

CEVIPAPA

Centro virtual de investigación de la
cadena agroalimentaria de la papa



IBUN
UNIVERSIDAD NACIONAL
DE COLOMBIA

ISBN: 958-7014936

**MANUAL DE PROTOCOLOS
PARA LA DETECCIÓN DE ALGUNOS
VIRUS QUE INFECTAN LA PAPA**
(Solanum spp.)



22401

ICA GUZMÁN BARNEY, Ph.D.

MANUAL DE PROTOCOLOS

PARA LA DETECCIÓN DE ALGUNOS

VIRUS QUE INFECTAN LA PAPA

(Solanum spp.)



MÓNICA GUZMÁN BARNEY, Ph.D.

Profesora Asociada
Instituto de Biotecnología –IBUN–

Financiación
CEVIPAPA
Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
IBUN - Universidad Nacional de Colombia

ISBN: 958-7014936
ENERO 2008

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
PARA LA DETECCIÓN DE ALUMNOS
VIRUS QUE INFIERTAN LA PAPA

(Solamente para)



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE ALUMNOS VIRUS QUE INFIERTAN LA PAPA

I. C. A. - BAC	
No. Acceso	
Código	<input type="checkbox"/>
Colección	<input type="checkbox"/>
Origen	<input checked="" type="checkbox"/>
Procedencia	<input type="checkbox"/>

Prólogo

El cultivo de papa en Colombia está expuesto a diversos organismos fitopatógenos de importancia económica; entre ellos hongos, bacterias, insectos y virus. Estos últimos, se constituyen en una de las principales causas de disminución de calidad y rendimiento del tubérculo cosechado.

El uso de semilla tradicional y su continuo movimiento entre zonas de cultivo, así como el inadecuado manejo de insectos vectores, son factores que contribuyen a una rápida diseminación y alta prevalencia de los virus a lo largo del territorio nacional; de allí la importancia de una correcta identificación y el acceso a una información consolidada que amplíe el conocimiento sobre las condiciones que favorecen los virus.

En general la identificación del agente causal en campo, se basa en sintomatología que se manifiesta principalmente en entorchamientos, amarillamientos, disminución de tamaño y mosaicos, pero la forma más precisa para la detección de los virus se relaciona en el presente documento, a través de metodologías de laboratorio resumidas en protocolos ajustados a las necesidades del sistema productivo papa, dejando de lado la subjetividad de la determinación visual, la cual puede llegar a verse afectada por condiciones ambientales, manejo agronómico del cultivo y presencia de plantas asintomáticas.

La Cadena Agroalimentaria de la Papa reconoce éste esfuerzo realizado por el Instituto de Biotecnología Universidad Nacional (IBUN), en particular a la Doctora Mónica Guzmán y colaboradores por llevar a la comunidad científica un completo y actualizado Manual de Protocolos para la detección de los principales virus que afectan la papa. Este importante trabajo contribuirá desde el laboratorio,

a mejorar el manejo fitosanitario en sus fases de producción de semilla certificada y al aumento en la competitividad de los cultivos comerciales.

AUGUSTO DEL VALLE

Director Ejecutivo

Centro Virtual de Investigación de la Cadena Agroalimentaria
de la Papa

Presentación

El Manual de Protocolos (MP) que se presenta a consideración de la comunidad relacionada con la fitosanidad en papa y los fitovirus, tiene como objetivo principal dar a conocer los resultados de algunos protocolos adaptados en el Laboratorio de Virus Vegetales del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la Universidad Nacional de Colombia, para la detección de virus que afectan al cultivo de la papa; protocolos que se han desprendido de investigaciones financiadas por CEVIPAPA, el Instituto de Biotecnología y la Universidad Nacional de Colombia.

Es muy importante resaltar la ayuda de varios colaboradores y estudiantes a quienes dirigí en las adaptaciones de técnicas específicas. De antemano agradezco esta valiosa colaboración e incluyo más adelante el *currículum vitae* de las personas involucradas. Agradezco igualmente la amable colaboración e interés de CEVIPAPA y FEDEPAPA para sacar adelante este manual.

El desarrollo general del MP se realiza en capítulos por temas, de manera didáctica y resumida sin dejar de lado las precisiones científicas necesarias para que los contenidos sean entendidos y apropiados por un amplio grupo de personas con formaciones diferentes, como estudiantes universitarios e investigadores en fitosanidad, agrónomos, y técnicos. Sería deseable también, que apartes del MP pudieran ser utilizados por docentes en las áreas de biología, fitopatología vegetal o biotecnología y por los estudiantes de establecimientos de educación secundaria, públicos y privados, localizados en áreas rurales o urbanas.

También se incluye información resumida sobre algunos temas científicos como clasificación, taxonomía y grupos virales, síntomas,

replicación y transmisión viral por vectores, ampliando la información para algunos virus importantes en el cultivo de la papa como son el PVY, PVX, PVS, PLRV, PVV y PMTV, sin olvidar, que las técnicas para la detección, caracterización y control viral expuestas en la literatura mundial son numerosas.

Es el interés principal del MP, ilustrar diferentes técnicas de diagnóstico, sencillas y más sofisticadas, tanto de tipo serológico como molecular. La información se complementa, de otra parte, con protocolos implementados en otros cultivos comerciales y que se consideran de interés y utilidad para que sean adaptados en la detección de virus en papa.

Es el momento de agradecer a los diferentes colaboradores y la oportuna financiación y credibilidad de CEVIPAPA y del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, de la División de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia y del Instituto de Biotecnología por el aporte financiero para la ejecución de las técnicas e investigaciones y para la realización de este Manual de Protocolos. Finalmente, se aspira a que este trabajo sea un aporte modesto pero serio, de fácil disponibilidad y que beneficie directa o indirectamente a la cadena de competitividad de la papa.

Sobre los colaboradores

La Ingeniera Agrónoma Marina Caro, adscrita al Instituto de Biotecnología y la Bacterióloga Jenny García de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, colaboraron en la adaptación de las técnicas serológicas de ELISA y de Inmunoimpresión (IMI). Para la adaptación de la técnica molecular de patrones de dsRNA del Virus del Amarillamiento de Venas de la Papa (*Potato yellow vein*, (PYVV), *Crinivirus*) se contó con la colaboración de la Ingeniera Agrónoma Nancy Arciniegas (Universidad de Nariño), en el laboratorio de Virus Vegetales del IBUN, como tesista de Maestría en Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. La detección molecular del Virus del Amarillamiento de Venas de la Papa por medio de Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y la implementación de los perfiles de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) para estimar variabilidad viral la realizó Elizabeth Ruiz (Química de la

Universidad Nacional de Colombia) quién obtuvo su primera formación en este tópico también, y se contó parcialmente con la colaboración de Nancy Arciniegas.

Por lo tanto, los protocolos mencionados en el MP son un resumen de algunas técnicas adaptadas durante el desarrollo de tres investigaciones financiadas por CEVIPAPA y la Universidad Nacional de Colombia (IBUN-DIB) realizadas bajo la dirección de la autora. Adicionalmente, se han incluido otros protocolos sencillos y útiles, como el de inmunocaptura (IC-RT-PCR), adaptados por la autora, para la detección de virus en otros cultivos.

Es pertinente agradecer el apoyo de todos los colaboradores mencionados, incluido el Dr. Carlos Nustez, Profesor de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia y Director del Programa de Papa de la misma Universidad, quien apoyó la ejecución de algunos de estos trabajos. Igualmente, al Dr. Robert Coutts del Imperial College of London, quién facilitó gentilmente los cebadores para la amplificación del gen de la proteína de la cápside del PYVV, y con quien, se ha continuado la colaboración investigativa. De igual manera, se agradece muy especialmente al evaluador de este documento, Doctor Gerardo Martínez, Ph.D., virólogo de amplia experiencia quién se encuentra vinculado actualmente a la Universidad de Caldas como profesor e investigador, por el tiempo dedicado a la lectura y revisión de este documento, por las correcciones y las sugerencias pertinentes.

Reseña sobre el autor

Mónica Guzmán Barney

Bióloga de la Universidad Nacional de Colombia, 1979. Obtuvo un diploma de Magister en Scientiae en Microbiología de la misma Universidad (1993), con un trabajo sobre secuenciamiento del gen de la proteína de la cápside del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV). Posteriormente obtuvo su diploma de Doctorado de la Universidad de Bordeaux II, Victor Segalen, Francia, con Mención en Biología y Salud, desarrollando trabajos sobre caracterización biológica, serológica, molecular y de transmisión por vector en aislados del CTV provenientes de cítricos ornamentales. Actualmente es profesora asociada de la Universidad Nacional de Colombia, vinculada al Instituto de Biotecnología desde 1990, donde conformó y dirige el laboratorio de Virus Vegetales. Tiene a su cargo el curso de virus vegetales en la Maestría de Microbiología. Ha sido investigadora principal y colaboradora de trabajos relacionados con el diagnóstico y caracterización de diferentes fitovirus como son el Virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, *Closterovirus*, CTV), los virus que causan el Mosaico severo y Mosaico suave de la hoja del ñame (*Yam mosaic virus*, *Potyvirus*, YMV) y mosaico suave de la hoja (*Yam mild mosaic virus*, *Potyvirus*, YMMV) y, en la detección y caracterización de virus que infectan al cultivo de la papa, como el Virus del Amarillamiento de venas de la hoja de papa (Potato yellow vein virus, *crinivirus*, PYVV) el virus de Enrollamiento de la hoja de la papa (*Potato leafroll virus*, *Luteovirus / Polerovirus*, PLRV) y de los virus Y (*Potato Y virus*, *Potyvirus* (PVY), *Potato X*

virus, *Potexvirus* (PVX) y *Potato S virus*, *Carlavirus* (PVS) de la papa. De otra parte, ha colaborado en trabajos relacionados con la caracterización molecular del ñame, y hace parte del grupo de estudio sobre el Ñame de la Universidad Nacional, auspiciado por el Programa de Biotecnología Agrícola (PBA) y Colciencias. Conjuntamente con otros autores, ha publicado: cuatro libros, dos capítulos de libro (uno en inglés y uno español) y 26 artículos en publicaciones seriadas. Ha presentado apartes de 20 trabajos en congresos nacionales y 10 en congresos internacionales. Ha dirigido 7 tesis de maestría y pregrado. En 1994 fue distinguida con el Premio Nacional de Fitopatología «Rafael Obregón», otorgado por ASCOLFI y, en el 2004, otros dos trabajos sobre el CTV obtuvieron una mención especial, en el II Congreso de Biotecnología- Bogotá y en la XLIV Reunión de la APS – 2004, La Habana, Cuba. Es miembro de la Internacional Organization of Citrus Virologists (IOCV) y de la American Phytopathological Society- División Caribe (APS-DC). Miembro del comité académico y organizador de la 46 Reunión Internacional de la APS-CD y del Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines – ASCOLFI. desarrollado en Cartagena, Colombia en septiembre 12 a 17 de 2006. Hizo parte del comité de estudios y conformación de la cadena de competitividad de los cítricos (2001) y ha participado en talleres específicos organizados por CEVIPAPA. En 2007, recibió la Medalla al Mérito Universitario otorgada por la Universidad Nacional de Colombia. Actualmente es investigadora principal de dos proyectos financiados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la Convocatoria MADR 2007. «Incidencia de PYVV (virus del amarillamiento de 2venas de hoja de papa) en semilla y determinación de la reducción del rendimiento de producción en *S. phureja* en Cundinamarca: un modelo con proyección para el manejo integrado del patógeno» 7. aprobado-radicado 1802. «Obtención de un anticuerpo policlonal para detección por ELISA del espectro de variantes del virus PYVV (virus del amarillamiento de las venas de hoja de papa) en *Solanum phureja* como un aporte a la producción de semillas de papa certificadas en Colombia». Convocatoria Ministerio de Agricultura 2007 aprobado-radicado 1318.

A continuación se reseñan algunos artículos publicados y la participación en Congresos relativos a los estudios realizados en papa:

Guzmán, M., Ruiz, E., Arciniegas, N and Coutts, R.H.A (**2006**). Ocurrence and variability of Potato yellow vein virus in the three departments of Colombia. *J. Phytopathology*, 154: 748-750

Eliasco, E., Lieveratus, I.C., Müller, G.; **Guzmán, M.**; Salazar, L.F. y Coutts, R.H.A. 2006. Sequences of defective RNAs associated to Potato yellow mosaic virus - *Archives of Virology* 151 (1) : 201-204

Offei, S.K.; Arciniegas, N.; Müller, G.; **Guzmán, M.**; Salazar, L.F. y Coutts, R.H.A. 2004. Molecular variation of Potato yellow mosaic virus isolates - Brief Report. *Archives of Virology* 149: 821-827

Guzmán, M.; Caro, M. y García, Y. 2002. Técnica de inmunoimpresión en membrana de nitrocelulosa: una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PLRV, PVX, PVY y PVS que infectan a la papa *Solanum spp.* *Revista Colombiana de Biotecnología* IV(2): 45-51

Guzmán, M.; Arciniegas, N. y Ruiz, E. 11 - 13 de Agosto de 2004. Rastreo del virus del amarillamiento de venas de la papa (PYVV) en tres departamentos colombianos y estimación de la variabilidad genética por dsRNA y RFLPs. XXX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines - ASCOLFI. CIAT - Palmira.

Arciniegas, N.; **Guzmán, M.** y Ñustez, C. 25 - 27 de junio de 2003. Implementación de técnicas de diagnóstico para el virus del amarillamiento de las venas de la papa (PYVV).. XXIV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines - ASCOLFI . Fitopatología, Ciencia y Paisaje. Armenia.

Arciniegas, N.; **Guzmán, M.** y Ñustez, C. 25 - 27 de junio de 2003. Metodología de evaluación de resistencia al virus del amarillamiento de las venas de la papa (PVY) en genotipos de la colección central colombiana de *Solanum phureja*. XXIV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines - ASCOLFI Fitopatología, Ciencia y Paisaje. Armenia.

Guzmán, M.; Caro, M.; Arciniegas, N. y Garcia, Y. 3 - 8 de julio de 2002. Aplicación de la técnica serológica de inmunoimpresión en la detección de algunos virus que infectan a la papa.. XXV

Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines -. Bogotá.

Rodríguez K.; Murcia B.; Huertas W.; **Guzmán M.** y García. 3 – 8 de julio de 2002. Estandarización de la técnica DAS-ELISA para la cuantificación de *Spongospora subterránea* en suelo. C. XXV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología ASCOLFI. Bogotá.

Murcia, B.; Huertas, F.; Medina, K.; **Guzmán, M.** y García, C. 3 – 8 de julio de 2002. Estimación de la densidad de cistosoros de *Spongospora subterranea f.sp. subterranea sp. subterranea* en suelo en un área productora de papa en Subachoque – Cundinamarca. XXV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología ASCOLFI. Bogotá.

Guzmán, M.; Oliveros, O.; Delgado, J.; Arciniegas, N.; Martínez, S.; Castro, C. y Bermúdez, G 26 - 28 de junio de 2002. Algunas estrategias para la caracterización de virus vegetales.. Primer Congreso Colombiano de Biotecnología. Bogotá.

Guzmán, M.; Caro, M. y García, Y. 23 - 25 de mayo de 2001. Detección rápida y sensible de los virus PLRV, PVX, PVY, PVS que infectan a la papa por medio de la técnica serológica de inmunopresión. VII Congreso de la Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos. Ibagué.

Tabla de Contenido

Prólogo	5
PRESENTACIÓN	7
Sobre los colaboradores	8
Reseña sobre el autor	10
INTRODUCCIÓN	20
CAPÍTULO I	23
ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LOS FITOVIRUS ...	23
Definición de virus	23
Taxonomía	23
Aspectos generales de la replicación de los virus de RNA	27
CAPÍTULO 2	30
TRANSMISIÓN	30
Los vectores	30
Estrategias de transmisión por vector	33
Progresión de la infección viral	34
Diferentes tipos de infección viral	36
CAPÍTULO 3	37
SÍNTOMAS	37
Generalidades sobre enfermedad y síntomas	37
Algunos síntomas	40
Significado de abreviaturas virales	40
Síntomas	41

CAPÍTULO 4.....	48
VIRUS EN PAPA	48
Grupos virales que infectan a la papa	48
Cepas y variantes virales	48
Sobre algunos virus	51
Virus Y de la papa (<i>Potato virus Y</i> , (PVV), <i>Potyvirus</i>)	51
Virus X de la papa (<i>Potato virus X</i> , (PVX), <i>Potexvirus</i>)	56
Virus S de la papa (<i>Potato virus S</i> , (PVS), <i>Carlavirus</i>)	59
Virus del enrollamiento de la hoja (<i>Potato leafroll virus</i> , (PLRV), <i>Luteoviru</i>).....	60
Virus «Mot-Top» de la papa (<i>Potato mop-top virus</i> , (PMTV) <i>Furovirus</i>).....	62
Virus del amarillamiento de venas de la hoja (<i>Potato yellow vein virus</i> (PYVV), <i>Crinivirus</i>)	66
Pérdidas económicas por fitovirus y estrategias de control	71
CAPÍTULO 5.....	75
DETECCIÓN	75
Algunas estrategias para la detección de fitovirus	75
Sintomatología.....	75
Serología	76
Patrones de dsRNA.....	81
Amplificación de genes por RT-PCR	81
IC-RT-PCR	83
Hibridación con sondas marcadas	83
Secuenciamiento de nucleótidos de genes específicos y de genomas	84
CAPÍTULO 6.....	86
ALGUNAS TÉCNICAS ADAPTADAS EN EL LABORATORIO DE VIRUS VEGETALES – IBUN Y PROTOCOLOS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS QUE INFECTAN PAPA	86
Técnicas serológicas.....	86
Inmunoimpresión IMI	86
ELISA	89
Protocolo ELISA indirecto (DASI)	89
Protocolo DAS ELISA	90
Perfiles de dsRNA para PYVV	91

Técnica	92
Preparación de molde de RNA a partir de TRIZOL (Gibco BLR)	95
Preparación del molde de dsRNA	96
Amplificación de genes por RT-PCR para la detección de PYVV	97
Extracción del RNA	97
Protocolo en un solo tubo	97
Protocolo en dos tubos	99
Amplificación de genes por IC-RT-PCR	101
Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórficas (RFLPs)	104
CAPITULO 7	106
BIBLIOGRAFÍA	106
Otras paginas web consultadas	110
RESEÑA COLABORADORES	111

Índice de Figuras

Figura 1.	Clasificación de los virus que infectan plantas	25
Figura 2.	Microfotografías electrónicas de diferentes viriones	26
Figura 3.	Replicación del RNA genómico. Formación de los RNA de interferencia	27
Figura 4.	Diagrama del ciclo de un virus de RNA	28
Figura 5.	Insectos vectores de virus de la papa	32
Figura 6.	Esquema general de los diferentes tipos de insectos transmisores de virus fitopatógenos	32
Figura 7.	Progresión de la distribución del virus en la planta hospedera	35
Figura 8.	Vías de infección viral	36
Figura 9.	Expresión del síntoma de mosaico	42
Figura 10.	Síntoma de encrespamiento	43
Figura 11.	Expresión del síntoma de moteado	44
Figura 12.	Síntoma de necrosis en el tubérculo de papa	44
Figura 13.	Síntoma de enrollamiento en papa	45
Figura 14.	Síntoma de amarillamiento de venas en papa	46
Figura 15.	Enanismo debido a la infección con PMTV	47
Figura 16.	A. Enanismo por infección con <i>PYDN</i>	47
Figura 17.	A. Seguimiento de vectores de PVY diferentes a <i>Myzus persicae</i> . B. Seguimiento del vector de PVY <i>Myzus persicae</i> en Norte América	52
Figura 18.	Diferentes síntomas expresados por la planta con PVY	53
Figura 19.	Microfotografía electrónica del Virión de PVY a partir de extractos purificados	54
Figura 20.	Patrones de RNA en PVY	55
Figura 21.	Viriones de PVX	57
Figura 22.	Inclusiones de PVX en tabaco	57
Figura 23.	Diferentes síntomas producidos por PVX	58
Figura 24.	Síntoma producido por la infección con PVS	59
Figura 25.	Inclusiones citoplasmáticas de PLRV	60
Figura 26.	Síntomas y vectores del PLRV	61
Figura 27.	Partícula de PMTV	64
Figura 28.	Esquema del genoma tripartita del PMTV	64

Figura 29.	Síntomas de infección con PMTV en hojas	65
Figura 30.	Síntoma de aclaración y necrosis en tubérculos infectados por el PMTV	65
Figura 31.	Enanismo causado por el virus PMTV.....	66
Figura 32.	Distribución geográfica de la incidencia de PYVV	67
Figura 33.	Cultivo infectado por el PYVV	67
Figura 34.	Viriones purificados de PYVV.....	68
Figura 35.	RNA genómico y especies de dsRNA en PYVV .	69
Figura 36.	Síntomas de amarillamiento de venas de la hoja causados por la infección con el PYVV	71
Figura 37	Microfotografía electrónica de algunos fitovirus purificados	76
Figura 38	Ejemplos de inclusiones citoplasmáticas	77
Figura 39	Detección antígeno anticuerpo	78
Figura 40	Esquema de afinidad entre el Antígeno y el Anticuerpo en la técnica ELISA	78
Figura 41	Histograma que muestra el perfil serológico de la exposición de dos aislados del CTV	79
Figura 42	Ejemplos de inmunopresión (IMI) para la detección del virus CTV sobre cortes de pecíolo del fruto y de hojas	80
Figura 43	Patrones de dsRNA del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV)	82
Figura 44	Secuencias de aminoácidos deducidas de nucleótidos	85
Figura 45	Técnica de inmunopresión (IMI).	87
Figura 46	Diferentes grados de infección en impresiones de tejido infectado por virus (PVY, PVX, PLRV, PVS)	88
Figura 47	Placa de ELISA positiva para virus	89
Figura 48	Patrones de dsRNA de aislados de PYVV de Cundinamarca	92
Figura 49	Detección del gen de la proteína de la cápside del PYVV por RT-PCR en un solo tubo	99
Figura 50	Amplificación de la proteína de la cápside del Virus del Mosaico Medio del Ñame	104
Figura 51	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica –RFLPs–	105

Índice de Tablas

Tabla 1.	Algunas familias virales que tienen la capacidad de infectar organismos de dos o más reinos.	24
Tabla 2.	Algunas especies de insectos que transmiten virus de la papa	31
Tabla 3.	Tipo de transmisión en algunos virus que afectan al cultivo de papa.	34
Tabla 4.	Principales abreviaturas utilizadas en la descripción de síntomas virales	41
Tabla 5.	Virus que afectan al cultivo de papa	49
Tabla 6.	Características de los virus PLRV y PVY	62

Introducción

Los departamentos colombianos con mayor producción de papa (*Solanum* spp.) son, en orden descendente de importancia: Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Antioquia, Cauca, Caldas, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Putumayo. Los cultivos se encuentran sembrados desde los 1.500 a los 4.000 metros de altitud, en un área menor a las 185.000 hectáreas. La papa es el sustento de aproximadamente 90.000 familias colombianas, con la generación de 20 millones de jornales al año, representados en mano de obra no calificada. De otra parte, es un producto muy apetecido en la canasta familiar de todos los colombianos. Las especies de mayor consumo en el país son *Solanum tuberosum* subespecie *andigena*, cuya producción para consumo en fresco e industria incluye variedades como Parda Pastusa, Diacol Capiro, ICA Nariño, entre otras. De otra parte, la especie *Solanum phureja* (papa criolla o yema de huevo) representa aproximadamente el 5% del total cultivado en el país. Se estima un consumo anual per capita aparente de papa de 62 Kg. (Fedepapa, año 2004, Portafolio 27-04-05).

