR (polimerase chain reaction). La RT se hizo con la enzima M-MLV RT (Promega Corporation, Madison, WI, USA) con el iniciador reverso 3P1R (5'AGGATATCTCATTCGTGCC3') el cual se alinea en la región genómica 5'UTR-*PI*. Se usaron el iniciador reverso 3P1R y el iniciador directo G-121 (5'AATTAACAACACTCAATACAA CATAAGAAA3') para la amplificación por PCR. Los productos amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI, USA). La secuenciación de los productos clonados se hizo a partir de minipreps (High Pure Plasmid Isolation Kit, Hoffman-La Roche, LTD, Basel, Switzerland) en un secuenciador automatizado Abi Prism 377 Perkin-Elmer (Cetus, Norwalk, CT, USA).

Análisis de secuencias

El alineamiento de las secuencias para la región 5'UTR incluyó tres aislados de *PVY*^O y veinte y seis de *PVY*^{N/NTN} obtenidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), con secuencias de dos aislados de *PVY*^O y tres de *PVY*^N descritos en el presente trabajo.

El análisis del gen *PI* incluyó seis aislados de *PVY*^O y veintitrés de *PVY*^{N/NTN} obtenidos del NCBI y cinco secuencias de los aislados mexicanos descritos aquí. El análisis se realizó usando la secuencia completa tanto de la región 5'UTR como la del gen *PI*.

El alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se obtuvo mediante los programas de software: CLUSTALX, DNASTar y PAUP. Los agrupamientos en los dendrogramas se determinaron usando el software MEGA3. Las matrices de distancias de los dendrogramas se calcularon mediante el "Kimura two-parameter" y el "Neighbor joining method". Para el valor de la significancia estadística de los nodos se hizo un "bootstrap" de 10,000 repeticiones. Se utilizó el software RDP (Recombination Detection Program) para identificar alguna recombinación potencial en la región genómica en estudio.

RESULTADOS

ELISA y pruebas biológicas

Las pruebas de ELISA mostraron que todos los aislados mexicanos fueron negativos a los anticuerpos para *PVA*, *PVS*, *PVX* y *PLRV*, pero dieron reacción positiva con los anticuerpos para *PVY*. Dos aislados mexicanos (denominados Pic3 y Vic20) dieron reacción positiva con el anticuerpo monoclonal para *PVY*^O. Los tres restantes (denominados Pic1, Vic6 y Vic15) mostraron reacción positiva con el anticuerpo monoclonal para *PVY*^N.

Los bioensayos mostraron que todos los aislados mexicanos indujeron necrosis de nervaduras en *Nicotiana tabacum*. Los tres aislados pertenecientes a la variante N indujeron la típica necrosis de nervaduras a los 7-10 días posteriores a la inoculación. Los aislados Pic3 y Vic20, ambos *PVY*^O, indujeron severo

mosaico clorótico a los 7-10 días posteriores a la inoculación y una moderada necrosis de nervaduras más una severa distorsión de hojas tres semanas después de la inoculación. La agresividad de los aislados Pic3, Vic6, Vic15 y Vic20 en plantas de *N. tabacum* y *Ph. floridana* fue alta.

Análisis de secuencias

Las cinco secuencias de la región 5'UTR-PI de los aislados mexicanos son reportados aquí como Vic 6 (clave de acceso AY700016), Vic 15 (clave de acceso AY700017), Pic 3 (clave de acceso AY700018), Pic 1 (clave de acceso AY700019) y Vic 20 (clave de acceso AY700020).

Se compararon y analizaron treinta y cuatro secuencias del gen *PI*, entre las cuales cinco son de México, (ocho de la variante O, dieciocho de la N y ocho de la NTN). Su porcentaje de similitud se ubicó entre 63 y 100%. Los aislados mexicanos de *PVY*^O, Pic3 y Vic20, se agruparon en una de las ramas con aislados identificados como variantes O y N mientras que los aislados *PVY*^N, Vic6, Vic15 y Pic1, se agruparon en una rama diferente con otros aislados de la variante N y todos los aislados NTN analizados (Figura 1). El agrupamiento "N-NTN" muestra una particular afinidad de los tres aislados mexicanos *PVY*^N con los aislados *PVY*^{N-NTN} de Europa y Norte América. Por otra parte, la rama "O-N" muestra un agrupamiento específico de los dos aislados *PVY*^O mexicanos con el aislado *PVY*^N-Wi-P (Clave de Acceso AF248500, de Polonia). Estos tienen la mas alta similitud entre todos los aislados analizados: 96.5% (Vic20

con Wi-P) y 98.9% (Pic3 con Wi-P). Se analizaron las secuencias de aminoácidos del gen *PI* de los mismos aislados y produjeron un rango de similitud entre el 55 y 100% (datos no mostrados).