Estudios realizados en diferentes países y también los estimativos para Colombia sugieren que la producción y el rendimiento de *S. phureja* y de las variedades de *S. tuberosum*, pueden disminuirse hasta en un 65% por las enfermedades y plagas que afectan al cultivo (Salazar, 1998); sin embargo, hasta el momento, no se han realizado estudios precisos para confirmar estas estadísticas. Los virus son los patógenos con una gran repercusión en esta disminución,

después de los hongos y de las bacterias, pues causan degeneramiento del tubérculo-semilla, y la infección se puede perpetuar por las prácticas culturales de reproducción vegetativa. Los virus pueden encontrarse solos o en sinergismo, incrementando los riesgos fitosanitarios para el cultivo. Cabe mencionar algunos de los virus más importantes para el cultivo como el Virus del Amarillamiento de Venas de la hoja de papa (*Potato yellow vein virus*, (PYVV), *Crinivirus*, el Virus de Enrollamiento de la Hoja de la papa (*Potato leafroll virus*, (PLRV) *Luteovirus / Polerovirus*, y de los virus Y y X de la papa (*Potato virus Y*, (PVY), *Potyvirus*; *Potato virus X*, (PVX), *Potexvirus* y *Potato virus S*, (PVS), *Carlavirus*; el Virus A de la papa (*Potato virus A*, (PVA), *Potyvirus*, que pueden producir pérdidas entre el 55% y el 61%. El PVY o el PVX solos no ocasionan pérdidas significativas, de otra parte, el PYVV puede producir pérdidas hasta del 60%, reduciendo en número y tamaño la producción de tubérculos (Alba, 1943; Salazar, 1995). Otros virus cuarentenarios, como el virus «Mot Top» de la papa (*Potato mop-top virus*, (PMTV), *Furovirus*, también requieren atención.

Es importante tener en cuenta que cualquier cultivo comercial u ornamental debe disponer de semillas de buena calidad, libres de patógenos y, por lo tanto, certificadas, semillas que permitan contar desde un principio con una base adecuada para incrementar los rendimientos de la producción, controlando adicionalmente la presencia y dispersión de virus a través de los vectores naturales. Sin embargo, dentro de la certificación, especialmente para la categoría CERTIFICADA, los requisitos específicos mínimos permiten la presencia de algunos virus, caso papa Resolución ICA No. 2501 de 2.003. De otra parte, los trabajos que apunten hacia la consecución de variedades de papa, resistentes y/o tolerantes a uno o más patógenos, son imprescindibles.

Los esfuerzos en todos estos campos de investigación se deben aunar para propender por cultivos de papa de alta calidad con mejores rendimientos, que mejoren la sostenibilidad de las familias productoras y el bienestar del conjunto de la sociedad colombiana.

El presente Manual pretende ser, desde la óptica de la academia, un aporte a la cadena de competitividad de la papa en Colombia, plasmando conocimientos actuales sobre algunos virus relevantes para el cultivo de papa, enmarcado sintéticamente dentro del

contexto de la virología vegetal. Son muchos los investigadores que en el mundo (CIP y otras instituciones) y en Colombia, enriquecen seriamente el estudio de la virología, particularmente en papa. Por tanto, no se pretende reemplazarlos, sino más bien apoyarlos desde intereses particulares en la difícil tarea del diagnóstico y caracterización de los fitovirus con el objetivo de alcanzar estados fitosanitarios más competitivos para nuestros cultivos.

CAPÍTULO I

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LOS FITOVIRUS

Definición de virus

Los virus que infectan a las plantas se pueden definir como partículas nucleoproteínas compuestas por genomas de ácidos nucleicos de tipo ARN o ADN, protegidos por una o varias proteínas de cápside (viriones), que requieren infectar a la célula vegetal para utilizar la maquinaria metabólica y ribosomas de la misma y así lograr la replicación viral. La infección viral enferma a la planta causando alteraciones funcionales y morfológicas con disminución del vigor y expresión de síntomas diferentes como clorosis, necrosis etc.. según la especie viral, el huésped y el órgano afectado. Los virus vegetales tienen la capacidad de infectar a una amplia gama de plantas hospederas ya sean comerciales, ornamentales o malezas.

Al replicarse, los virus conforman linajes en los cuales se puede seguir una historia evolutiva propia. Los virus vegetales no infectan un solo organismo sino que tienen la capacidad de infectar una amplia gama de plantas hospederas.

Taxonomía

Aunque diferentes criterios como enfermedad, síntomas, antigenicidad (respuesta a anticuerpos), tipo de ácido nucleico, perfiles proteicos, rango de huéspedes, vectores, etc. son importantes para precisar la identificación de un virus, tres criterios son los más relevantes y suficientes en la mayoría de los casos para permitir la identificación viral hasta familia o género.

Un sistema universal para la clasificación de los virus fue establecido por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus

(ICTV) desde 1966. El sistema hace uso de una serie de rangos o agrupaciones de taxones, como se presenta en el ejemplo siguiente:

Orden (-virales) Es el taxón reconocido de jerarquía más alta.

Familia (-viridae)

Subfamilia (-virinae)

Género (-virus)

Especie (ejemplo: Virus del mosaico del tabaco (TMV))

Según el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV), los criterios taxonómicos más importantes son:

- El organismo hospedero
- La morfología de la partícula
- El tipo de genoma viral

Los hospederos de los virus incluyen todas las clases de organismos celulares descritos hasta el momento:

Procaríotes: archaea, bacteria, micoplasma y espiroplasma

Eucariotes: algae, plantas, protozoarios, hongos, invertebrados y vertebrados

Algunas familias virales

En casos particulares, algunas familias virales pueden infectar dos reinos de organismos, como se observa en la Tabla 1.

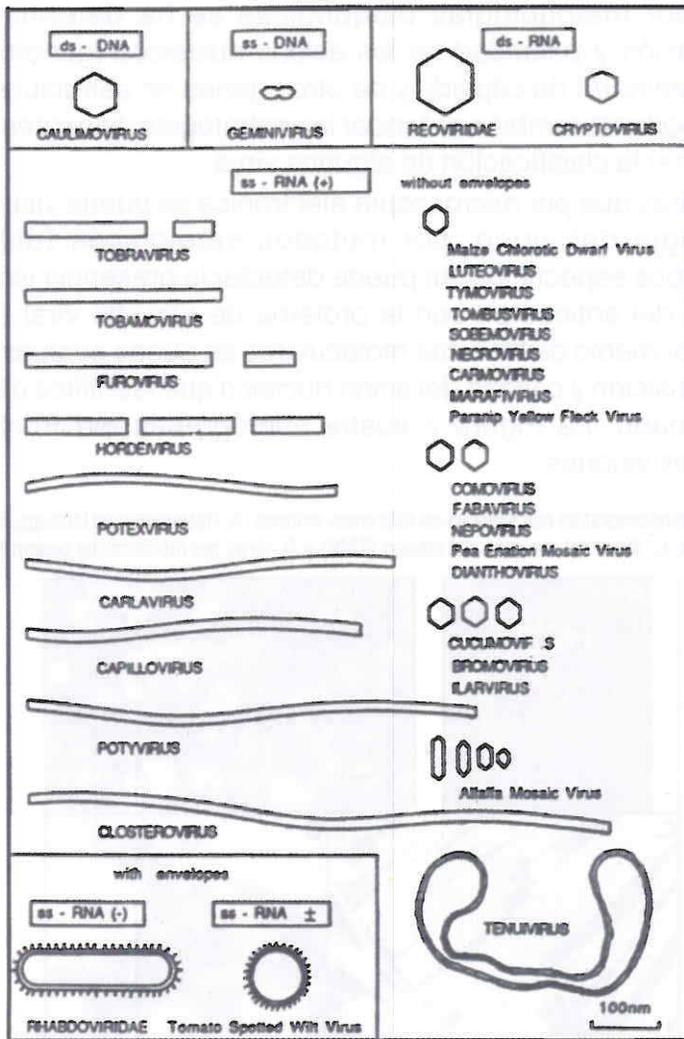
Tabla 1. Algunas familias virales que tienen la capacidad de infectar organismos de dos o más reinos

Familia viral	Reinos que infecta
Bunyaviridae	Animales y plantas
Partitiviridae	Plantas y hongos
Reoviridae	Animales y plantas
Rhabdoviridae	Animales y plantas
Phycodnaviridae	Protozoarios y plantas
Picornaviridae	Plantas y animales
Totiviridae	Protozoarios/hongos e insectos - tentativo

Tomado de: Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV)

La clasificación de las familias de virus que infectan a las plantas se resume en la Figura 1. En esta clasificación se han tenido en cuenta varios aspectos como: genoma viral (RNA o DNA), complejidad del mismo (monopartitas o multipartitas), conformado por una cadena (ss) o doble cadena (ds), lineales o circulares, lineales o circulares, la forma de la partícula viral (isométricos, baciliformes, filamentosos, etc.) y presencia o ausencia de envolturas.

Figura 1. Clasificación de los virus que infectan plantas

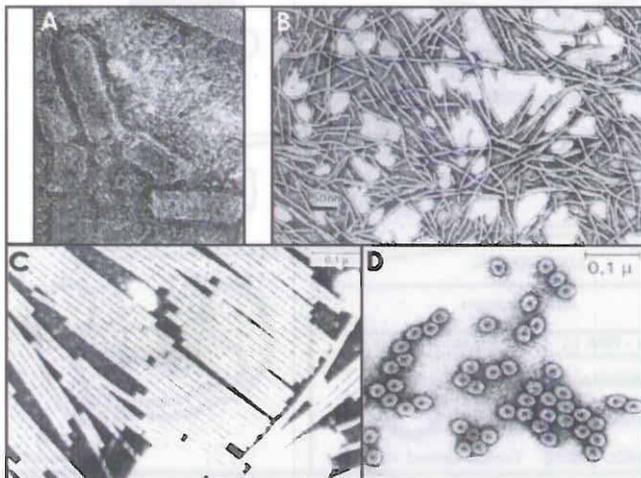


Tomado de: Matthews, 1990.

El microscopio electrónico ha sido un instrumento aliado de la virología al permitir observar y distinguir morfológicamente las partículas virales que infectan vegetales, las cuales no miden más de 2.000 micras de largo, como en el caso del Virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, (CTV), *Closterovirus*), que es el fitovirus más largo reportado hasta el presente. La purificación de los virus por ultracentrifugación a partir de extractos de plantas infectadas ha permitido observar toda una gama de partículas virales con arquetipos diferentes, tanto en forma como en longitud. De otra parte, por metodologías bioquímicas se ha determinado la composición y polaridad de los ácidos nucleicos (genoma) y de la(s) proteína(s) de cápside y de otros genes no estructurales. Ha sido importante también entender las estrategias de expresión viral para afinar la clasificación de algunos virus.

Mientras que por microscopía electrónica se puede visualizar la morfología del virión, por métodos serológicos (utilizando anticuerpos específicos) se puede detectar la presencia viral por la afinidad del anticuerpo con la proteína de cápside viral. De otra parte, por medio de técnicas moleculares se puede evaluar e inferir la composición y calidad del ácido nucleico que identifica a un virus determinado. La Figura 2 ilustra microfotografías electrónicas de diferentes viriones.

Figura 2. Microfotografías electrónicas de diferentes viriones. A. Rabdovirus en lechuga, B. Potyvirus Y de la papa, C. Virus del mosaico del tabaco (TMV) y D. Virus del mosaico del pepino (CMV)

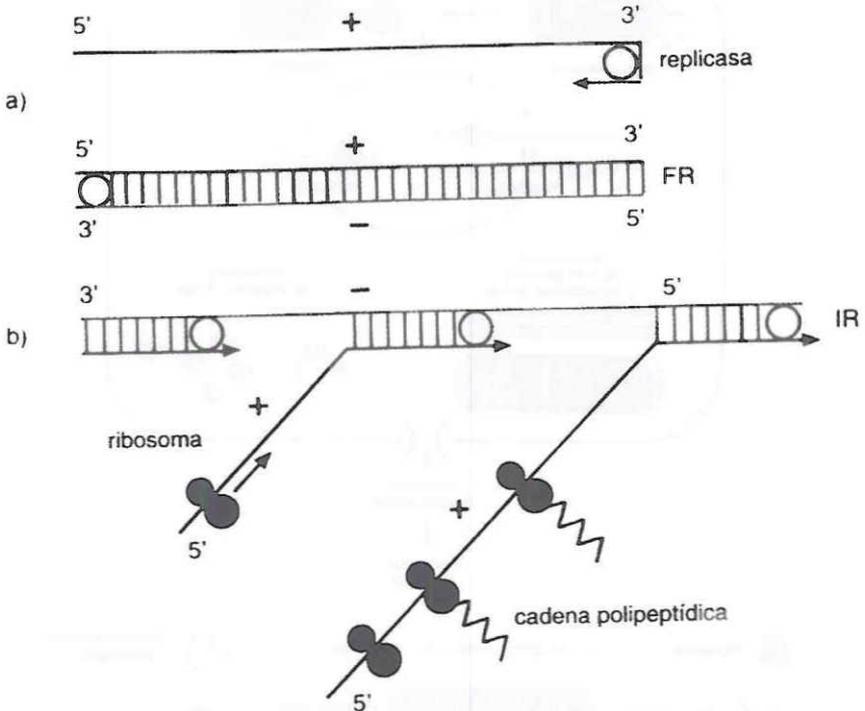


Tomado de Albouy y Devergne, cliché 2000.

Aspectos generales de la replicación de los virus de RNA

La mayoría de virus que infectan plantas y particularmente al cultivo de la papa están constituidos por un genoma de RNA de una sola hebra (cadena sencilla) y de sentido positivo (+) ($3' \rightarrow 5'$). Esto significa que poseen la capacidad de actuar como un RNA mensajero para la traducción directa de proteínas requeridas para la replicación, encapsidación y transporte viral. La Figura 3 ilustra la replicación viral a partir de un RNA genómico (gRNA) con orientación $3' \rightarrow 5'$, de cadena sencilla. En la planta infectada se pueden detectar diferentes tipos o formas de RNA viral, ya sea la forma replicativa completa de doble banda (FR), hebras sencillas de RNA genómico y formas replicativas intermedias (IR) de diferentes tamaños, con segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), dependiendo de la fase de replicación del genoma viral.

Figura 3. Replicación del RNA genómico. Formación de los RNA de interferencia

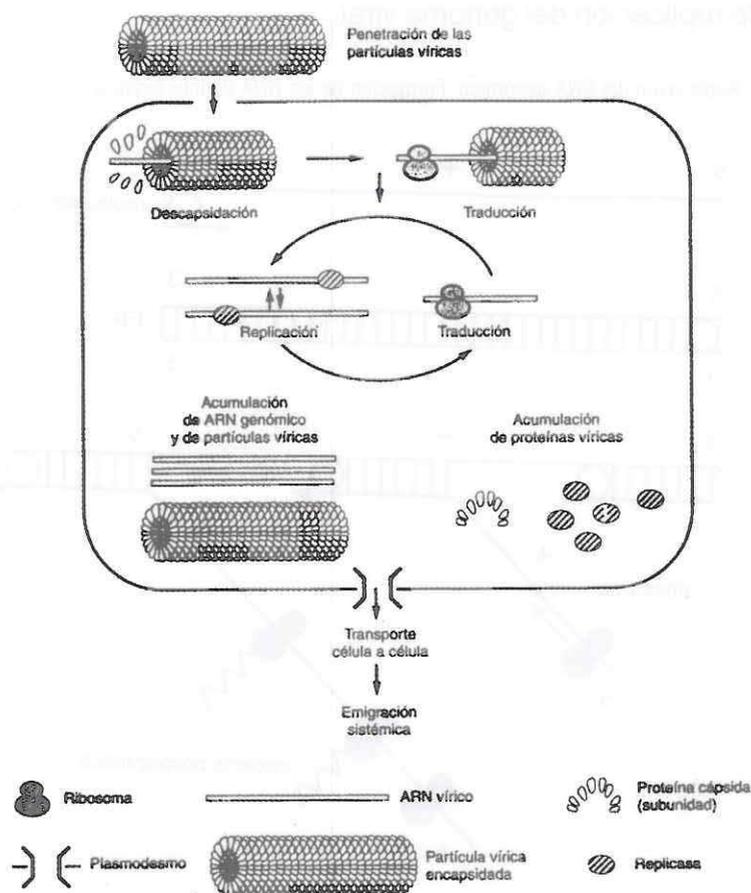


Tomado de: Albouy y Devergne, 2000.

Además, dentro de la planta hospedera se establecen una serie de procesos fisiológicos y morfológicos complejos para permitir la replicación viral y completar su ciclo de vida. Un esquema del modelo de ciclo viral de un *Potyviridae* con genoma de RNA (tipo PVY) se ilustra a continuación. Algunos virus se replican en el citoplasma y otros lo hacen en el núcleo. De otra parte, también hay virus cuyo ácido nucleico es el DNA de doble cadena y circulares que utilizan otros mecanismos para la replicación algo más complejos como el círculo rodante, y no se profundizan en este manual.

Una vez ha entrado en la célula del hospedero, la partícula viral o virión (ácido nucleico recubierto de proteína de la cápside) requiere completar su ciclo vital. En la Figura 4 se presenta un resumen del

Figura 4. Diagrama del ciclo de un virus de RNA



Tomado de: Sylvie Dinant, In: Albouy y Devergne, 1999.

ciclo viral: en primer lugar se desnuda (perdiendo la cápside de proteína) y actúa como RNA mensajero para la traducción de proteínas virales para la replicación, para la conformación de una nueva cápside y para el transporte viral. Durante todo este proceso el virus utiliza la maquinaria metabólica de las células vegetales, como los ribosomas y proteínas propias de la planta. La replicación se puede realizar en el citoplasma o en el núcleo dependiendo del grupo viral. Con la infección viral se generan estructuras proteicas particulares codificadas por el virus, denominadas inclusiones virales, las cuales se depositan en el citoplasma o dentro del núcleo. También en algunas inclusiones se pueden detectar cápsides o partículas virales. Las inclusiones pueden tener formas específicas o amorfas, por ejemplo, los Potyvirus generan inclusiones en forma de aspas (pinwheels). Las inclusiones citoplasmáticas alteran la morfología de la célula vegetal.

CAPÍTULO 2

TRANSMISIÓN

Los vectores

Los virus se pueden transmitir por diferentes medios: (a) semillas contaminadas, (b) por injerto de un órgano o tejido infectado, (c) por inóculo de segmentos de material vegetal, de savia o de ácidos nucleicos, (d) mecánicamente a través de herramientas, (e) por la polinización natural (Jones, 1993) y (f) por hongos, nematodos, pero principalmente a través de diferentes especies de insectos. Es muy posible que algunos de los virus de plantas transmitidos por insectos se hayan originado en ellos (Salazar, 1998). El orden *Homoptera*, que incluye áfidos (*Aphidae*) y saltahojas (*Cicadelidae*) contienen la mayor cantidad de insectos vectores. También hay insectos de los órdenes *Hemiptera* (chinchas), *Thysanoptera* (trips), *Coleoptera* (cucarrones o escarabajos) y *Orthoptera* (saltamontes). Entre los insectos de mayor importancia se pueden mencionar diferentes especies de áfidos: *Aphis nasturtii*, *Rhopalosiphum padi*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis gossypii*, *Toxoptera aurantii* y *Toxoptera citricidus*. *Myzus persicae* que es la especie de áfido más frecuente y eficiente en la transmisión de los virus de papa, como el PVY y el PLRV, que se transmiten por áfidos. La diseminación se realiza principalmente por las formas aladas de los áfidos implicados (Agrios, 1998). La Mosca Blanca (*Trialeurodes*

vaporariorum) es importante en la transmisión y dispersión del PVYV (Salazar *et al.*, 2002). La Tabla 2 resume los diferentes tipos de insectos transmisores de virus de papa.

Tabla 2. Algunas especies de insectos que transmiten virus de la papa

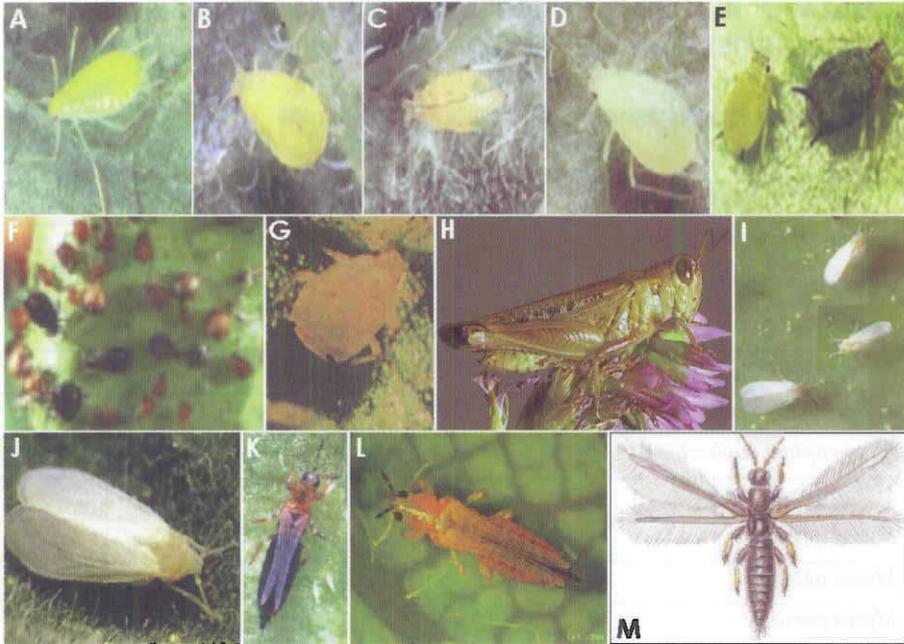
Especie	PLRV	PVY	PVS	PYVV
<i>Acyrtosiphon primulae</i>		x		
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	x	x	x	
<i>Aphis fabae</i>	x	x		
<i>Aphis nasturtii</i>	x	x	x	
<i>Aulacortum solani</i>	x	x		
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	x	x		
<i>Myzus oscaronicus</i>	x			
<i>Myzus humulis</i>	x			
<i>Myzus amatus</i>	x			
<i>Myzus persicae</i>	x	x	x	
<i>Neomuzus circumflexus</i>	x	x		
<i>Phorodon humuli</i>		x		
<i>Rhopalosiphum padi</i>		x		
<i>Staphyleae tulipaellus</i>	x	x		
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>				x

Tomado de: Salazar, 1996.

No se debe descartar el alto riesgo de dispersión viral propiciado por el humano, por el transporte inadecuado de semilla contaminada, por la práctica cultural de reproducción vegetativa a partir de semilla no certificada (como se mencionó con anterioridad los requisitos específicos mínimos permiten la presencia de algunos virus, caso papa Resolución ICA No. 2501 de 2.003) y por el transporte ilegal de material vegetal contaminado a través de las fronteras. La Figura 5 ilustra algunos insectos vectores de virus de la papa.

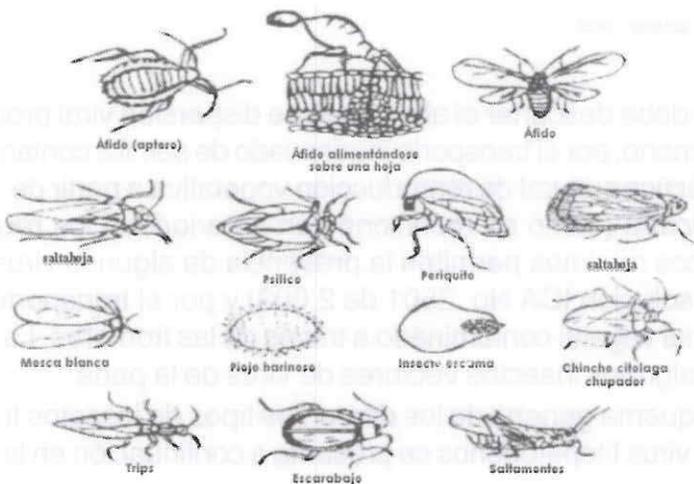
Un esquema general de los diferentes tipos de insectos transmisores de virus fitopatógenos se presenta a continuación en la Figura 6.

Figura 5. Insectos vectores de virus de la papa



A. *Macrosiphum euphorbiae*, B. *Aphis nasturii*, C. *Aulacorthum solani*, D. *Myzus persicae* y E. *Aphis gossypii* (Tomado de www.cs.ualberta.ca/~games/aphid). F. *Toxoptera citricidus* (áfido marrón), G. *Aphis gossypii* (Tomado de Guzmán, 1998). H. Saltamontes (Tomado de [www.ent.iastate.edu/~lady/ asianladybsa.jpg](http://www.ent.iastate.edu/~lady/asianladybsa.jpg)). I. y J. *Thrips* (Tomado de [www.insur.es/image/ melon/moscabianca.jpg](http://www.insur.es/image/melon/moscabianca.jpg)). K., L. y M. Trips (Tomado de thrips.woodypest.ifas.ufl.edu/190.htm.thrips INRA)

Figura 6. Esquema general de los diferentes tipos de insectos transmisores de virus fitopatógenos



Tomado de: Agrios, 1998.

Estrategias de transmisión por vector

Para que un fitovirus sea transmitido por un insecto o áfido vector, se requiere que éste produzca una herida en la epidermis de la planta al introducir sus partes bucales perforadoras y succionadoras (estilete) con el objeto de nutrirse con la savia de la planta, con lo cual el virus ingresa en el floema de la misma. Se han determinado tres tipos principales de transmisión viral:

- **Persistente:** el insecto es virulífero y no pierde la capacidad de transmisión viral; el virus circula y se puede replicar en el cuerpo del áfido. Para algunos virus, entre la fase de adquisición y la de transmisión, hay un período de latencia que puede durar uno o varios días.
- **Semipersistente:** el insecto requiere de un periodo corto para adquirir el virus (5 a 60 minutos) y, así mismo, requiere entre 24 a 48 h para transferirlo. En este momento el áfido pierde la capacidad de transmisión viral y por lo tanto debe retornar a alimentarse de una planta infectada.
- **No persistente:** insectos que llevan los virus en el estilete y los depositan en la planta, con la primera alimentación. Por lo tanto, debe retornar de inmediato a alimentarse de la planta infectada para poder continuar con la transmisión viral. Para el caso de las chicharritas, hay un período de incubación de una a dos semanas entre el momento de adquisición viral y el momento en que puede transmitirlo por primera vez. Estos virus son circulativos y algunos de ellos se replican en el vector (Matthews, 1991).

De otra parte, se sabe que hay una afinidad entre la presencia de determinados aminoácidos que conforman la proteína de la cápside viral y la capacidad del áfido para seleccionar un virus determinado para la transmisión. Por ejemplo, en el género *Potyvirus* una secuencia de tres aminoácidos de la proteína de la cápside (la caja DAG), localizada cerca de la región N-terminal de la cubierta proteica, está presente en los virus que han perdido la capacidad de transmisión por áfidos. Se ha determinado que si ocurre una mutación que comprometa dicha caja DAG, entonces el áfido no es capaz de transmitir ese virus en particular. También algunas proteínas no estructurales como el «componente ayudador» o «helper» participan en la transmisión viral (Granoff y Webster, 1999).

De igual forma, en el CTV que infecta a los cítricos se ha determinado que las proteínas menor y mayor de la cápside (o secuencias de las mismas) y proteínas no estructurales (HPS70) juegan un papel importante en la transmisión y el transporte viral (Karasev *et al.*, 1992; Agronovsky *et al.*, 1998; Alzhanova *et al.*, 2000). De esta manera se puede entender cómo una simple mutación en un virus puede conllevar a la pérdida de la capacidad de dispersión del mismo por los vectores. Solamente se mantendrá la posibilidad de dispersión viral a través de la reproducción vegetativa de la planta hospedera. Un ejemplo de esta condición se ha demostrado para la variante c del PVY (Bawden y Kassanis, 1947). En la Tabla 3 se ilustran algunos tipos de transmisión para virus que afectan a la papa.

Tabla 3. Tipo de transmisión en algunos virus que afectan al cultivo de papa

Tipo de transmisión	VIRUS				
	PLRV	PVY	PVS	PVX	PYVV
Persistente (Circulativo)	x				
Semipersistente					x
No persistente		x	x		
Mecánica				x	

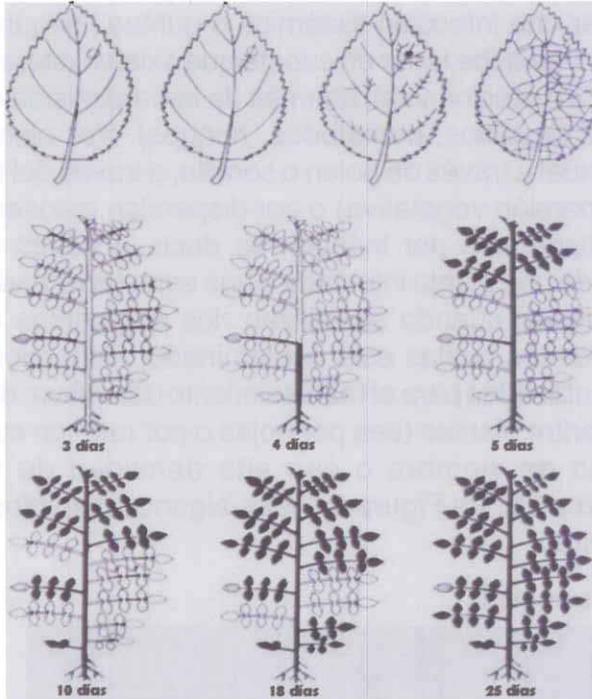
De otra parte, las arvenses o malezas juegan un papel importante como reservorios virales y por lo tanto son susceptibles de transmisión por vectores comunes. Por ejemplo, la presencia de *Potyvirus* se ha detectado por medio de anticuerpos en malezas asociadas al cultivo del ñame (Guzmán *et al.*, 2001). También en papa las malezas pueden ser reservorios de virus. Es una razón adicional para mantener limpios los cultivos; se debe erradicar las malezas para evitar la circulación, renovación y reserva de virus peligrosos para los cultivos.

Progresión de la infección viral

El insecto vector requiere causar una herida en la epidermis/dermis de la hoja de la planta para alimentarse con la savia de la misma y así depositar el virus en un punto localizado. Posteriormente, el virus se propaga por la hoja y su rama correspondiente utilizando

proteínas propias y algunas de la planta; de esta manera descien-
de por los vasos conductores (floema) hasta la raíz, para luego
ascender por el xilema hasta las ramas y hojas más apicales
continuando, si es el caso, con una invasión sistémica de la planta
hospedera. Un ejemplo de la progresión de la distribución del virus
en la planta hospedera se presenta en la Figura 7.

Figura 7. Progresión de la distribución del virus en la planta hospedera



Adaptado de Samuel, G (1934) in: Albouy y Devergne, 2000.

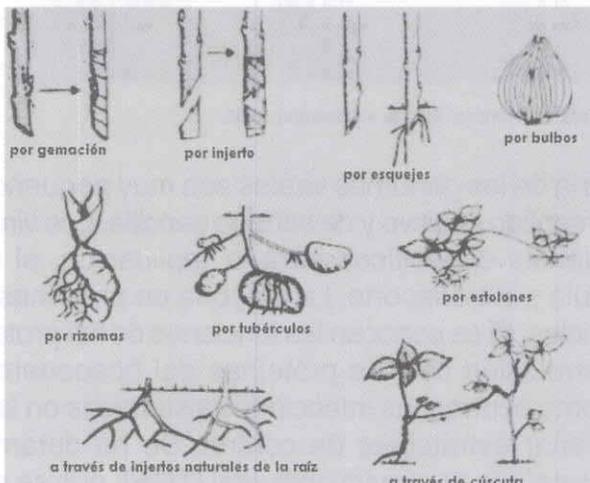
La mayoría de los genomas virales son muy pequeños (entre 4 y 15 kDa), de sentido positivo y de cadena sencilla. Los virus requieren de componentes específicos para la replicación, el movimiento célula a célula y el transporte. La mayoría de proteínas virales son multifuncionales. Si se conocen las funciones de las proteínas virales y de la interrelación con las proteínas del hospedero, se puede entender como ocurren las infecciones sistémicas en la planta y se pueden diseñar estrategias de control. Se ha determinado una tripleta de proteínas de movimiento viral (TGB), que se expresan en la mayoría de virus, incluido el PMTV. Las proteínas TGB actúan

integralmente para transportar el RNA viral desde la primera célula infectada hasta las células que rodean el tejido vascular. Los detalles moleculares del proceso no se conocen bien.

Diferentes tipos de infección viral

Dentro de una misma planta hospedera, los fitovirus se pueden dispersar de célula a célula, invadiendo tejidos y órganos, para lo cual utilizan proteínas de movimiento viral y proteínas de la planta hasta alcanzar una infección sistémica o puntual, según el caso. Para lo anterior se debe tener en cuenta que existen diferentes vías de dispersión e infección viral, además de la transmisión debida al vector natural (insectos, nemátodos, hongos). Por ejemplo, por dispersión sexual a través de polen o semilla, a través del tubérculo o rizoma (dispersión vegetativa) o por dispersión mecánica. También existe dispersión por inóculo, es decir, a través de savia contaminada de una planta infectada a una sana (invernadero); dispersión por injerto cuando se utilizan dos segmentos de tejido vegetal, uno de los cuales está contaminado; dispersión por las herramientas utilizadas para el mantenimiento del cultivo; dispersión por contacto entre plantas (sea por hojas o por raíz) en cultivos de alta densidad de siembra o con alta densidad de malezas reservoriaras de virus. La Figura 8 ilustra algunos ejemplos de vías de infección viral.

Figura 8. Vías de infección viral



Tomado de Agrios, 1998.

CAPÍTULO 3

SÍNTOMAS

Generalidades sobre enfermedad y síntomas

Al período de tiempo entre la entrada de un virus a la planta hospedera y la aparición del síntoma se le denomina *incubación*. Después de entrar a la célula, los virus se replican, se trasladan a otras células y se acumulan en diferentes tejidos dependiendo de su afinidad trópica. Para alcanzar este objetivo, los virus utilizan procesos muy complejos en los cuales se requieren proteínas tanto propias codificadas por el virus, como del hospedero, lo que conlleva a la alteración del metabolismo general de la planta. El síntoma característico que induce un virus en su huésped principal permite entonces utilizarlo como uno de los criterios para la identificación viral. La invasión viral conlleva alteraciones morfológicas y funcionales de los organelos de la planta, como mitocondrias, aparato de Golgi, liposomas, membranas celulares, distribución de citoesqueleto, etc., causando la expresión de diferentes tipos de síntomas puntuales (manchas cloróticas) o más complejos y sistémicos, en los que se afecta no solo una célula o un conjunto de ellas, sino todo un órgano o la planta en su totalidad. En casos extremos, la expresión de diferentes tipos de síntomas como clorosis, enrollamiento de hojas, manchas púrpuras, aclaración de venas, etc., constituye un cuadro complejo o *síndrome*, causado en general por cepas o razas virales de tipo severo. Por el contrario,

es muy frecuente que las razas suaves expresen pocos síntomas, los cuales no interfieren con la producción del cultivo. También se pueden encontrar razas virales asintomáticas, es decir, aquellas que no producen síntomas en alguno o varios de los hospederos principales. Por ejemplo, en condiciones de invernadero, este último tipo de cepas pueden ser asintomáticas en una planta indicadora pero no en otra (Bové *et al.*, 1988; Guzmán, 1998).

Debido a este último fenómeno se debe pensar también en la capacidad de respuesta a la infección viral de una planta determinada. En este sentido, las consideraciones sobre resistencia, tolerancia y susceptibilidad del hospedero son relevantes. Una definición bastante acertada de estos términos, desde el punto de vista de la infección y replicación viral (y no desde el punto de vista de la respuesta inmune de la planta), es la planteada por Matthews (1991), quien define a una planta susceptible como aquella que permite, sin trabas, la replicación viral y es totalmente permisiva para la manifestación de los síntomas; de otra parte, una planta tolerante es entonces aquella que permite la replicación viral (aún con títulos de absorbancia altos) pero en la cual no se expresan síntomas y, por lo tanto, no se alteran los rendimientos de la producción. Una planta resistente es, en contraste, aquella que sí establece fronteras claras y limitantes para la replicación viral o de variantes virales, y por lo tanto no hay repercusiones sintomáticas; de allí la importancia de tener en cuenta estas consideraciones para el adecuado manejo fitosanitario y de fitomejoramiento. Por ejemplo, una planta tolerante (que no expresa síntomas) puede ser reservorio de cepas muy virulentas y, si además se encuentra en condiciones climáticas adecuadas para la replicación viral y es apetecida por un vector eficiente, la dispersión de esas cepas o razas severas será nefasta para las plantas y cultivos circundantes y para los rendimientos de la producción en general. El caso de árboles ornamentales de cítricos es un buen ejemplo de esta condición (Guzmán *et al.*, 2002).

Varios factores se requieren para que se manifieste una expresión sintomática viral específica, entre los cuales están: (a) el tipo de cepa o raza viral, (b) la presencia de otros grupos virales que por asociación aumenten o disminuyan la expresividad sintomática en el huésped, (c) la especie y variedad de la planta hospedera, en

donde se debe considerar la respuesta de resistencia, de susceptibilidad o de tolerancia, (d) la presencia y eficiencia de vectores naturales (diferentes especies de insectos o nematodos), pero también el humano y sus prácticas culturales, (e) el clima y la estratificación geográfica, entre otros posibles.

Por ejemplo, el efecto de la temperatura en el desarrollo de la papa y de la infección viral, de la virulencia y la expresión de síntomas, es determinante. La mayoría de virus tienen requerimientos estrictos de temperatura para la infección, la acumulación en el tejido de la planta y la producción de síntomas. Los mosaicos causados por PVX a menudo no se detectan a temperaturas superiores a 28°C o inferiores a 12°C (Salazar *et al.*, 1985). Es bien conocido que el efecto de la temperatura alta o baja sobre la multiplicación y acumulación viral es usado como método para liberar a plantas de estos agentes (Hollines, 1965; Gibson, 1977). La termoterapia se constituye entonces en un buen aliado para el control viral de plantas madres utilizadas para semilla y certificación.