Las treinta y cuatro secuencias nucleotídicas del gen *PI* se analizaron con el programa para análisis de recombinación RDP. En este análisis, se usaron diferentes tamaños de ventana y diferentes valores de máxima probabilidad aceptable. Se detectó una región de recombinación potencial en la secuencia del aislado *PVY*^N 5yt (clave de acceso AF401605) con ambos aislados mexicanos *PVY*^O (Pic 3 y Vic 20) en dos sitios de entrecruzamiento potencial en los nucleótidos ubicados en las posiciones 297 y 825 (Figura 2).

Basados en los resultados obtenidos de los análisis de recombinación del gene *PI*, se analizaron las treinta y cuatro secuencias nucleotídicas de este gen en dos regiones, usando los programas CLUSTALX, DNASTar, Mega3 y PAUP. Una región incluyó los 519 nucleótidos del extremo 3' del gen *PI* (con un rango de similitud de 62-100%) y agrupó a los cinco aislados mexicanos con aislados *PVY*^{N-NTN} (datos no mostrados). El análisis de la otra región que incluyó los 306 nucleótidos del extremo 5' del gen *PI* mostró un rango de similitud de 64-100% y produjo un dendrograma que mostró dos agrupamientos: el denominado "O-N", el cual incluyó a los aislados Pic3, Vic20 y *PVY*^N-Wi-P, y el denominado "N-NTN", en el cual quedaron incluidos los aislados

mexicanos Pic1, Vic6 y Vic15. La similitud entre aislados PVY^O (Pic3 y Vic20) y el aislado PVY^N -Wi-P fue de 98.7-99.3 %. Los dos aislados mexicanos PVY^O tuvieron un 66-67 % de similitud con los tres aislados necróticos Pic1, Vic6 y Vic15.

Se analizó la región 5'UTR por separado del gen *PI*. Se compararon treinta y cuatro secuencias nucleotídicas de 5'UTR de *PVY*, las cuales incluyeron las reportadas aquí, (cinco de la variante O, veinte de la N y nueve de la NTN). Las treinta y cuatro secuencias nucleotídicas de 5'UTR analizadas tuvieron una similitud del 58 al 100%, y no se detectaron regiones de recombinación al ser analizadas con el software RDP (datos no mostrados). Es de llamar la atención la región 5'UTR dado que se encontraron nucleótidos conservados en veinte posiciones definidas, tanto en aislados O, como N y NTN. En otras diez posiciones se encontraron más nucleótidos conservados, pero sólo en los aislados O o en los aislados NTN; los aislados N no mostraron nucleótidos conservados en estas diez posiciones (Figura 3).

DISCUSION

El análisis de doscientas secuencias nucleotídicas de diferentes regiones del genoma de *PVY* y trece secuencias de genoma completo correspondientes a trece aislados diferentes, mostró que el grado de similitud es diferente a lo largo del genoma, siendo la región terminal 5' el segmento más variable del genoma del *PVY* (datos no mostrados), lo cual concuerda con un reporte previo

(Marie-Jeanne *et al.* 1995). En el análisis de secuencias nucleotídicas se encontró mayor variabilidad en la región 5'UTR que en el gen *PI* (58 a 100% y 63 a 100%, respectivamente).

De acuerdo a las propiedades mostradas por los aislados mexicanos de *PVY* podemos concluir que los cinco son capaces de inducir necrosis en tabaco, pero pertenecen a dos diferentes grupos serológicos. De Polonia, Canadá, España y Francia se han reportado aislados con características similares a los aislados mexicanos PVY^O (Pic3 y Vic20) que inducen necrosis en tabaco (Blanco-Urgoiti *et al.* 1998, Kerlan *et al.* 1999, Mc Donald y Singh 1996) Por ejemplo, el aislado PVY^NW (Wilga) encontrado en Polonia en 1984, primero se le describió como diferente en su virulencia y agresividad en papa respecto a anteriores aislados PVY^N , pero más tarde se le encontró serológicamente relacionado con aislados PVY^O (Chrzanowska 1991).

Adicionalmente, la comparación de secuencias del gen *CP* de los aislados Pic3 y Vic20 contra setenta aislados reportados para otros países mostró un 99% de similitud con aislados PVY^O y se agruparon con otros quince aislados PVY^O analizados (datos no mostrados).

El dendrograma obtenido con las treinta y cuatro secuencias del gen *PI* mostraron dos grupos principales, el grupo "O-N" y el grupo "N-NTN". Los tres aislados mexicanos de la variante N se agruparon con siete aislados europeos en el grupo "N-NTN" pero en un diferente subgrupo de nueve aislados de Norteamérica. Es de

notable interés el grupo “O-N” que incluye a tres aislados: dos de México y uno de Polonia, el cual tiene los más altos valores de similitud entre las treinta y cuatro secuencias analizadas: 96.5% (entre Vic20 y Wi-P) y 98.9% (entre Pic3 y Wi-P).

En general las secuencias nucleotídicas de los aislados mexicanos de PVY reportados aquí se agruparon más estrechamente con los aislados europeos que con los aislados de Norte América. Este agrupamiento aparentemente discordante es similar al reportado en otros trabajos (Glais *et al.* 2002, Ohshima *et al.* 2000). En México, recientemente, se ha tenido la presencia de variantes necróticas del PVY, esto como resultado de regulaciones oficiales impuestas a la producción de tubérculo-semilla. El origen geográfico de estas variantes introducidas a México, hasta la fecha no se ha esclarecido, especialmente porque en los últimos años México ha importado tubérculo-semilla de Canadá de forma exclusiva, y por lo tanto se tenía la sospecha de una alta similitud de las secuencias de los aislados de México con aislados de Norte América. En el presente trabajo los resultados señalan la estrecha relación de los aislados mexicanos con los aislados europeos y por lo tanto parecen contradecir tal sospecha. Una posibilidad es que las variantes necróticas reportadas aquí hayan pasado desapercibidas en tubérculo-semilla canadiense; otra posibilidad pudiera ser que estas variantes pudieran haber ingresado de Europa a México hace años en tubérculo-semilla o, recientemente, en material vegetal

propagativo y asintomático, como en las plantas de ornato.

Hay creciente evidencia respecto a que la recombinación de RNA es el principal factor evolutivo en virus de RNA de plantas. En nuestro estudio, de cuatro zonas de entrecruzamiento detectadas entre secuencias tipo PVY^O y tipo PVY^N, se encontró una región de recombinación en el gen *PI* de varios aislados PVY^NW. Además, en un sitio amino terminal de *PI* del aislado PVY^N-Wi-P parece haber un punto de inicio de recombinación de PVY^O a secuencias tipo PVY^N (Glais *et al.* 2002, Revers *et al.* 1996).

En el presente trabajo se analizaron treinta y cuatro secuencias del gen *PI* y se detectaron sitios de entrecruzamiento y recombinación potencial en los nucleótidos 297 y 825 (Figura 2), resultado de un posible evento de recombinación entre el aislado N 5yt (de Norte América) y otro potencial aislado, resultando de ello aislados como Pic3 y Vic20. Este resultado nos permitió analizar las mismas treinta y cuatro secuencias del gen *PI* (cada una de 825 nucleótidos) en dos regiones: la primera, de la región terminal 3', de 519 nucleótidos y, la segunda, de la región terminal 5' de 306 nucleótidos. Se observaron dos agrupamientos diferentes para ambos aislados mexicanos de PVY^O (Pic3 y Vic20). Primero, el análisis de las treinta y cuatro secuencias del extremo terminal 3' del gen *PI* (519 nucleótidos) mostró a ambos aislados mexicanos de PVY^O dentro del grupo de aislados de PVY^{N-NTN} (datos no mostrados). Por otra parte, el análisis de la región terminal 5' terminal (306

nucleótidos) produjo un acomodo de los aislados mexicanos de *PVY*^O dentro del grupo de aislados *PVY*^{O-N} (Figura 1).