Las anteriores variables y el conjunto de ellas, repercuten directa o indirectamente en la expresión de un síntoma determinado y de su intensidad en la planta hospedera. Es así como los asentamientos virales en las células vegetales, conocidas como inclusiones citoplasmáticas, se concentran dentro del citoplasma o núcleo de la célula tomando diferentes formas típicas del grupo viral, abarcando diferentes extensiones. Los cúmulos virales invaden espacios de la planta tan importantes como las células de parénquima asociadas a vasos conductores del floema, alteran la morfología y función mitocondrial por la formación de vacuolas de gran tamaño y modifican la estructura de los cloroplastos y otros organelos. Todos estos cambios morfológicos de gran importancia perturban el complejo proceso metabólico y nutricional de la planta.

Para el caso específico de la papa, los síntomas de clorosis en las hojas implican alteración morfológica y funcional de las mitocondrias y cloroplastos, con reducción del metabolismo respiratorio y energético, lo que genera variaciones de forma, tamaño y número de tubérculos en la planta, con reducción del rendimiento y de la producción. En términos generales, los síntomas más severos están correlacionados a rendimientos más bajos en

papa. Sin embargo, la correlación entre enfermedad y síntoma no es absoluta (Salazar, 1995).

De otra parte, no hay consenso sobre la definición de enfermedad, pero se puede realizar alguna aproximación al respecto: generalmente, la infección viral se manifiesta sobre la planta enferma por modificaciones de su aspecto o de su desarrollo, que la distinguen de la planta sana. El conjunto de manifestaciones que traducen las diversas perturbaciones fisiológicas sufridas por la planta huésped como consecuencia de su infección constituye un síndrome cuyos componentes son los síntomas (Albouy y Devergne, 2000). El término de enfermedad puede derivarse directamente de la identidad sintomática del virus que la produce, como en el caso de la enfermedad de amarillamiento de venas de las hojas de la papa producida por el PYVV, aunque no siempre hay concordancia puesto que puede haber amarillamiento o clorosis por deficiencia de micronutrientes. De otra parte, el PVY no causa la enfermedad Y de la papa sino que se expresa con necrosis de nervaduras, entre otros síntomas. En otras palabras, no hay una correspondencia exacta entre la definición de enfermedad y la de síntomas.

Se pueden distinguir dos tipos de síntomas: los externos, que son los más perceptibles (se pueden detectar por simple inspección visual), y los internos que requieren de exámenes especiales con microscopio de luz o electrónico, o funcionales. En virología, los síntomas externos son la consecuencia de desviaciones del metabolismo ligadas a la multiplicación viral (Albouy y Devergne, 2000).

Algunos síntomas

Significado de abreviaturas virales

En la Tabla 4, a manera de ilustración y con un sentido práctico, se presentan las abreviaturas más importantes y sus traducciones sobre diferentes síntomas producidos por los virus. Según el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus, los nombres adoptados para los fitovirus recuerdan los síntomas observados en la planta en donde se han descrito inicialmente.

A continuación se precisan algunos términos que pueden ser importantes para entender la virosis que ataca al cultivo de la papa.

La presentación de los síntomas está basada en los trabajos de Gibson (1977), Salazar (1989), Agrios (1998), Albouy y Devergne (2000) y en la experiencia personal.

Síntomas

Mosaico

Significa la aparición de zonas foliares diferentemente coloreadas, o alteraciones cromáticas sobre hojas debidas a

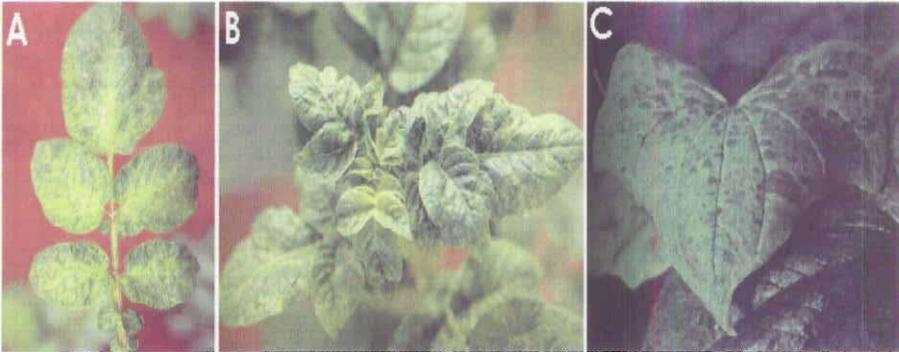
Tabla 4. Principales abreviaturas utilizadas en la descripción de síntomas virales

Sigla en inglés	Palabra en inglés	Traducción al español
AS	Asteroid	En estrella, estrellado
Br	Browning, brown	Ennegrecimiento, oscuro, pardo
Crk	Crinkling, crinckle	Arrugamiento, arruga
C	Chlorosis	Clorosis, aclaramiento
D	Deformation	Deformación
Dt	Dotting, dot	Moteado (manchas puntiformes)
Dw	Draifing	Enanismo
Ed	Edge	En el borde de la hoja
En	Enations	Enaciones
Etch	Etching	Grabado
F	Flower	Sobre la flor
FB	Flower breaking	Variegación de la flor
Lat	Latent infection (symptomless)	Infección latente (sin síntomas)
LC, LR	Leaf curling, rolling	Encurbamiento, enrollamiento del foliolo (hoja)
LP	Patem line	Dibujo en arabesco
M	Mosaic	Mosaico
Mo	Mottle	Moteado
N	Necrosis, necrotic	Necrosis, necrótico
OK	Oak leaf patten	Dibujo en forma de hoja de roble
R (Sp)	Ring spot	Manchas en anillos anulares
Rd	Reddening, red	Eritrosis, rojo
Rec	Recovery	Restablecimiento
Sk	Streaking, striping	Abigarrado, estriado
Sp	Spotting, spot	Manchado, manchas
St	Stunting	Debilitamiento
TN	Top necrosis	Necrosis apical
V	Vein	De las nervaduras
VB, VM	Vein Banding (mosaic)	Mosaico de las nervaduras
VC	Vein clearing (clorosis)	Aclaración (clorosis) de las venas
VY	Vein yellowing	Amarillamiento de nervaduras
VN	Vein necrosis	Necrosis de las nervaduras
Y	Yellowing	Amarillez
YM	Yellow mosaic	Mosaico amarillo
W	wilt	Marchitez

Tomado de Albouy y Devergne, 2000.

deficiencia de pigmentos (clorofila y a veces xantofila), a la destrucción de dichos pigmentos o a la alteración de la estructura de los cloroplastos. Se afectan grupos de células delimitando zonas diversamente coloreadas que recuerdan un mosaico. Dentro de esta categoría se pueden presentar diferentes tipos de mosaico dependiendo de la distribución y coloración del pigmento, como consecuencia de desviaciones del metabolismo ligadas a la multiplicación viral (Albouy y Devergne, 2000). Así, las células deficientes se pueden localizar en islotes irregularmente repartidos en la superficie del limbo, los cuales presentan coloración verde claro, amarillo o completamente blanco por la ausencia total de pigmento. La Figura 9 ilustra diferentes síntomas de mosaico en hojas de la papa y en una hoja de ñame con síntoma de mosaico debido a la infección con el virus del mosaico del ñame (YMV) (tomado de Guzmán y Fontanilla, 2000).

Figura 9. Expresión del síntoma de mosaico



Tomado de: (www.redepapa.org/fotosredvirus.htm). A. Mosaicos PVX, pueden disminuir el rendimiento en más del 10%, según la variante del virus y el cultivar de papa. Se transmite por medio de tubérculos infectados y por contacto -no por áfidos- y usualmente causa un mosaico. (CIP, 1996). B. El virus Y (PVY) provoca el mosaico rugoso de las hojas; la planta se observa raquítica y tiene una menor producción (Lopes, 1997 - EMBRAPA). C. Para comparación, síntomas en hospederos de diferente especie: un ejemplo del síntoma de mosaico se observa en la hoja de ñame producido por otro fitovirus (Virus del mosaico del ñame, YMV).

Encrespamiento

Es evidente hacia los márgenes de las hojas, que muestran una apariencia ondulada. En papa se presenta un ejemplo en la Figura 10 producido por el virus PVY

Figura 10. Síntoma de encrespamiento por PVY

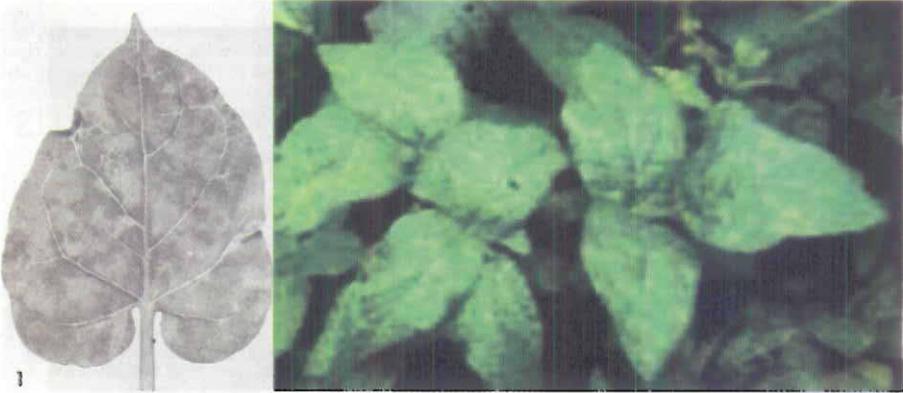


Tomado de: (www.planthealth.info).

Moteado

Las manchas son más pequeñas y más definidas que en el caso del mosaico (Figura 11) y también pueden tener cambios de color, en general pálido contra oscuro. Un ejemplo típico del síntoma de moteado se detecta en frijol producido por el virus (*Bean pod mottle virus*, (BPMV), *Comovirus*). También el Virus Moteado de la papa andina (*Potato andean mottle virus*, (APMoV), *Comovirus*), infecta a *Solanum tuberosum*, produciendo lesiones amarillas locales de parches o moteado suave o severo y alguna malformación en las hojas. Es sabido que este virus no se transmite por *Epitrix sp.*, aunque si se ha tenido éxito en la transmisión por inoculación, por injerto o por contacto entre plantas. No hay evidencia de transmisión por semilla.

Figura 11. Expresión del síntoma de moteado



1. En *Nicotina* spp., por inoculación de PVY (www.dpvweb.net); 2. síntoma de moteado en campo (www.planthealth.info/soyaphid/bpmv.jpg).

Necrosis

La muerte del tejido y su proceso oxidativo permiten distinguir cuatro tipos de manchas necróticas según la localización, ya sea apical, sistémica, de venas o de los tubérculos. En el síntoma se concentran las células muertas formando manchas, líneas, arcos o anillos. Un ejemplo de este síntoma en papa producido por el PLRV se muestra en la Figura 12.

Figura 12. Síntoma de necrosis en el tubérculo de papa



Tomado de: www.gnb.ca

Enrollamiento

La Figura 13 ilustra el enrollamiento severo y hacia arriba de los folíolos que tienen como eje la vena central. Es más severo hacia la punta del folíolo. Es típico síntoma producido por el PLRV,

Figura 13. Síntoma de enrollamiento en papa



La variedad Russett Burbank es muy susceptible al PLRV y muestra síntomas de necrosis interna. Foto cortesía de Cornell University, Ithaca, NY.

Amarillamiento de venas

Se presenta amarillamiento de las venas secundarias y de células asociadas, aunque las venas principales permanecen verdes, amarillamiento que va abarcando todo el folíolo, contrastando con un color más profundo en las venas como se ilustra en la Figura 14. El síntoma comienza en el ápice de los folíolos y se extiende a todas las hojas y ramas. La clorosis altera el funcionamiento de cloroplastos y otros organelos celulares con la consecuente reducción del tamaño del tubérculo y de la producción (síntoma producido por PYVV).

Figura 14. Síntoma de amarillamiento de venas en papa



Tomado de: APS, St Paul, US.

Enanismo

Las plantas emergen tardíamente y son más pequeñas que las plantas sanas. Algunas plantas inician su crecimiento normalmente pero éste se detiene repentinamente. Las alteraciones del metabolismo que se producen por la multiplicación de los virus y los diferentes desórdenes derivados suponen una disminución en el tamaño más o menos apreciable de las plantas y un cierto retraso en el desarrollo. Se pueden ver achaparradas, quedando enanas en los casos más severos. La Figura 15 ilustra el síntoma de enanismo, se observa en la infección con el Virus «mop-top» de la papa (Potato mop top *furovirus*, PMTV)

También en papa, la Figura 16A ilustra un ejemplo de enanismo producido por infección con el virus del enanismo amarillo de la papa (Potato yellow dwarf, *nucleorhabdovirus*, PYDN). Este virus causa también el síntoma de desquebrajamiento («craking») o ruptura de la piel del tubérculo (Figura 16B).

Figura 15. Enanismo debido a la infección con PMTV



Tomado de [www.potato-mot-top virus](http://www.potato-mot-top-virus)

Figura 16A. Enanismo por infección con PYDN



Enanismo por infección con *PYDN* (APS, St Paul, US). B. Síntoma de «cracking» de la piel del tubérculo (Cornell University).

CAPÍTULO 4

VIRUS EN PAPA

Grupos virales que infectan a la papa

El cultivo de la papa (*Solanum spp.*) con sus diferentes especies y variedades (2.800 variedades, FAO) es uno de los cultivos comerciales más altamente afectados por la infección viral, además de la de otros patógenos como bacterias y hongos. La Tabla 5, resume los grupos virales que infectan estos cultivos.

Cepas y variantes virales

Una cepa viral se podría definir como aquella en la cual los individuos y clones que la conforman presentan las mismas características biológicas (expresión de síntomas), bioquímicas, de transmisión y de rango de hospedero. En tanto que las variantes virales se derivan de las cepas y se podrían definir como aquellos individuos o clones que mantienen algunas características bioquímicas y biológicas de las cepas, pero no todas. Las estrategias moleculares de secuenciamiento de genes y la indexación biológica, entre otras, permiten evaluar la presencia de variantes virales dentro de un grupo o especie viral, partiendo de una misma muestra o aislado de la plarita (Gibson, 1977).

Casi todos los grupos y especies virales tienen una gama de razas o variantes, que se pueden manifestar sintomáticamente dentro de un rango, desde muy suaves hasta muy severas.

Tabla 5. Virus que afectan al cultivo de papa

Grupo viral	Sigla	Forma de transmisión
<i>Tobravirus</i>	TRV	Nematodo
<i>Tobamovirus</i>	TMV, PMTV	Mecánica, hongo
<i>Furovirus</i>	PMTV	Hongo
<i>Potexvirus</i>	PVX, PAM; V	Mecánica
<i>Potyvirus</i>	PVY, PVA	Afidos
<i>Capollovirus</i>	PVT	Mecánica, semillas
<i>Carlavirus</i>	PVS, PVM	Mecánica, áfidos
<i>Luteovirus / Polerovirus</i>	PLRV, BYDV, PLRV	Afidos
<i>Cucumovirus</i>	CMV	Afidos
<i>Tymovirus</i>	APLV	Escarabajos
<i>Comovirus</i>	APMV	Mecánica, Escarabajos
<i>Nepovirus</i>	PBRV, TRSV, ToBRV	Nemátodos
<i>Ilarvirus</i>	TSV	Thrips
<i>Necrovirus</i>	TNV	Hongos
<i>Geminivirus</i>	BCTV o SALCV	Saltahojas
<i>Rhabdovirus</i>	PYDV	Saltahojas
<i>Bunyavirus</i>	ToSWV	Thrips
<i>Alfamovirus</i>	AIMV	Afidos

Tomado de Salazar, 1998

El virus de la papa sana o PVX, sirve para ilustrar el hecho de que algunas especies tienen poco efecto, cuando se encuentran solos, en la expresión sintomática y en el rendimiento de la planta huésped, pero en asociación con otros virus pueden incrementar significativamente las pérdidas en el cultivo. Por ejemplo, los síntomas más severos resultan de la combinación de PVX y PVY, condición denominada «*streak*» (Salazar, 1995).

Para el PVY, se han determinado diferentes cepas, como PVY y la PVYNTN, de las cuales la última es más severa y causa necrosis. También en plantas ornamentales, como las petunias, se ha detectado la cepa PVYNTN por medio de anticuerpos, la que se expresa con necrosis severa en diferentes órganos (Boonham *et*

al., 2004). La secuencia del gen que codifica la proteína de la cápside del virus encontrado en petunia se comparó con cepas de PVY y se determinó una alta similitud con la cepa PVYNTN, con un punto de recombinación en la proteína de la capsíde común a otros aislados del mismo virus.

Esto significa que, dentro de una misma planta hospedera, pueden cohabitar variantes virales que mantienen poblaciones mayoritarias y minoritarias, dependiendo de condiciones medio ambientales, del tipo de huésped, del tipo de cepa viral y de la eficiencia de transmisión viral por el vector. Hay evidencias que demuestran tanto la presencia de mutaciones de tipo puntual (en el ácido nucleico, cambio de una base por otra), o eventos de recombinación del material genético entre dos variantes, que pueden generar otras variantes con genomas más largos, más cortos o con deficiencias de genes. De otra parte, algunos hospederos virales, como también algunos vectores de virus, pueden servir de filtros para determinadas variantes virales y de esta manera se puede alterar la dispersión de una población viral dada. Cada vez son más contundentes las demostraciones de la coexistencia dentro de una misma planta de diferentes grupos virales y de diferentes poblaciones dentro de un mismo grupo viral. La selección de quasiespecies y el mantenimiento de una población mayoritaria dentro de un hospedero son las causales, entre otras determinantes ambientales, de la intensidad de los síntomas expresados por una planta. Este mecanismo de recombinación genética es importante para la evolución de muchas especies de virus.

Las interacciones entre especies virales, los eventos de recombinación, mutación y otros en la generación de nuevas variantes virales se ilustra en los trabajos de Lozano *et al.*, (2003) ; Ramos *et al.*. (2003) Moriones *et al.*, (2001)) Colavita *et al.*, (2007).

Al parecer, la condición de quasiespecies en la que se encuentran las poblaciones de todos los grupos virales y que permiten recambios poblacionales dependientes de factores selectivos complejos presenta una gran importancia evolutiva. Para el conocimiento actual es casi impensable que exista una planta de campo infectada por un solo virus y una sola variante viral. De allí, el trabajo complejo de diagnóstico e identificación viral a partir de cultivos comerciales. Es importante mencionar en este aspecto que existen reportados hasta el momento más de 300 especies de fitovirus.

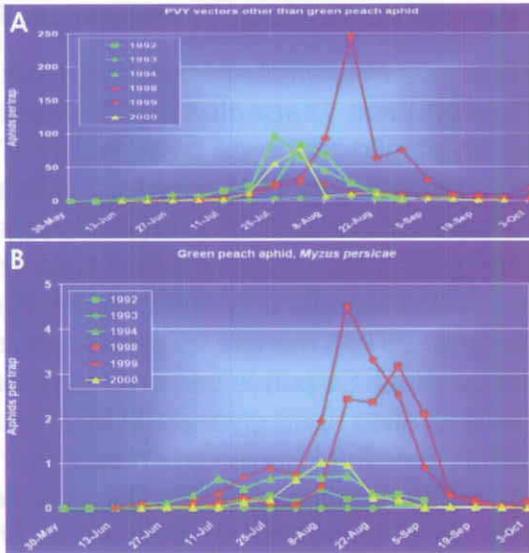
Sobre algunos virus

Virus Y de la papa (Potato virus Y, *Potyvirus*, PVY)

Pertenece a la familia *Potyviridae* género *Potyvirus* que contiene cerca de 180 miembros (especies) que causan pérdidas significativas en un amplio rango de cultivos. El PVY también se conoce con el nombre común de Potato leaf-drop streak (perdida de hojas estriadas) y puede afectar a muchas especies vegetales. El PVY es endémico en todas las áreas donde se cultiva papa y puede infectar hasta 200 especies vegetales diferentes referencias. Se disemina por áfidos, que lo transmite de una manera no persistente, siendo *Myzus persicae* el vector principal. Se puede transmitir también por injerto e inoculación de savia. El áfido *Aphis glycines* (Matsumura) que ataca al cultivo de soya se ha determinado recientemente como un nuevo vector en la transmisión del PVY (Davis *et al.*, 2003). Desde su descubrimiento en Norte América en el año 2000, el áfido *Aphis glycines* se ha dispersado por 20 estados. Los áfidos que atacan la soya son normalmente vectores de otros virus como el Virus del mosaico de la alfalfa (Alfalfa mosaic virus, *alfamovirus* AMV),) el Virus del mosaico de la soya (*Soybean mosaic virus*, (SMV), *Potyvirus*, y el Virus del bandeo en mosaico de venas del tabaco (*Tobacco vein-banding mosaic virus*, (TVBMV), *Potyvirus* que es una variante presunta del PVY. Este áfido está muy relacionado con *Aphis gossypii* (Glover) y *Aphis nasturtii* (Kaltenbach), que son vectores eficientes de PVY.

La Figura 17 muestra el seguimiento de vectores del PVY en Norte América. Como se observa, los incrementos fueron notorios para los años 1998 y 1999. Para algunos países y regiones se ha demostrado que la dispersión del PVY es cíclica, con picos a intervalos de 9 a 10 años. En Colombia, el implementar monitoreos de este tipo sobre la dispersión o concentración de los vectores en una época determinada del año, permitiría tener una mejor estrategia de control del vector en los cultivos de papa. Sin embargo, al parecer los insecticidas no son efectivos contra el vector y por consiguiente contra el PVY, debido a que la transmisión ocurre antes de que el insecticida pueda actuar contra el vector (Bradley *et al.*, 1966; Vanderveken, 1977).

Figura 17. A. Seguimiento de vectores de PVY diferentes a *Myzus persicae*. B. Seguimiento del vector de PVY *Myzus persicae* en Norte América (áfido verde del durazno)



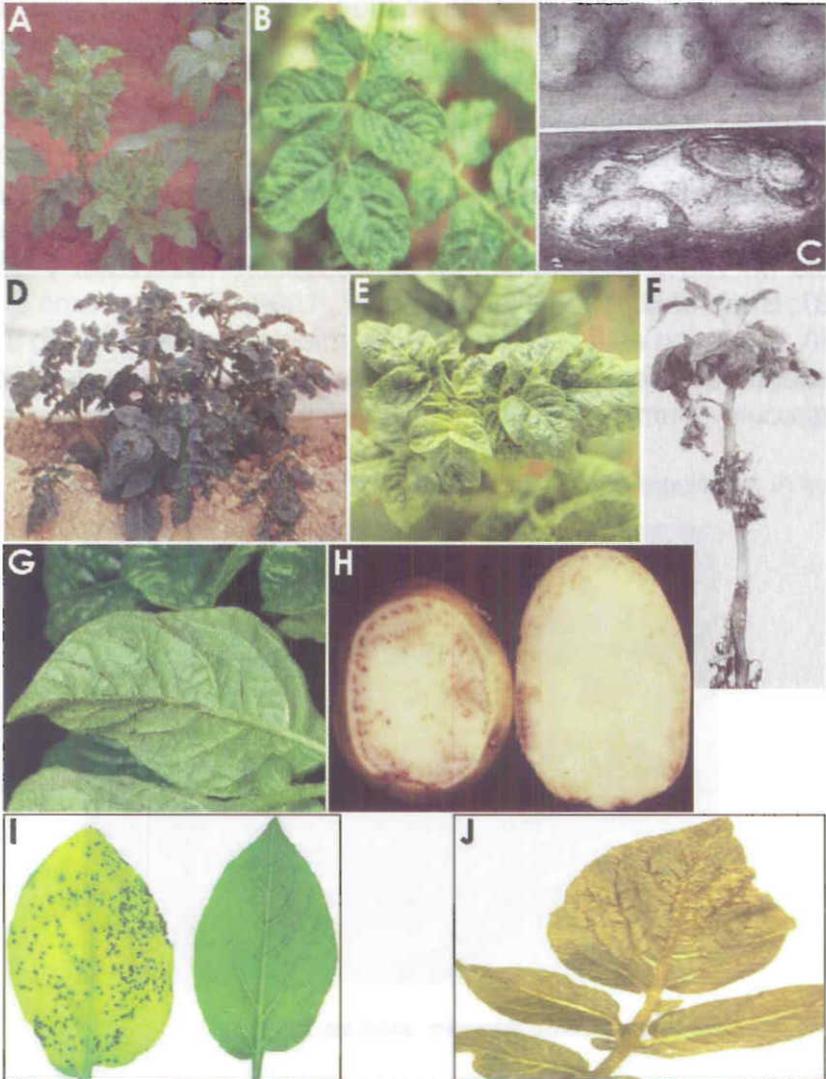
Tomado de ipmworld.umn.edu

Síntomas

El PVY causa síntomas de mosaico, medios a severos, en variedades susceptibles, acompañado por caída de las hojas bajas. Se puede observar también moteado suave. Los síntomas varían dependiendo de la cepa y de la variedad de la papa; pérdidas severas, hasta de 100%, se han reportado por infección con este patógeno. Hay al menos tres cepas de PVY (PVYn, PVYc y PVYo). La cepa más común (PVYo) está presente en todas las regiones cultivadoras de papa. Los síntomas de necrosis con reducción fuerte de la producción son causadas por cepas severas de PVY (PVYn). Esta cepa se ha detectado en Europa incluyendo Rusia, partes de Africa y Sur América; la cepa PVYc está presente en Australia, India y algunas partes del Reino Unido y el continente Europeo. Los síntomas más severos resultan de la combinación de PVX y PVY. Es importante el uso de planta certificada para disminuir la dispersión viral. Para el control de PVY es importante usar variedades resistentes o cultivares resistentes o tolerantes. El virus infecta especialmente a *Solanum tuberosum* (Beemster y Rozendaal, 1972).

A continuación, la Figura 18 ilustra diferentes síntomas expresados por la planta infectada con PVY.

Figura 18. Diferentes síntomas expresados por la planta con PVY



A. Mosaico expresado por la infección con PVY (www.gnb.ca/0029/00290055-e.asp). B. Síntoma severo de encrespamiento de hojas debido al PVY (PVY Data Base). C. Tubérculos altamente sintomáticos, con necrosis en anillo por infección con PVYn (Kerlan, INRA, Le Rheu). D. Enanismo por infección con PVY (molcho.org.il/images/pvy.jpg). E. Mosaico de tipo rugoso (Tomado de T.A. Zitter, Cornell University, <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/Potatoes/Viruses/PotVirusFS4.htm>). F. Debilitamiento y caída de hojas inducida por la cepa PVYo (www.dpvweb.net/dpvfigs/d242f01.jpg). G. Bando de venas causado por PVY (www.ipm.ucdavis.edu/PMG/P/D-PO-POMV-FO.010.html). H. Necrosis en tubérculo infectado por la cepa (N) del PVY (foto Universidad de Cornell). I. Lesiones de color negro por necrosis locales en plantas indicadoras (izquierda) versus el control no infectado (derecha) (SPIRED, INRA). J. Necrosis de las venas en el envés de la hoja (SPIRED, INRA).

Las partículas virales

Los viriones de PVY son filamentosos, flexuosos y miden 684 nm de largo por 11 nm de ancho (Figura 19). Los viriones contienen una molécula de RNA lineal de sentido positivo, cuya longitud total es de 10.400 nt. El genoma de RNA es monopartita y está encapsidado por una sola proteína de 30-47 kDa que conforma, con aproximadamente 2000 unidades, la proteína de cápside viral (CP). El genoma de PVY fue secuenciado completamente a partir de una cepa PVY (N) que causa necrosis, amarillamiento, caída de hojas y muerte prematura. Las cepas más severas pueden causar hasta un 100% de pérdidas en la producción (Beemster y Bokx, 1987; Brunt *et al.*, 1996; Robaglia *et al.*, 1989). En el extremo 5' del RNA genómico está la proteína VPg, mientras en el extremo 3' se encuentra una cola poly A, la cual no es esencial para la infectividad (Makkouk y Gumpf, 1974; Hinostroza-Orihuela, 1975).

Figura 19. Microfotografía electrónica del Virión de PVY a partir de extractos purificados



Tomado de: www.ncbi.nlm.nih.gov/.../Images/em_poty2.jpg.

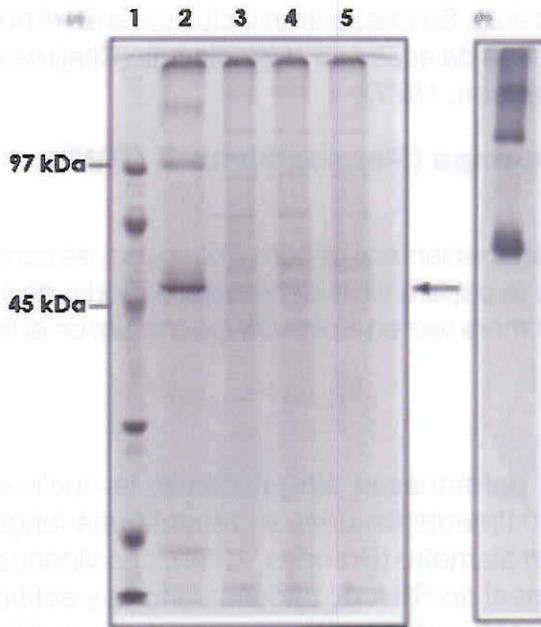
El RNA genómico codifica además para una poliproteína que es posteriormente procesada por tres proteasas codificadas por el mismo virus, obteniendo a la final 10 proteínas con funciones múltiples. Una de estas proteínas es la proteinasa del componente ayudador (*HC-helper*), la cual está involucrada en varias funciones como la supresión del silenciamiento del RNA, la replicación del

genoma, el movimiento célula a célula y la transmisión viral por el áfido vector.

Recientes estudios de las secuencias genéticas de varios aislamientos de PVYNTN indican que son derivados de recombinación entre PVYN y PVY0 (PVYN:O). Colavita et al., 2007. También se ha observado que períodos prolongados de propagación de plantas transgénicas resulta en aparición espontánea de variants variants (Dolja, et al., 1993).

En la Figura 20 se pueden observar los patrones de RNA de doble banda (dsRNA) de PVY que se obtienen por migración en gel de poliacrilamida.

Figura 20. Patrones de RNA en PVY



Tomado de: [www.ncbi.nlm.nih.gov/.../ Images /em_poty2.jpg](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.../Images/em_poty2.jpg).

Virus A de la papa (Potato A virus, (PVA), Potyvirus).

Pertenece a la familia *Potviridae*, género *Potyvirus*, reuniendo características similares a las mencionadas anteriormente para el PVY en cuanto a composición de genoma y a las proteínas.

Síntomas

Las variedades más comunes del virus A de la papa (PVA) causan síntomas de mosaico suave, sin la caída de las hojas. El virus se transmite por áfidos alados de manera no persistente.

Viriones

Los viriones están cubiertos por proteína de cápside pero sin envoltura. La nucleocápside es filamentosa, usualmente flexuosa y según Varma *et al.* (1968) posee 730 nm de longitud por 11 nm de diámetro. En los viriones PVA se confirmó la presencia de la proteína VPg de aproximadamente 25 kDa, unida a la región 5' terminal del genoma, (Oruetxebarria *et al.*, 2001).

Los viriones se encuentran en la epidermis, en el citoplasma y en vacuolas de la célula. Se encuentran inclusiones en el núcleo (como cristales) y en forma de aspas en el citoplasma (Kitajima *et al.*, 1968; Christie y Edwardson, 1977).

Virus X de la papa (Potato virus X (PVX), *Potexvirus*)

Este virus, perteneciente al género *Potexvirus*, es conocido como Virus latente de la papa o virus del mosaico medio de la papa; fue reportado por primera vez en *Solanum tuberosum* en el Reino Unido (Smith, 1931).

Viriones

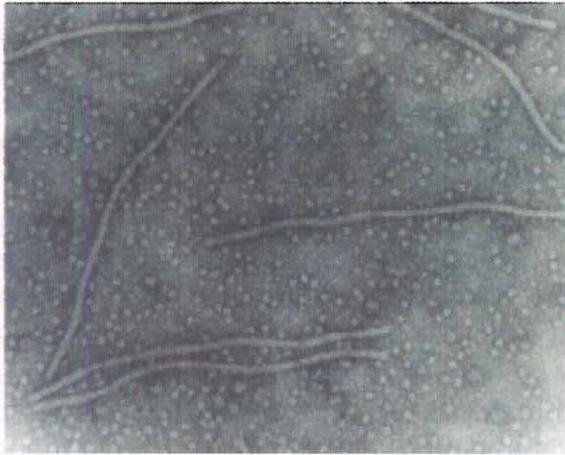
Los viriones permanecen sin envoltura; la nucleocápside es filamentosa, usualmente flexuosa y presenta una longitud de 515 nm por 13 nm en diámetro (Brandes, 1964). Los viriones contienen una molécula lineal de RNA de cadena sencilla y sentido positivo. La cápside viral está conformada por una proteína de 30 kDa (Shaw y Larson, 1962; Shaw *et al.*, 1962; Miki y Knight, 1968).

Los viriones se encuentran en el mesófilo y menos frecuentemente en la epidermis, y en citoplasma (Figura 21).

Inclusiones virales

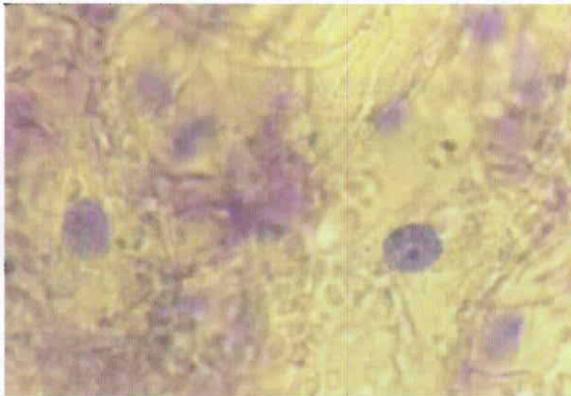
Las inclusiones están principalmente cercanas al núcleo de las células infectadas (Figura 22) y presentan una morfología irregular (Kozar and Sheludko, 1969).

Figura 21. Viriones de PVX



Tomado de ICTV: Virus Descriptions Shadowcast virus particles. <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig>.

Figura 22. Inclusiones de PVX en tabaco



Tomado de Cullen y Gooch, <http://plantpath.ifas.ufl.edu/pdc/Inclusionpage/potato/PVXinci.html>.

Síntomas

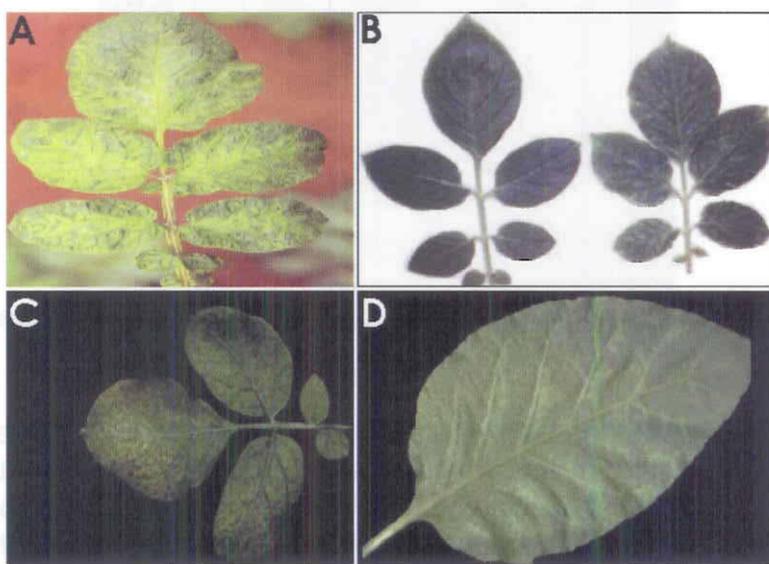
En *Solanum tuberosum* los síntomas varían: algunas cepas son asintomáticas y otras inducen estrías necróticas; en algunos hospederos se reporta también un moteado medio, distorsión de hojas y enanismo. Los síntomas se observan como venas cloróticas, disminución de tamaño de las hojas, mosaico en las hojas y lesiones necróticas en el tubérculo. Los síntomas producen reducción de la calidad del tubérculo, lo cual impide que se usen para propagación.

Algunos estudios sugieren una nueva estrategia para el movimiento célula a célula del PVX que involucra transporte de los viriones filamentosos a través del plasmodesmo. Utilizando mutantes virales deficientes en CP y proteínas del complejo TGB, Santa Cruz *et al.* (1998) encontraron que el incremento en el tamaño del plasmodesmo era dependiente de una o más de las proteínas TGB pero independiente de la CP.

La transmisión de PVX se realiza sin involucrar un vector: se transmite mecánicamente por inoculación o por contacto entre plantas; no se transmite a través de semilla ni de polen. Se ha detectado en todas las regiones del mundo cultivadoras de papa.

La disminución en rendimiento de la producción depende de la especie del huésped, de la cepa viral y de las condiciones ambientales, con pérdidas entre 10% y 50%. La repercusión en la producción se agudiza cuando están juntos PVY, PVX y PVA (Brunt *et al.*, 1996; Beemster y Bokx, 1987; Huisman *et al.*, 1988); para el control de este virus se han obtenido variedades resistentes y tolerantes. La Figura 23 ilustra diferentes síntomas producidos por el PVX.

Figura 23. Diferentes síntomas producidos por el PVX



A. Mosaico producido por el PVX (CIP, 1996; www.redepapa.org/fotosredvirus.htm). B. Síntoma de mosaico y aclaración ([molcho.org.il/ images/pvx.jpg](http://molcho.org.il/images/pvx.jpg)). C. Alternancia verde clara y oscura en la hoja de papa. D. Reacción necrótica localizada en forma de arabezcos en una hoja de tabaco infectada por PVX (SPIRE D, INRA).

Virus S de la papa (Potato S virus (PVS), Carlavirus).

El PVS, perteneciente al género *Carlavirus*, se ha encontrado en todas las regiones donde se cultiva papa. Aunque causa pocos o ningún síntoma, puede llegar a causar pérdida de tubérculos hasta en un 20% (tubérculos pequeños). Es considerado, junto con el PVX, un virus latente. Se transmite por *Myzus persicae* y *Aphis nasturtii* de forma no persistente y por inoculación mecánica. Las partículas son filamentosas con un poco de curvatura, de 650 nm de largo y 12 nm de ancho. El genoma es RNA monopartita y lineal de 7,5 kpb. El genoma del PVS se ha secuenciado parcialmente (Brunt *et al.*, 1996; Mackenzie *et al.*, 1989).

Dos tipos de cepas de virus S se pueden distinguir: (1) PVS(o) u ordinaria, muy distribuida en Europa (Alemania y Europa Centra) y (2) la cepa andina PVSA, que produce síntomas más severos y es de riesgo cuarentenario.

El virus S generalmente causa síntomas suaves y latentes. Aunque depende de la cepa, puede producir aclaramiento del follaje, depresión de venas en el ápice de la hoja (rugoso al tacto, Figura 24) y reducción del tamaño del limbo de la hoja. En hospederos

Figura 24. Síntoma producido por la infección con PVS



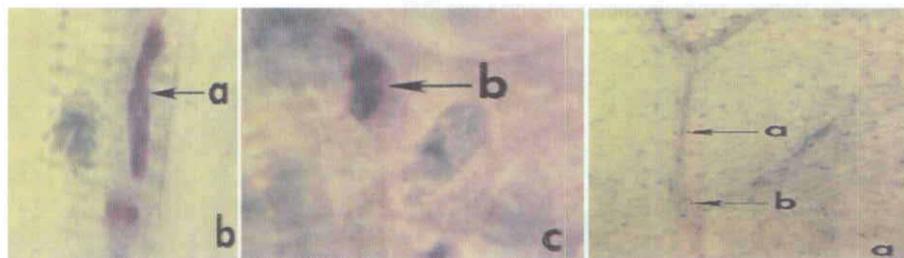
A la izquierda se observa una hoja sana, comparada con una hoja afectada a la derecha (www.plantdepommes.com).

muy sensibles, las hojas toman una coloración bronce, se pueden observar puntos necróticos y plantas pequeñas. El control consiste en el uso de semilla sana: hoy se pueden encontrar semillas libres de este virus y hay variedades moderadamente resistentes a PVS. Cebadores para la detección por RT-PCR de *Carlavirus* los informa Xianzhou and Yanju , 2008.

Virus del enrollamiento de la hoja (**Potato leafroll virus (PLRV), Luteovirus**)

El PLRV es un miembro del género *Luteovirus*, aunque hay informes que lo clasifican dentro de los *Polerovirus*, pero aún no hay una definición al respecto. Los viriones tienen entre 25 a 30 nm de diámetro, de forma hexagonal y de simetría icosaédrica. El genoma es RNA monopartita de 6 kb, de cadena sencilla y de sentido positivo, es decir, actúa como RNA mensajero. Está encapsidado por una sola proteína mayor de 23 kDa y una menor de 5 kDa. (P5). El PRLV se localiza en el floema de la planta. En la Figura 25 se pueden observar las inclusiones citoplasmáticas producidas por este virus.