De estos resultados podemos señalar que éste es el primer reporte de la presencia de variantes necróticas de *PVY* en papas cultivadas en México, y dos aislados de *PVY* que pertenecen a la variante O, por serología, pero que pudieran ser descritas como aislados tipo *PVY*^N-W (variantes “Wilga”). Basados en nuestros análisis de secuencias y de recombinación sugerimos que las determinantes virales de necrosis en tabaco pudieran localizarse hacia el extremo 3' del gen *PI*, lo cual concuerda con lo reportado por Fanigliulo *et al.* (2005).

La presencia de variantes necróticas en México puede tener una gran importancia por lo perjudicial que pudiera resultar a los cultivos de tabaco (*N. tabacum*) y tomate (*Physalis spp.*) en el país. Por lo tanto la caracterización de las variantes necróticas presentadas aquí pueden motivar más investigaciones adicionales y acciones de las autoridades fitosanitarias para prevenir un posible impacto negativo en el cultivo de la papa y otras plantas, de la familia *Solanaceae*, cultivadas en México.

Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por el ICAMEX. Los autores agradecen al personal de la Dirección General de Sanidad Vegetal por mantener el material usado y permitirnos probarlo en los ensayos biológicos. Agradecemos el apoyo

técnico de Juan Carlos Ochoa Sánchez y Magali Hernández Valencia.

REFERENCIAS

- Beczner L., Horvath J., Ronhanyi J. y Forster H. 1984. **Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot diseases in potato.** *Potato Res.* 27: 339-352.
- Blanco-Urgoiti B., Tribodet M., Leclere S., Ponz F., Perez De San Roman C., Legorburu F.J. y Kerlan C. 1998. **Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates.** *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 811-819.
- Chachulska A.M., Chrzanowska M., Robaglia C. y Zagorski W. 1997. **Tobacco vein necrosis determinants are unlikely to be located within the 5' and 3' terminal sequences of the potato virus Y genome.** *Arch. Virol.* 142: 765-79.
- Chrzanowska M. 1991. **New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVYN) found recently in Poland.** *Potato Res.* 34: 179-182.
- De Bokx J.A. y Huttinga H. 1981. **Potato virus Y: description of plant viruses.** Commonwealth Mycology Institute./Association of Applied Biology, Kew, England.
- Ellis P., Stace-Smith R. y De Villiers G. 1997. **Identification and geographic distribution of serotypes of Potato Virus Y.** *Plant Dis.* 81: 481-484.
- Fanigliulo A., Comes S., Pacella R., Harrach B., Martin D. P. y Crescenzi A. 2005. **Characterisation of Potato virus Y nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a**

- naturally occurring recombinant strain of PVY.** *Arch. of Virol.* 150: 709 – 720.
- Glais L., Tribodet M., Kerlan C. 2002. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) and PVY(N) isolates. *Arch. Virol.* 147: 363-78.
- Gugerli P., Fries A. 1983. Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* 64: 2471-2477.
- Hataya T., Inoue A.K., Ohshima K. y Shikata E. 1994. **Characterization and strain identification of a potato virus Y isolate non-reactive with monoclonal antibodies specific to the ordinary and necrotic strains.** *Intervirol* 37: 12-9.
- Kerlan C., Tribodet M., Glais L. y Guillet M. 1999. **Variability of potato virus Y in potato crops in France.** *J. Phytopathology* 147: 643-651.
- Le Romancer M., Kerlan C. y Nedellec M. 1994. **Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers.** *Plant Pathol.* 43: 138-144.
- Marie-Jeanne T.V., Chachulska A.M., Fakhfakh H., Le Romancer M., Robaglia C. y Astier-Manifacier S. 1995. **Sequence polymorphism in the 5'UTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA.** *J. Gen. Virol.* 76: 939-949.
- Mcdonald J.G. y Kristjansson G.T. 1993. **Properties of strains of potato virus YN in North America.** *Plant Dis.* 77: 87-89.
- Mcdonald J.G. y Singh R.P. 1996. **Host range, symptoms and serology of isolates potato virus Y (PVY) that share properties with both the PVYN and PVYO strain groups.** *American Potato J.* 73: 309-315.
- Nie X. y Singh R.P. 2002. **Probable geographical grouping of PVY(N) and PVY(NTN) based on sequence variation in P1 and 5'UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY(NTN).** *J. Virol. Meth.* 103: 145-56.
- Ohshima K., Sako K., Hiraishi C., Nakagawa A., Matsuo K., Ogawa T., E. S y Sako N. 2000. **Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: Its association with potato virus Y necrotic strain.** *Plant Dis.* 84: 1109-1115.
- Revers F., Le Gall O., Candresse T., Le Romancer M. y Dunez J. 1996. **Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates.** *J. Gen. Virol.* 77: 1953-1965.
- Van Der Vlugt R. A., Leunissen J. y Goldbach R. 1993. **Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions.** *Arch. Virol.* 131: 361-75.