Figura 25. Inclusiones citoplasmáticas de PLRV



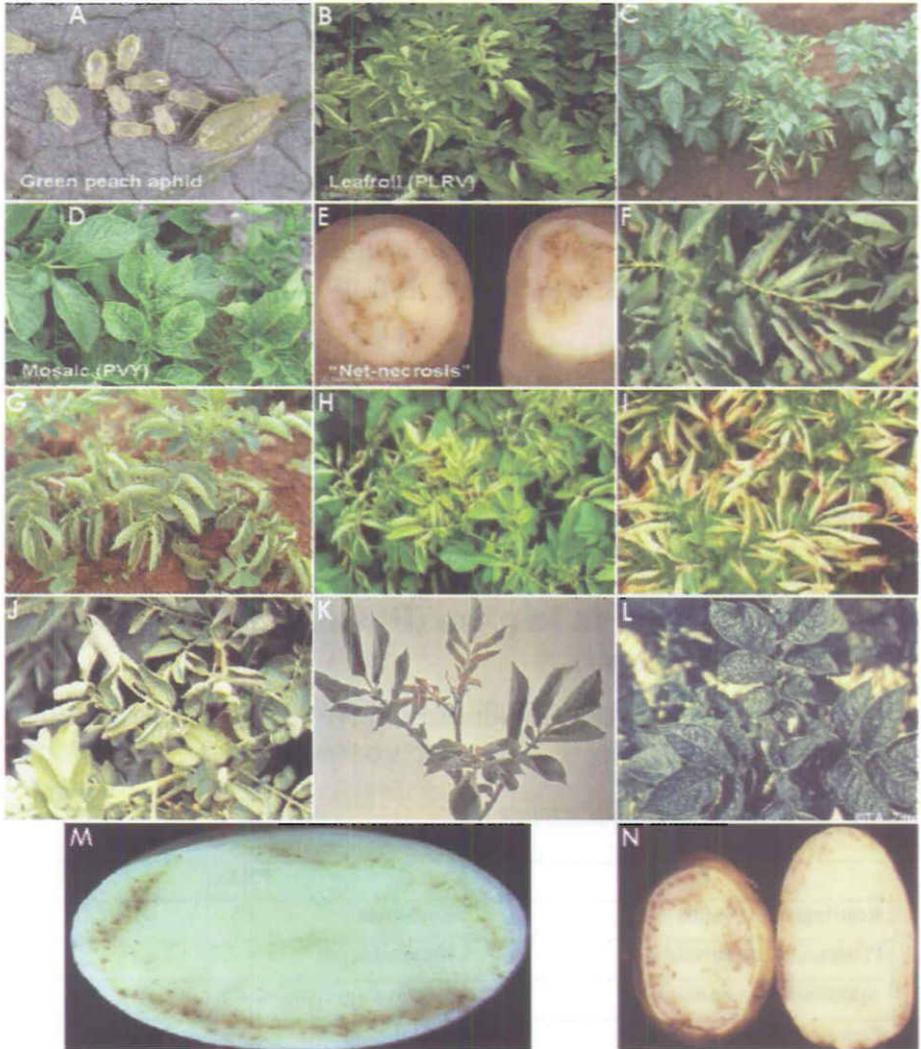
Tomado de: plantpath.ifas.ufl.edu/.../potato/Luteo2.jpg.

La transmisión se realiza por áfidos de forma persistente, siendo *Myzus persicae* quien transmite el PLRV en papa. La especificidad de la transmisión viral es el resultado de una interacción entre la proteína del virión y el tracto alimentario del áfido.

En los cultivos, la pérdida ocasionada por PLRV oscila entre 10% y 95% (en las variedades más susceptibles). Las pérdidas también se dan por la aparición de necrosis en áreas del tubérculo (BarKer, 1992; Bahner *et al.*, 1990)

Los síntomas causados por este virus incluyen amarillamiento, encurvamiento, enrollamiento y opacamiento de las hojas (Figura 26). La mayoría de *Luteovirus* causan pérdidas importantes en

Figura 26. Síntomas y vectores del PLRV



A. Imágenes del afido verde del durazno apterae *Myzus persicae*. B. Follaje afectado por PLRV. C. La variedad Russett Burbank es susceptible a PLRV (Cortesía de T.A. Zitter, Universidad de Cornell). D. Follaje afectado por PVY - mosaico. E. Tubérculos con necrosis, una condición causada en algunos cultivares (University of California, Statewide IPM Project web site). F. Variedad Russett Burbank afectada con PLRV. G, H, I, J, K y L. Síntomas de PLRV en papa (Fotografías tomadas de www.gov.mb.ca/.../images/bda04s07-p26.jpg (G y H), www.umext.maine.edu (I y J), CIP (K y L)). M y N. Síntomas de necrosis en tubérculo por PLRV (Tomado de Universidad de Cornell y www.uidaho.edu/ag/plantdisease/lnet1.gif respectivamente).

diferentes cultivos. Las malezas también son reservorios de estos virus. Los síntomas pueden ser diferentes dependiendo de la planta hospedera. Cuando PLRV y PVX están juntos, los síntomas se vuelven más conspicuos, al igual que las pérdidas.

Los síntomas de las infecciones primarias son menos dramáticos que aquellos de infecciones secundarias. Este tipo de infección con PLRV ocurre cuando un tubérculo semilla infectado se siembra. Las hojas inferiores se afectan severamente (enrollándose) y la planta sufre enanismo y presenta apariencia clorótica.

Las infecciones mixtas de PVY y PLRV tienen el potencial de reducir la producción más del 80% mientras que los virus suaves como PVS, M y PVX pueden causar pérdidas del 30% (Baker, 1992; Bahner *et al.*, 1990; Khurana 2000)

Control

Para el control de este virus se requiere la erradicación de las plantas afectadas, utilización de aficidas adecuados y semilla certificada. Pocos hospederos son resistentes al PLRV. La Tabla 6 presenta una comparación en resumen entre los virus PLRV y PVY.

Virus «Mot-Top» de la papa (Potato mop-top virus, (PMTV), *Furovirus*)

El PMTV, perteneciente al género *Furovirus*, o *Pomovirus* según Sakenjov (1999) www2.vbsg.slu.se/rap04/prog2/

Tabla 6. Características de los virus PLRV y PVY

PLRV	PVY
Restringido al floema	Epidermis
Persistente - circulatorio	No persistente
Adquisición en minutos	Adquisición en segundos
Periodo latente 24 h.	Sin latencia
Transmisión en minutos u horas	Transmisión en segundos
Transmisión a varias especies	Transmisión a algunas plantas
Vectores áfidos colonizadores (pocas especies)	Vectores áfidos no colonizadores (muchas especies)

Tomado de: University of California, Statewide IPM Project web site

EugeneS_pomovirus.html) causa una enfermedad económicamente importante en la papa (Jones *et al.*, 1982), , con reducción en la producción y calidad del producto en algunos cultivares (Calvert, 1968; Ryden *et al.*, 1989). Pérdidas importantes se han reportado en Escandinavia y otros países Europeos. El primer informe en *Solanum tuberosum* fue de Calvert y Harrison (1966) en Irlanda del Norte, posteriormente fue reportado en el Reino Unido (Jones *et al.*, 1982; Kurpa, 1989), y en Estados Unidos (1982) luego en Canadá (desde 1990) También se ha encontrado en Asia (China, Taiwan, Japón y Pakistán) y en Suramérica (Bolivia, Chile, Peru). Este virus tiende a dispersarse en regiones con climas fríos (Canadian Food Inspection Agency, 2002).

Síntomas

En la papa el virus puede causar un amplio rango de síntomas, incluyendo enanismo de raíces, marcas pálidas a verdosas en parche y en forma de V en las hojas jóvenes, amarillamiento de brotes, moteado y anillos. El PMTV ataca los tubérculos causando decoloración y anillos dentro de la papa, ruptura de tubérculo y manchas necróticas internas, arcos y anillos dentro del tubérculo.

Los síntomas son diferentes cuando los cultivares susceptibles crecen en clima frío y en condiciones de humedad que favorecen su dispersión. Infecciones latentes (asintomáticas) también se han reportado (Jones, 1981; Sandgren *et al.*, 2002). Existen anticuerpos que permiten su detección por técnicas serológicas como ELISA.

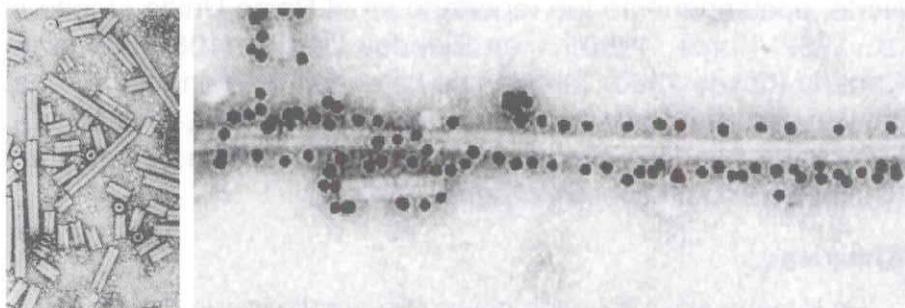
Los síntomas se pueden confundir con los de otros virus (por ejemplo, AMV, Virus del anillo negro del tomate (*Tomato black ring virus*, (TBRV), *Nepovirus*, , y del Virus del rayado del tomate (*Tobacco rattle virus*, (TRV), *Tobravirus*,. Smith *et al.*, (1988) sugieren que el virus puede estar presente y expresarse en cualquier región donde se cultive papa o donde se informa la presencia del hongo vector.

Virión

El genoma del virión del PMTV es tripartita y se encuentra encapsidado por una proteína de 18 a 20 KDa. Los viriones tienen forma de rodillo sin envoltura (usualmente rígidos) con una longitud de 100-150 nm o 250-300 nm por 18-20 nm de diámetro. Se observa

un canal axial evidente; Los viriones, que se localizan en las hojas, están en el citoplasma celular, formando inclusiones citoplasmáticas. En la Figura 27 se ilustra la detección de la partícula viral del PMPV por medio de anticuerpos.

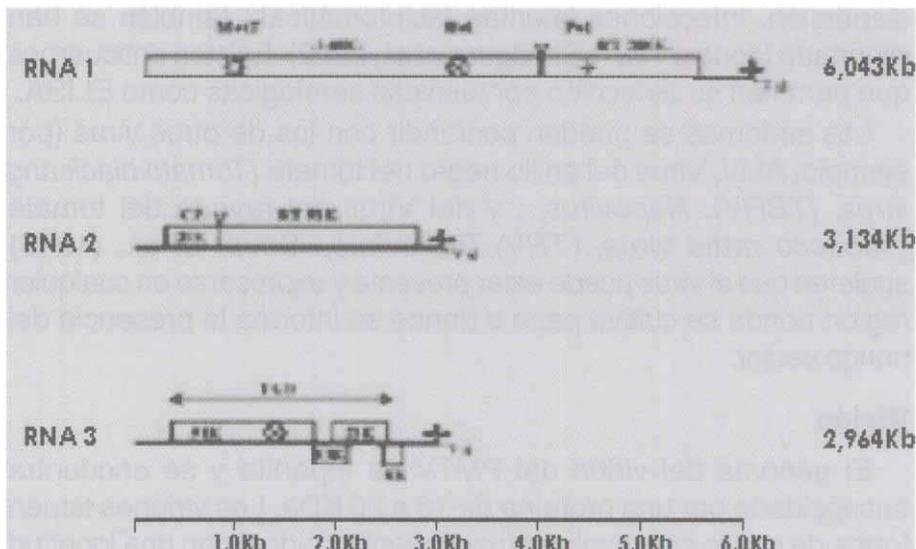
Figura 27. Partícula de PMTV



Tomado de Arif *et al.*, 1998

La organización del genoma tripartita de RNA de cadena sencilla lineal de un aislado sueco de *Potato mop top virus* (PMTV-Sw) se presenta en el esquema de la Figura 28.

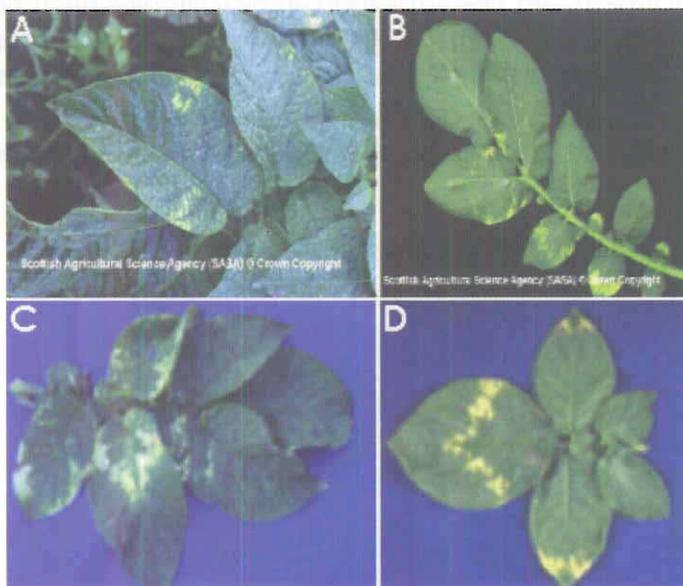
Figura 28. Esquema del genoma tripartita del PMTV



Tomado de Savenkov *et al.*, 1999, vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/84/4/1001

La Figura 29 presenta diferentes imágenes de los síntomas en hojas de plantas infectadas por el PMTV.

Figura 29. Síntomas de infección con PMTV en hojas



Tomado de: www2.vbgs.slu.se/rap04/prog2/EugeneS_pomovirus.html - 10k

Generalmente, la expresión de la enfermedad es más obvia en cortes del tubérculo que en el tubérculo completo (Figura 30)

Figura 30. Síntoma de aclaración y necrosis en tubérculos infectados por el PMTV



Foto de Bengt Eriksson, www.PMTVimages/moptop1.gif

El PMTV se transmite por el suelo a través de zoosporas del hongo *Spongospora subterranea*, que a la vez es un patógeno de la papa. El virus infecta tubérculos de especies sensibles como *Solanum tuberosum*, desarrollando arcos y círculos necróticos. Las esporas de *S. subterranea* y el PMTV pueden permanecer infectivas en el suelo durante 10 años. Hasta el momento no se ha demostrado la transmisión de PMTV por áfidos. El virus no se disemina a todos los tubérculos de la planta por lo que su estabilidad se mantiene por el vector (Figura 31).

Figura 31. Enanismo causado por el virus PMTV



Incidencia

Entre el 30% y 70% de los tubérculos pueden ser infectados (Calvert, 1970). Plantas con infección aguda por PMTV reducen su producción en un 26% - 37% (Jones y Harrison, 1972; Kurppa, 1989; Ryden *et al.*, 1989).

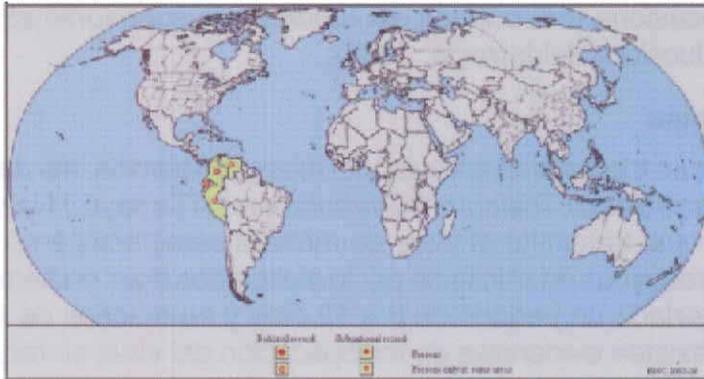
Virus del Amarillamiento de venas de la hoja (Potato yellow vein virus, (PYVV), *Crinivirus*)

El PYVV pertenece a la familia *Closteroviridae* que agrupa a los virus más largos que infectan a las plantas. Se reporta como perteneciente al género *Crinivirus* (Salazar *et al.*, 1998). La enfermedad del amarillamiento de las venas de la hoja de la papa fue informado por primera vez entre 1939 y 1943 en Ecuador y Colombia (Alba, 1950; Smith, 1972), llegando a ser importante desde 1980, cuando redujo significativamente la producción de papa en Colombia (Tamayo y Navarro, 1984).

Distribución geográfica

El virus se encuentra en países productores de papa de la región andina como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Venezuela (Figura 32). También, Smith (1972) lo reportó en invernadero en Inglaterra.

Figura 32. Distribución geográfica de la incidencia de PYV



Tomado de: www.eppo.org/.../ PYVV00_map700.gif.

Incidencia

La enfermedad puede causar una disminución de la producción del 50%. Es un virus cuarentenario en los países andinos. En Colombia se observó inicialmente en Antioquia en 1943, y rápidamente alcanzó una alta incidencia en cultivos, reduciendo los rendimientos severamente. Las plantas afectadas producen pocos tubérculos (Salazar *et al.*, 2000). La Figura 33 ilustra un campo infectado por el virus.

Figura 33. Cultivo infectado por el PYV



Tomado de Salazar *et al.*, 2000

Pérdidas

El PYVV es una enfermedad considerada como una amenaza para la producción de papa en Suramérica. Evaluaciones realizadas en cultivos de papa revelan que la enfermedad se encuentra localizada con rangos de incidencia que varían entre 5 y 60% en Colombia, 3 a 10% en Venezuela y 5 a 50% en Perú (Müller y Salazar, 1998) y ocasiona reducciones del rendimiento superiores al 50% de la producción (Saldarriaga, 1988).

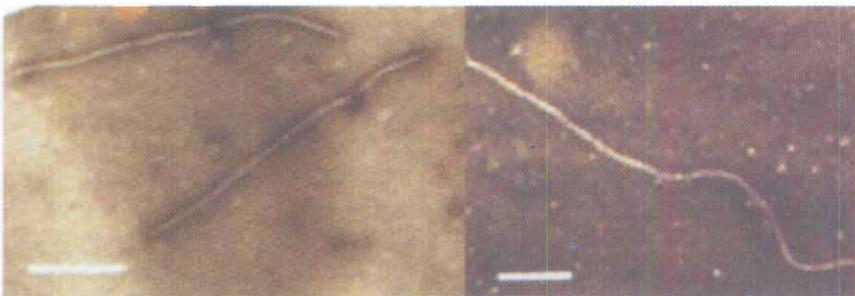
Transmisión

El virus es transmitido a través del tubérculo semilla infectado y por la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Tamayo y Navarro, 1984), la cual transmite el virus de manera semipersistente. Los virus son retenidos en el insecto por lo menos dos días: en hembras se ha reportado un periodo de 8 a 12 días y en machos de 4 a 7 días. No existen evidencias de multiplicación del virus en moscas blancas (Salazar *et al.*, 1998).

Virión

El virión se localiza en el floema de la planta (Figura 34). Está conformado por un genoma tripartita de sentido positivo (Lieveratos *et al.*, 2004) con RNA defectuoso asociados (Eliasco, *et al.*, 2006) y se encuentra encapsidado por dos tipos de proteína de cápside (CP): la mayoritaria con 77,5 kDa y una CP minoritaria (Coutts, 2003; Livieratos *et al.*, 2004). Los viriones son filamentos flexuosos de simetría helicoidal.

Figura 34. Viriones purificados de PYVV

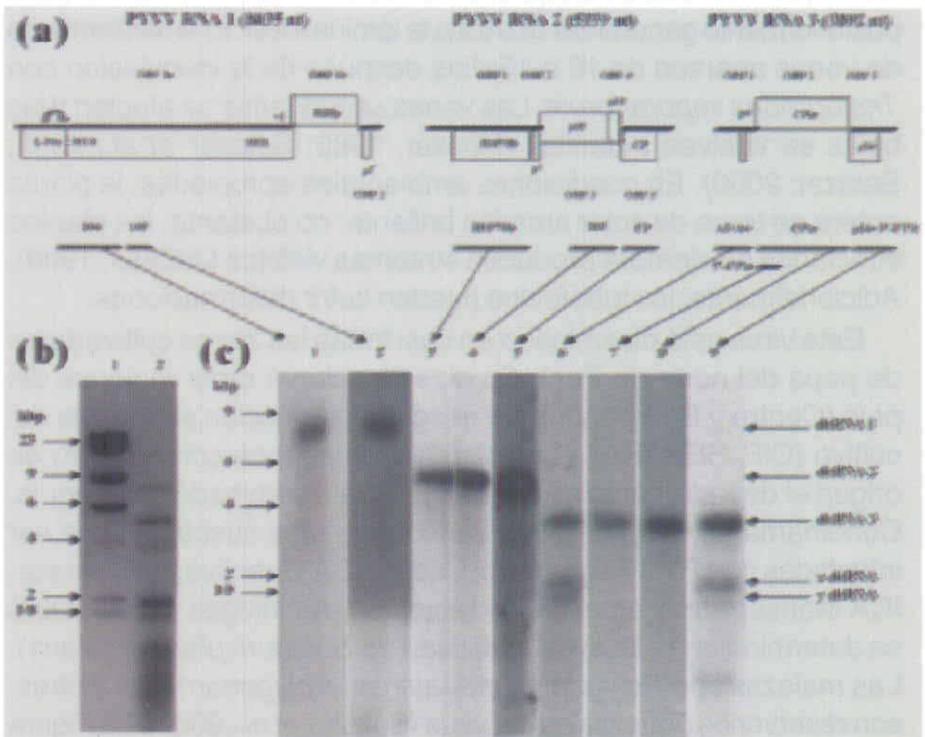


Tomado de: Salazar *et al.*, 2000.

El análisis electroforético del RNA revela productos de doble banda (dsRNA) en el tejido enfermo, que se detectan con 5 especies de RNA denominadas RNA 1, RNA 2, RNA 3, X y Y de tamaños de 9.000, 6.100, 4.300, 2.200 y 1.800 pb respectivamente (Salazar *et al.*, 2000), como se ilustra en la Figura 35.

Los análisis de Northern blot demostraron que el RNA 1 contine el módulo de replicación mientras que los RNA 2 y 3 contienen los genes marcadores de los *Closteroviridae* (HSP, CP, CPd). La secuencia completa de los RNA 1, 2 y 3 se encuentran en el GenBank AJ557128 (RNA 1), AJ557129 (RNA 2) y AJ508757 (RNA 3) (Lieveratus *et al.*, 2004).

Figura 35. RNA genómico y especies de dsRNA en PYVV.



Las comparaciones filogenéticas demuestran una alta homología del PYVV con especies del género *Crinivirus* aunque es más

cercano al virus amarillo del pepino, *Cucumber yellows virus*, (CMV), *Crinivirus*, que utiliza el mismo vector (Lieveratus *et al.*, 2004; Hartono *et al.*, 2003).

Inclusiones citoplasmáticas

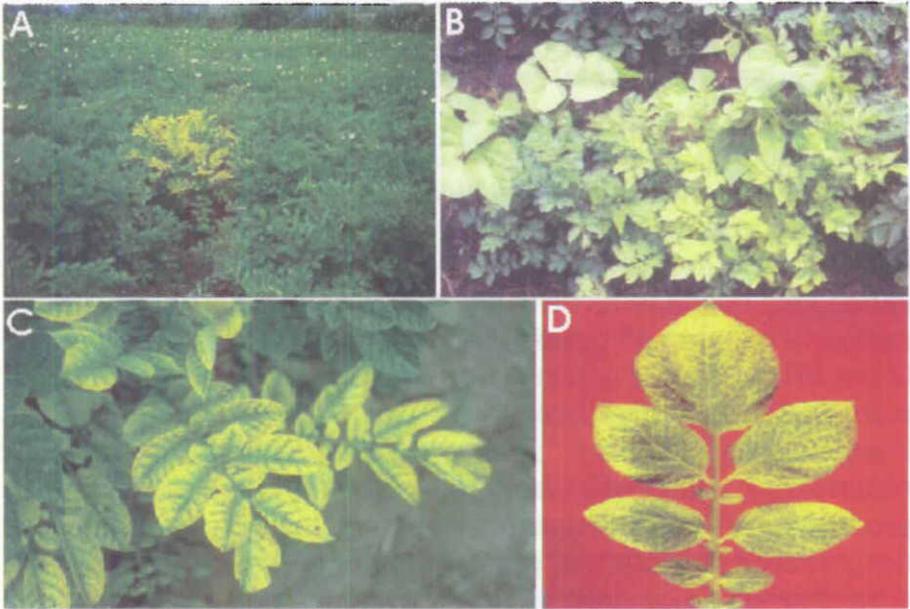
Los viriones causan degeneración de cloroplastos y mitocondrias y obstaculizan los haces vasculares, alterando el metabolismo y respiración de la planta. En cortes de tejido de plantas con PYVV se observan inclusiones de partículas virales en el floema y células asociadas al parénquima, como también degradación de cloroplastos en muestras infectadas (Salazar *et al.*, 1998).

Síntomas

Los primeros síntomas se evidencian sólo en las nervaduras de las hojas, las cuales adquieren el color amarillo brillante para posteriormente generalizarse a toda la lámina foliar. El amarillamiento de venas aparece de 10 a 15 días después de la inoculación con *Trialeurodes vaporariorum*. Las venas secundarias se afectan y las hojas se vuelven amarillas (Hooker, 1980; Salazar *et al.*, 1998; Salazar, 2000). En condiciones ambientales apropiadas, la planta entera se torna de color amarillo brillante; no obstante, las plantas infectadas no siempre producen síntomas visibles (Jeffries, 1998). Adicionalmente, los tubérculos pueden sufrir deformaciones.

Este virus está diseminado en casi todas las zonas cultivadoras de papa del norte de Perú. Su diseminación a otras regiones del país (Centro y Sur) pondría en riesgo la producción sostenible del cultivo (CIP, SENASA). En Colombia, se supone como centro de origen el departamento de Nariño y se ha diseminado a Antioquia, Cundinamarca, Boyacá. Las variedades más susceptibles a ser infectadas con PYVV son Diacol Capiro, ICA Guantiva, ICA Puracé, ICA Monserrate; y en estudios recientes (Arciniegas, *et al.*, 2004) se determinó una alta susceptibilidad de *Solanum phureja* (Clon1). Las malezas tipo *Polygonum mepalense*, *Polygonum spp.* y otras, son reservorios potenciales del virus (Salazar *et al.*, 2000). La Figura 36 presenta imágenes del síntoma de amarillamiento de venas de la hoja causados por la infección con el PYVV.

Figura 36. Síntomas de amarillamiento de venas de la hoja causados por la infección con el PYVV.



A. Fotografía de CIP, Perú. B y C. Fotografías de APS, St Paul, US. D. Fotografía de Fedepapa, Colombia

Pérdidas económicas por fitovirus y estrategias de control

La importancia de los daños ocasionados por los fitovirus en los cultivos comerciales, consecuencia directa de la expresión de los síntomas asociados a la infección por patógenos, particularmente para el caso de virus, ha dado lugar a estimaciones a veces contradictorias. Las cifras que se manejan en diferentes cultivos consideran pérdidas del 30% en promedio, aunque para cultivos y virus específicos, las pérdidas pueden variar de un 54% a un 80%. Por lo general, los agricultores prestan poca importancia a los efectos de la virosis, puesto que los cultivos pueden mantenerse «productivos» aún con una reducción relativa, si se comparan los estragos de tipo más generalizados producidos por las infecciones bacterianas o por hongos. Muchas veces se puede confundir la enfermedad viral con clorosis debidas a deficiencias de nutrientes o micronutrientes. Estas patologías (bacterias y hongos) se manifiestan en el cultivo de manera horizontal, es decir,

repercutiendo sobre todo el área del cultivo afectado (contacto entre una planta y otra, via suelo, lluvia o vector) y, por lo tanto, el control debe ser preventivo, aplicando compuestos específicos (bactericidas y fungicidas) para cada tipo de patógeno y en la estación climática pertinente.

Sin embargo, la infección viral se considera de tipo vertical, es decir, que depende de la transmisión vegetativa o por semilla, del adecuado control del vector con insecticidas (en los tiempos adecuados y con productos adecuados) y de la utilización de variedades hospederas de la planta que sean resistentes y/o tolerantes. Al no tener en cuenta todas estas variables, se incrementa la posibilidad de dispersión de los virus, con la posible asociación entre diferentes grupos virales en una misma planta, lo que conlleva la expresión de síntomas más severos, el incremento de infecciones secundarias y la consecuente reducción en los rendimientos de producción. Si las condiciones ambientales son favorables, el hospederero es susceptible y el vector natural es muy eficiente para la transmisión de los virus, se puede favorecer la expresión de cepas severas en detrimento de la producción, afectándola hasta en un 100% para casos específicos.

En Colombia no existen todavía estudios completos y concluyentes sobre la dimensión de la incidencia viral (diferentes tipos de virus) en los cultivos de papa y de las repercusiones económicas de los mismos. Algunos estimativos se han presentado para el PVYV: Salazar *et al.* (1998) sugieren una reducción de la producción de hasta 80% debida a la infección con este virus.

En Colombia el estudio de las colecciones y bancos de germoplasma de papa del país y la propuesta de semilla certificada y de plantas susceptibles y potencialmente resistentes (o tolerantes) se ha iniciado con el apoyo de la cadena de competitividad de la papa. Por lo menos, para el caso del PVYV se ha iniciado un trabajo para la estimación en *Solanum phureja* (Arciniegas, 2003; Arciniegas *et al.*, 2002). Hace falta poner a prueba en campo algunas de las accesiones seleccionadas para establecer la capacidad de resistencia de las mismas en condiciones naturales. Para otras especies de *Solanum* spp. y para otros virus se hacen esfuerzos en este sentido, analizando genotipos y sus potencialidades en campo con trabajos orientados por relevantes investigadores del cultivo de papa.

Las manifestaciones de la infección viral tienen efectos desvalorizantes de la producción, tanto cualitativa como cuantitativamente. En papa se pueden observar casos de alteración del tubérculo en tamaño, forma y calidad general del mismo, debidos a la infección por diferentes virus. En consecuencia, el perjuicio ocasionado por la virosis es real pero en ciertas circunstancias es difícilmente valorable debido a discreción de algunos síntomas, su caprichosa exteriorización y a los muchos casos de latencia viral.

Para luchar contra la virosis de las plantas no se dispone de una sola herramienta. De una parte, no existen sustancias químicas para combatir los virus y por lo tanto debe manejarse una política integrada del manejo del cultivo. No solamente se debe controlar la calidad de la semilla, que debe ser certificada, sino además se debe considerar el control adecuado de los insectos, en las épocas de mayor incidencia y dispersión de los mismos. De otra parte, una buena supervisión del cultivo permitirá también erradicar y quemar las plantas que expresen síntomas tempranamente, disminuyendo así los focos de infección. Se ha determinado que muchas malezas que se mantienen dentro de los cultivos son reservorios de virus, por lo que una supervisión y erradicación de las mismas es importante.

Una alternativa realmente adecuada sería contar con plantas resistentes a uno de los virus o varios de ellos y a otros patógenos. Sin embargo, esto requiere de un trabajo lento y dispendioso por parte de los fitomejoradores, por lo que un trabajo interdisciplinario, con el apoyo decidido de los agricultores, redundaría en la obtención de resultados más rápidos y efectivos.

De otra parte, diferentes consorcios multinacionales han obtenido plantas transgénicas resistentes a diferentes patógenos o vectores, incluida la papa, con procedimientos biotecnológicos como la transferencia de genes virales (de la proteína de la cápside viral o de la replicasa viral u otros), variedades que se han ido valorando en campo en diferentes países y diferentes condiciones geográficas. Sin embargo, discusiones políticas y/o sociales sobre la conveniencia de utilizar cultivos con este tipo de plantas se han suscitado sin llegar a acuerdos dentro o entre países.

En Colombia se han adelantado algunos trabajos en el tema de las plantas transgénicas, particularmente para algunos virus de la

papa, (Universidad Nacional de Colombia, Alejandro Chaparro desde 1994 y Liliana Franco, desde 1995). Falta todavía un tiempo largo para evaluar en condiciones de campo la capacidad protectora de estas plantas transgénicas, incluyendo los estudios pertinentes de resistencia y rendimiento. Falta también el interés político y social de nuestro país para valorar objetivamente las ventajas y desventajas de la aplicación de esta metodología para modernizar los arraigos culturales del país, manteniendo el equilibrio necesario para mantener las especies. Ya en Argentina y Canadá hay cultivos extensivos en soya y canola y son ejemplos actuales de países comprometidos con los cultivos transgénicos. Se debe considerar, finalmente, que un lindo tomate rojo comprado en el mejor supermercado de productos orgánicos de la ciudad se habrá desarrollado a partir de una planta que estuvo expuesta a diferentes vectores transmisores de virus y por lo tanto, también estuvo expuesta como planta a la infección de algunos de ellos.

CAPÍTULO 5

DETECCIÓN

Algunas estrategias para la detección de fitovirus

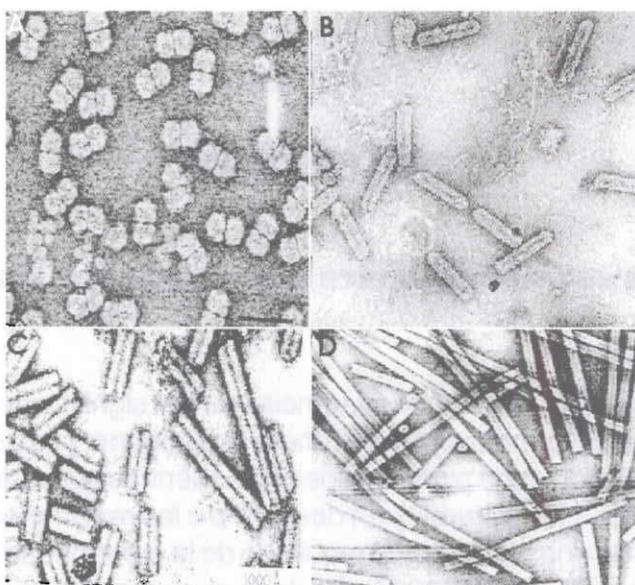
Sintomatología

Es importante recordar la diferencia entre el significado de signo y de síntoma. El término **signo** se refiere al patógeno, sus partes o sus productos, vistas en la planta hospedera mientras que el de **síntoma** corresponde a los disturbios en desarrollo o las reacciones externas e internas de una planta como resultado de la enfermedad producida por el patógeno (Agrios, 1997). Es decir, que un signo es un llamado de alerta sobre la presencia posible de infección por patógenos, o por falta de nutrientes. De otra parte, las plantas manifiestan síntomas particulares, incluidos el enanismo, o malformación del tubérculo y otros, debidos a la infección por patógenos específicos o una asociación de los mismos. En virología, la expresión de síntomas en la planta principal o en las plantas indicadoras, sigue siendo hoy en día el método más importante para caracterizar un virus. Otras técnicas complementarias incluyen microscopía de luz directa, para observar las inclusiones citoplasmáticas, o la microscopía electrónica, con la cual es posible estudiar la morfología viral y las alteraciones causadas en la estructura y organelos celulares. Dentro de esta última se han desarrollado diferentes metodologías para la captura y análisis de la partícula viral. Por ejemplo, la microscopía electrónica de

inmunoabsorción (ISEM), en la cual se atrapan las partículas virales en las rejillas o celdas carbonadas (utilizadas comúnmente en microscopía electrónica), en las cuales se ha fijado previamente un anticuerpo que reconoce al virus específico a detectar. Para información de otras técnicas se puede consultar Milne (1998).

La Figura 37 presenta algunos ejemplos de partículas virales purificadas y observadas con microscopio electrónico.

Figura 37. Microfotografía electrónica de algunos fitovirus purificados



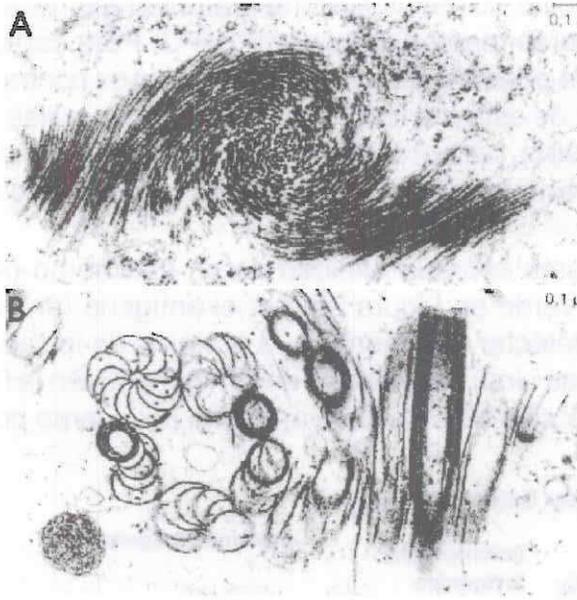
A. Gemnivirus. B. Partículas baciliformes. C y D. Partículas en rodillos (Tomado de Matthews, 1991).

La Figura 38 corresponde a los arreglos de las inclusiones citoplasmáticas visualizadas a través del microscopio electrónico. Las inclusiones citoplasmáticas son agregaciones de proteínas virales codificadas por el virus y que se acumulan en sitios celulares específicos, sea en el citoplasma o en el núcleo de la célula, tomando formas particulares específicas de un grupo viral. Por tal razón también se consideran como de importancia diagnóstica.

Serología

Desde que Clarks y Adams (1977) adaptaron la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la detección serológica

Figura 38. Ejemplos de inclusiones citoplasmáticas



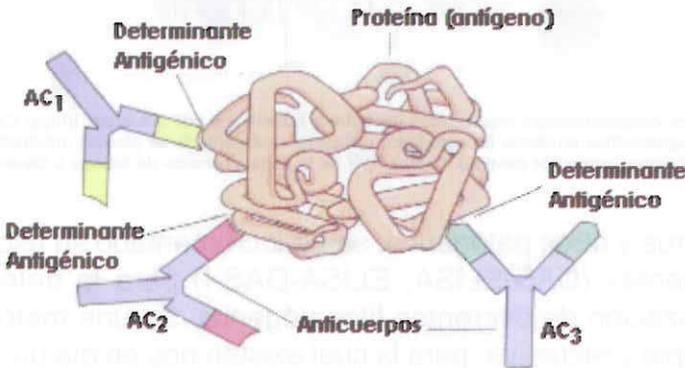
A. Inclusiones citoplasmáticas observadas en tejidos infectados por virus del grupo Carlavirus. B. Inclusión citoplasmática en forma de ventilador (*pinwheels*) observada en plantas infectadas por virus del grupo Potyvirus, como por ejemplo el virus PVY de la papa. (Tomado de Albouy y Devergne, Cliché, 2000)

de los virus y otros patógenos, se ha incrementado su uso y la de sus variantes (DAS-ELISA, ELISA-DAS-I) para la detección y caracterización de diferentes fitopatógenos. Es una metodología muy simple y recursiva, para la cual existen hoy en día una amplia gama de anticuerpos comerciales de las casas AGDIA, SANOFI, INGENASA, entre otras, para la detección de bacterias, hongos y virus que infectan a las plantas. En ELISA se requiere, sin embargo, tener en cuenta varios factores que pueden alterar los resultados esperados: (1) el uso de buenos controles negativos y positivos para el virus a detectar, que definan claramente los límites entre los títulos virales (densidad óptica), positivo y negativo, (2) el manejo de las diluciones del antígeno, siendo en general de dilución 1:10 (peso:volumen), pero hay casos en que es mejor utilizar una dilución mayor (1:20 o 1:100), (3) el sustrato para la fosfatasa alcalina (sea para-nitrofenil-fosfato para ELISA, o nitro-blue-tetrasodio/bromo-cloro-indol-fosfato para membrana de nitrocelulosa), el cual debe prepararse a último momento y en oscuridad para evitar la fotólisis

y el aumento del ruido de fondo y (4) las lecturas deben realizarse a los 60 minutos o 90 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y a las 14 horas mantenida la placa a 4°C. Para caracterizar una cepa viral, se pueden utilizar varios anticuerpos contra una cepa o grupo viral y de esta manera se establecen los perfiles serológicos (Guzmán, 1998), para el caso de cítricos. Para lo virus de papa, son pocos los antisueros diversos que reaccionan o reconocen un mismo aislado.

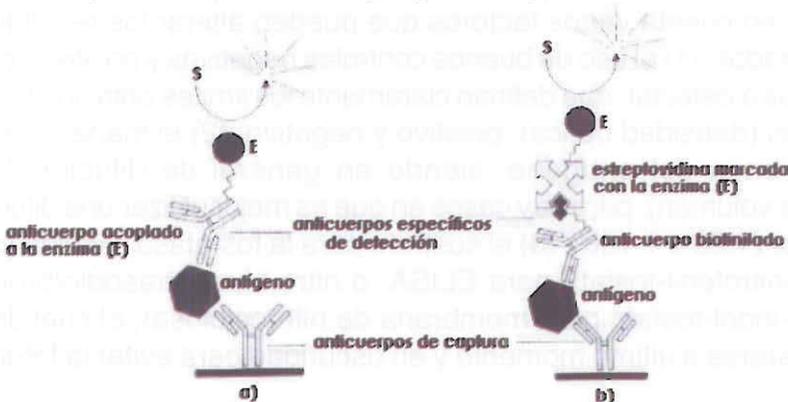
Un esquema sobre la afinidad de un anticuerpo (AC de color azul, rojo o verde en Figura 39) por el antígeno (en color rosa) o proteína a detectar (por ejemplo, la proteína de la cápside viral, o de la replicasa viral) se presenta en la Figura 39. En la Figura 40 se ilustra la reacción de detección antígeno anticuerpo por la técnica de ELISA.