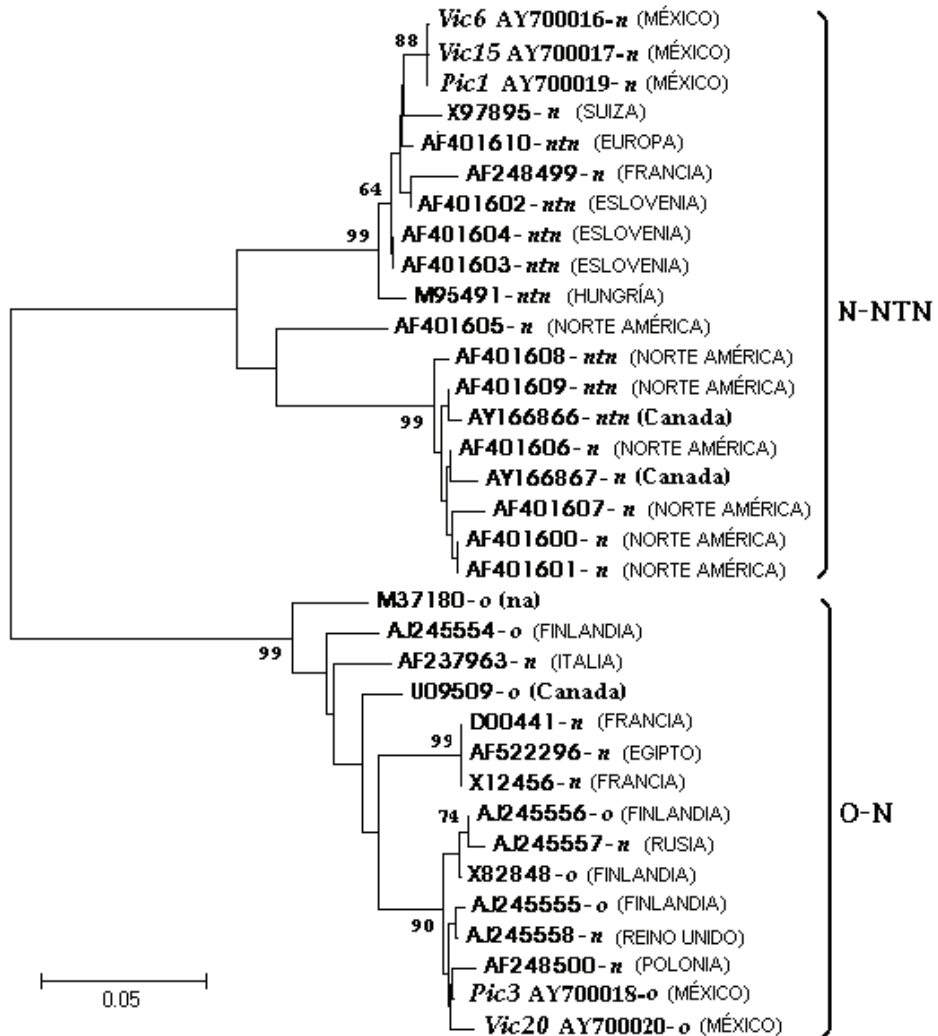


Figura 1. Dendrograma de 34 secuencias de nucleótidos (usando 306 nucleótidos de la región 5' del gen *P1*). Los aislados *Pic3* y *V20* (ambos del tipo "PVY^o Wilga") se ubicaron dentro del grupo "O-N". Los aislados mexicanos están en *italicas*. (na): datos no accesibles.

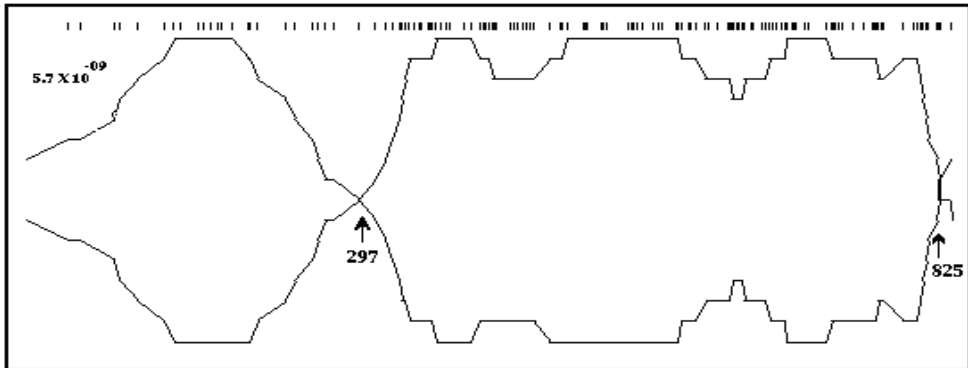


Figura 2. Representación gráfica de zonas de recombinación detectadas en secuencias nucleotídicas del gen *P1* entre los aislados PVY^O-Pic3 (de México) y PVY^N-N 5yt (de Norte América). En el lado izquierdo de la gráfica se ubica el primer nucleótido del gen *P1* y en el lado derecho el nucleótido 825. Las flechas señalan los nucleótidos donde se ubican dos potenciales puntos de entrecruzamiento, nucleótidos 297 y 825. Para el análisis de recombinación se usó un tamaño de ventana de 10 nucleótidos y un máximo de probabilidad aceptable de 0.00001.

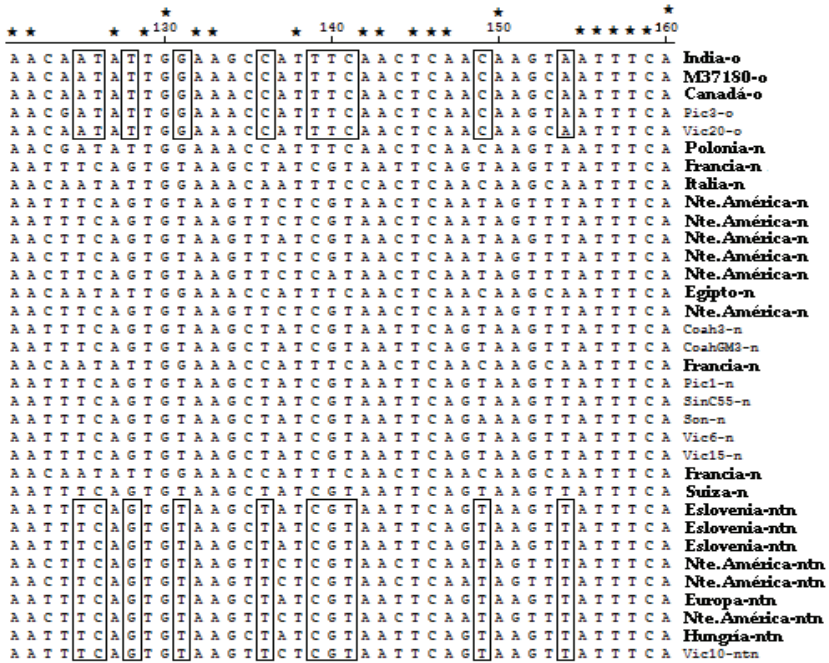


Figura 3. Sitios conservados en secuencias de la región 5'NTR. Se muestran secuencias de 34 aislados, del nucleótido en la posición 121 a la posición 160. Los nucleótidos conservados se muestran encerrados en rectángulos para cada uno de los dos grupos de variantes (O y NTN) que muestran esta característica. Los sitios conservados en las 34 secuencias se señalan con el símbolo: ★.