Figura 39. Detección antígeno anticuerpo



Modificado de Inmunology, Stefan H. E. Kaufmann, Alan Sher, Rafi Ahmed, 1999.

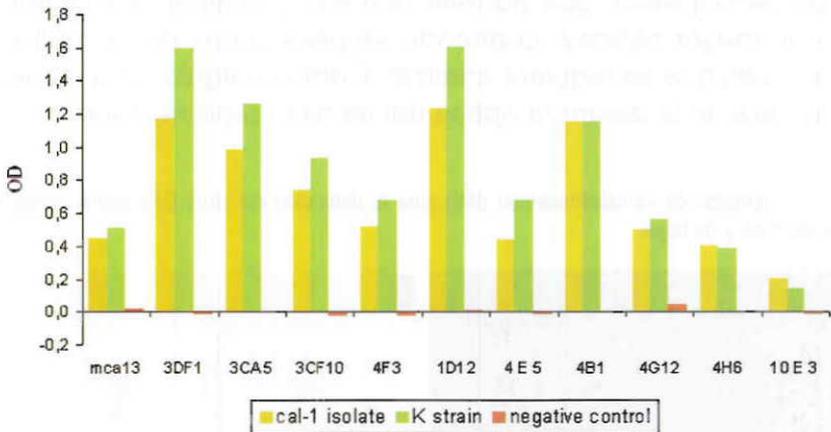
Figura 40. Esquema de afinidad entre el Antígeno y el Anticuerpo en la técnica ELISA



En esta figura se esquematiza la detección de la cápside viral por medio de la técnica serológica de ELISA, a partir del macerado de tejido de la planta infectada. Se presentan dos esquemas comparativos: (a) la técnica de DAS-ELISA con revelación directa, donde el antígeno (virus) es capturado por los anticuerpos específicos fijados sobre la placa (los anticuerpos antivirales conjugados a la enzima fosfatasa alcalina reconocen al antígeno) y (b) técnica de DAS-ELISA indirecta, en donde se amplifica la señal de captación viral utilizando un segundo anticuerpo antiviral marcado con biotina y detectado por estreptavidina marcada con la enzima fosfatasa alcalina, o de otra parte, se utiliza un antianticuerpo (GAM) marcado con la enzima fosfatasa alcalina.

En la Figura 41 se muestra el perfil de histogramas obtenidos por exposición de un antígeno del CTV a diferentes anticuerpos.

Figura 41. Histograma que muestra el perfil serológico de la exposición de dos aislados del CTV a 11 anticuerpos monoclonales

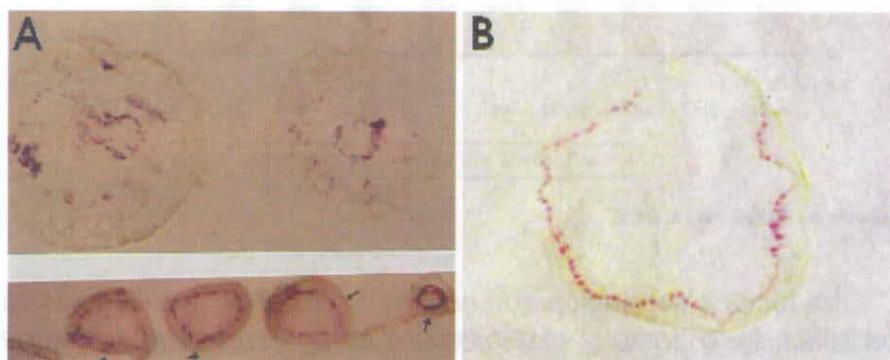


Tomado de: Guzmán *et al.*, 2002).

Otra técnica serológica que ha venido teniendo impulso por su sencillez, bajo costo y especificidad es la denominada «*tissue printing*» o inmunopresión (IMI). Los cortes longitudinales y transversales del tejido a analizar se imprimen sobre una membrana de nitrocelulosa y posteriormente ésta se expone a los anticuerpos y conjugados específicos. Los agrupamientos virales

se detectan por una coloración violeta que no se observa en las muestras negativas de virus. Esta metodología se implementó con éxito para la detección de Virus de la Tristeza de los Cítricos y otros virus (Polston *et al.*, 1991; Cambra *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1995; Guzmán, 1998) y posteriormente se ha adaptado para detección de virus de caña de azúcar y *Potyvirus* de alstromeria (Guzmán, en ejecución), así como para algunos virus de papa (Guzmán *et al.*, 2001) y otros virus. Adicionalmente, con IMI se puede valorar la expresión de otros genes virales de interés, aún de genes de la planta misma o de una planta transgénica (Franco, 1998; Bruce A. *et al.*, (1989), Taylor *et al.*, 1993; Tiré *et al.*, 1993; Gaston *et al.*, 2005). También se puede seguir el curso de la infección viral en la planta, órgano o tejido. Es, por lo tanto, una técnica muy versátil cuya información permanece intacta durante mucho tiempo. Adicionalmente, la técnica IMI tiene la ventaja de que se puede utilizar directamente sobre muestras de campo y permite la participación de personal técnico capacitado, por lo que se considera una técnica de tipo participativo, que permite rastrear y evaluar la incidencia viral con mayor rapidez, cubriendo amplias zonas de los cultivos comerciales que se requiera analizar. Como cualquier otra técnica, se requiere de la destreza óptica del técnico especializado.

Figura 42. Ejemplos de inmunopresión (IMI) para la detección del virus CTV sobre cortes de pecíolo del fruto y de hojas



(A) de potyvirus en alstromeria (B). El color violeta intenso corresponde a las zonas virus positivas (Guzmán, 1998).

De otra parte, es más conocida la reacción antígeno-anticuerpo en la prueba de difusión simple o doble que se puede observar

sobre placas cubreobjetos o en cajas cubiertas por geles de agar (2% Ionagar o agarosa), en el que se ha mezclado el anticuerpo antes de que solidifique el gel. El antígeno que se difunde en el gel se combina inmediatamente con el antisuero si hay reacción positiva, formando un precipitado de halo alrededor del pozo. La limitación de esta técnica es la habilidad del antígeno para difundirse en el gel y la concentración del antígeno. Para mayor información sobre técnicas y aspectos serológicos el lector puede remitirse a van Regenmortel y Dubs (1993).

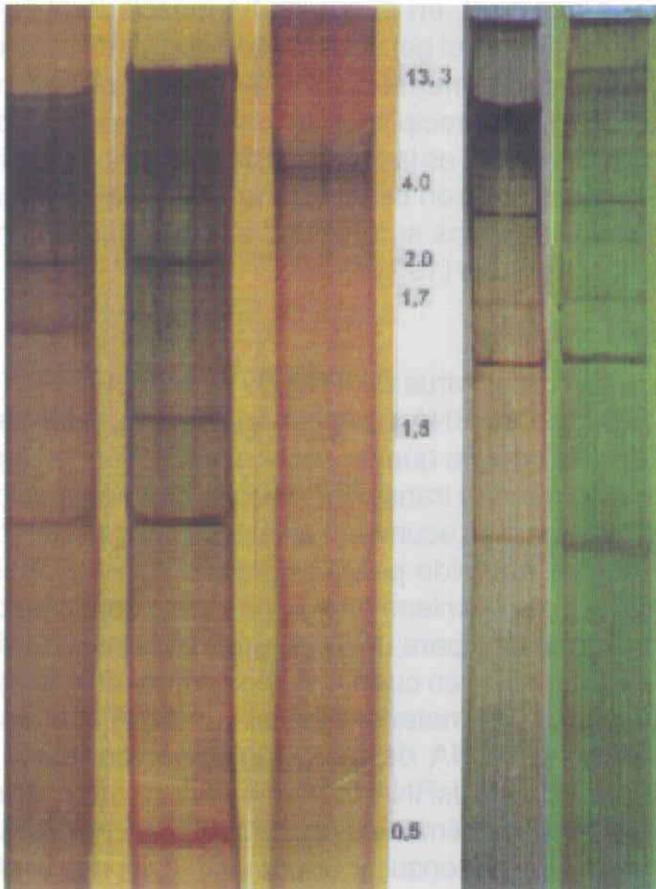
Patrones de dsRNA

La replicación de un virus de RNA de cadena sencilla (ssRNA) produce moléculas de RNA complementarios de igual tamaño al segmento del genoma, lo que se conoce como Forma Replicativa (RF). De esta se pueden transcribir RNAs subgenómicos de doble cadena (dsRNA), que se acumulan en el tejido vegetal infectado. El patrón de bandas obtenido por la migración de estos dsRNA en geles de agarosa o poliacrilamida es usualmente considerado como una prueba diagnóstica para un virus, grupo o familia de virus. Sin embargo, se debe tener en cuenta el tipo de huésped, la época del año de recolección del material vegetal y la cepa viral analizada. Los marcadores de RNA de peso molecular conocido y/o los patrones de bandas de dsRNA determinados en otros virus sirven como referencia para estimar los pesos moleculares. Para más información sobre el tema consultar Doods (1993), Doods *et al.* (1987), Valverde *et al.* (1996), Moreno *et al.* (1993) o Guzmán *et al.* (2002).

Amplificación de genes por RT-PCR

Tanto en animales, como en vegetales, hongos, bacterias, virus, viroides y fitoplasmas, la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa –PCR– (Saiki *et al.*, 1985) permitió la amplificación de genes y el estudio de variantes génicas y de genomas. Cualquier estrategia de análisis molecular para, por ejemplo, la determinación de variantes parte de la implementación de esta metodología de PCR o de RT-PCR, para el caso de virus con genoma de RNA. Después, la exposición de los genes o fragmentos amplificados a las enzimas de restricción generan los RFLPs o fragmentos de restricción de longitud polimórfica. Esta metodología es ampliamente

Figura 43. Patrones de dsRNA del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV). Valores en kDa.



Tomado de: Guzmán *et al.*, 2002

conocida dentro de la biología molecular y ha sido implementada con éxito en cítricos (Gillings, 1993; Oliveros, 2001; Delgado *et al.*, 2004) y para la estimación de variantes de campo del virus del amarillamiento de venas de la hoja de papa –PYVV– (Guzmán *et al.*, 2004). De otra parte, si los productos de PCR se hacen migrar en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, la migración desigual de las cadenas hermanas se podrá determinar fácilmente por patrones específicos, con la técnica conocida por SSCP (polimorfismo conformacional de cadena sencilla). Esta metodología ha sido implementada para determinar variantes del Virus de la Tristeza de los Cítricos (Rubio *et al.*, 1996) y en algunos

aislados de PYVV de aislados colombianos de papa (Offei *et al.*, 2004). Tanto la técnica de RFLPs como de SSCP permite evaluar mutaciones de tipo puntual (Gillings *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 2000). En el laboratorio de virus vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia se está utilizando la técnica de SSCP para evaluar posibles variantes de PYVV en los aislados de campo (Guzmán *et al.*, 2004).

IC-RT-PCR

De otra parte, para la amplificación de genes virales también se cuenta con otras metodologías «híbridas» sencillas, en las que se utilizan mezclas de técnicas serológicas y moleculares. Si se dispone de anticuerpos específicos contra un virus determinado es posible atrapar la proteína de la cápside del virus y de allí, con los cebadores adecuados, se puede utilizar la metodología de IC-RT-PCR (Inmuncaptura-transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa) PCR para amplificar el gen deseado. Ejemplos positivos de detección viral se tienen con el Virus de la Tristeza de los Cítricos (Nolasco, 1993; Guzmán, 1998), Virus del Mosaico Medio del Ñame (YMMV) y del Mosaico del Ñame (YMV) (Guzmán *et al.*, 2001) y otros. En papa, la metodología de IC-RT-PCR se ha utilizado también en el laboratorio de virus del IBUN para la detección de los virus Potyvirus PVY y Tuija Kekarainen *et al.* (2002) detectaron el PVA.

En el Capítulo 6 aparece un ejemplo de la técnica de IC-RT-PCR utilizada para la detección del Virus de la Tristeza de los Cítricos (Guzmán, 1998).

Hibridación con sondas marcadas

Los métodos modernos para la detección de virus se basan en la identificación de componentes moleculares específicos del agente patógeno. Las proteínas virales se pueden detectar por métodos serológicos (inmunofluorescencia, radioinmunoensayo, ELISA) pero el material genético del patógeno (ácido nucleico) puede detectarse por medio de ensayos de hibridación, en el cual el genoma del patógeno se pone a prueba, por lo que esta metodología permite la diferenciación de cepas virales, que tienen cápsides protéicas similares, pero que manifiestan diferencias en

patogenicidad o transmisibilidad de vector. Las sondas de ácidos nucleicos son secuencias cortas con longitudes entre 10 y 20 nucleótidos que son complementarias a una parte del ácido nucleico viral amplificado (cDNA). Para la detección viral, las sondas se pueden marcar radioactivamente o se pueden usar con otras marcaciones como la biotina o digoxigenina, etc. Para mayor información sobre este tema consultar Nikolaeva (1995).

Hibridación de tejido impreso

En esta técnica la impresión de tejido se realiza sobre una membrana de nitrocelulosa o de nylon a partir de un macerado de savia de la planta infectada. La membrana tiene alta afinidad por el DNA o RNA y así se puede inmovilizar los ácidos nucleicos. La presencia de cápsides virales no inhibe la unión del ácido nucleico viral a la membrana. El RNA o DNA de doble cadena no se une a la membrana, y el tejido de la planta debe denaturarse previamente con glyoxal o alcali, previo a la impresión sobre la membrana. Se utilizan posteriormente sondas de ácido nucleico marcadas, capaces de hibridar con segmentos del genoma del patógeno (para mayor información consultar Chia *et al.*, 1995).

Secuenciamiento de nucleótidos de genes específicos y de genomas

Para muchos grupos de virus fitopatógenos se ha realizado el secuenciamiento de nucleótidos, ya sea la secuencia completa de una cepa particular o secuencias de un gen particular, como por ejemplo, el gen de la proteína de la cápside o de otros genes no estructurales.

El secuenciamiento de genes se puede obtener por clonación de moléculas únicas de DNA del gen de interés en un vector plasmídico mantenido dentro de una bacteria. La comparación de secuencias de genes provenientes de diferentes clones permite tener un estimativo de la proporción o pureza de una variante viral determinada en un aislado específico. También se puede realizar el secuenciamiento automático del gen de interés a partir de un PCR directo purificado. En este caso, el azar decide si se amplifica la secuencia viral de la población mayoritaria o de una minoritaria. El secuenciamiento de ácidos nucleicos y la deducción de los

aminoácidos de las proteínas que codifican es una herramienta que ha permitido contar con mucha información para realizar análisis filogenéticos, de correlación entre y dentro de grupos virales y con sintomatologías específicas (Pappu *et al.*, 1993; Guzmán *et al.*, 1994; Lieveratus *et al.*, 2004; Offei *et al.*, 2004). La información sobre secuencias de fitovirus es abundante y se encuentra en la base de datos del Genbank. En la Figura 44 se presenta un ejemplo de aminoácidos deducidos a partir de una secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína de la cápside de diferentes *Crinivirus*.

Figura 44. Secuencias de aminoácidos deducidas de nucleótidos. Compartación de diferentes *Crinivirus*.

		10	20	30	40	50																																												
CYSDVCPm	372	: Q	E	E	A	N	L	R	M	Y	S	Q	I	F	K	L	K	D	G	V	L	V	P	Q	W	S	--	H	V	K	R	N	F	K	E	E	C	A	Y	M	A	C	F	Y	D	:	38			
SPCSVCPm	597	: Q	V	E	T	L	R	N	R	S	D	K	I	F	R	L	K	A	K	V	L	V	L	P	L	K	--	H	A	V	R	G	I	R	P	E	M	A	H	M	A	C	F	M	D	:	38			
CuVYVCP	161	: D	N	I	D	O	Y	L	R	G	N	E	N	Q	V	A	I	L	R	A	T	G	K	L	K	S	D	G	H	--	L	A	A	K	H	G	T	T	Q	F	W	D	S	T	S	:	42			
PYVYVCP	164	: S	P	L	Q	Y	M	H	L	C	E	N	Q	I	E	M	L	K	S	S	G	K	V	S	D	G	H	--	L	A	A	K	H	G	T	T	Q	Y	S	S	S	S	S	:	42					
CuVYp59	429	: I	M	L	Q	W	A	N	K	R	S	Y	R	A	L	T	L	F	R	S	A	N	F	D	P	G	----	F	F	S	V	P	G	I	L	P	M	R	F	P	Y	K	:	43						
PYVYp60	429	: M	V	L	Q	W	A	N	S	R	S	G	R	A	M	R	L	F	R	S	L	N	F	N	P	G	----	L	F	S	Y	C	P	G	I	L	O	Y	M	R	F	P	Y	K	:	47				
CYSDVp59	429	: D	N	I	D	Q	W	A	N	H	R	G	N	R	A	M	L	F	K	V	S	G	F	K	P	G	----	L	F	S	T	V	P	N	I	L	P	W	M	R	F	P	Y	K	:	44				
SPCSVp60	430	: N	L	I	D	Q	W	A	N	H	R	G	D	R	A	M	F	K	I	C	E	Y	H	P	G	----	L	F	S	I	P	R	I	D	N	M	R	F	P	Y	K	:	43							
CuVYCPm	570	: Q	V	E	T	L	R	S	R	S	L	I	F	N	L	K	R	K	Q	L	E	N	F	H	L	--	H	A	Q	R	R	G	L	R	P	E	F	A	Y	M	A	C	F	Y	D	:	38			
CYSDVCP	158	: P	P	P	Q	Y	A	R	A	H	E	H	E	I	L	K	A	T	G	K	V	T	V	D	H	--	L	Q	A	K	H	G	V	L	P	Q	F	Q	W	V	P	A	F	Y	V	N	:	44		
PYVYCPm	587	: R	V	E	T	L	R	S	R	S	A	E	I	L	E	K	L	R	N	R	V	L	I	W	P	K	T	----	H	A	N	K	R	G	L	P	E	Y	A	I	L	A	C	F	P	K	:	38		
SPCSVCP	164	: R	A	A	R	Q	M	A	R	A	H	A	N	D	Y	K	V	L	V	G	L	G	I	V	K	P	D	H	--	L	Q	A	K	O	G	V	L	P	E	Y	W	H	L	A	T	P	M	R	:	45
LIYVp59	426	: S	P	L	Q	Y	M	C	N	K	R	S	N	L	A	L	G	V	F	K	S	R	N	I	Q	L	Y	----	L	Y	S	K	Y	P	R	L	N	Y	M	R	F	P	Y	K	:	43				
LIYVCPm	365	: H	L	E	V	L	R	H	Y	A	Q	K	I	L	L	R	S	K	V	L	E	W	P	R	K	----	L	A	R	N	G	I	P	E	Q	A	Y	M	A	C	F	F	D	:	38					
LIYVCP	155	: P	P	P	Q	Y	A	R	A	M	E	T	I	N	N	I	R	S	A	G	I	I	N	S	G	V	--	L	A	A	K	H	G	V	L	A	S	Y	R	N	S	Y	F	A	V	:	45			
LChV-1p60	428	: R	V	I	L	F	C	S	K	R	A	N	L	A	I	R	V	N	E	K	F	Q	P	T	----	V	M	E	K	C	P	K	V	L	P	Y	M	K	I	P	Y	K	:	44						
LChV-1CPm	581	: I	L	P	R	Y	L	R	S	C	T	V	E	V	L	E	L	R	I	G	T	L	S	P	S	E	G	--	R	A	T	M	L	I	P	H	O	F	A	P	L	A	C	F	W	N	:	34		
LChV-1CP	308	: E	A	E	R	F	A	K	K	E	Y	N	A	I	Q	N	A	L	A	A	G	Y	V	S	S	E	R	--	L	A	A	K	G	A	A	P	N	K	R	G	V	S	A	T	P	:	47			
CTVp61	406	: I	V	S	P	Q	M	G	R	S	E	V	A	L	R	L	Y	R	N	L	G	L	R	F	P	P	I	S	S	V	R	L	P	A	N	H	O	G	L	Y	V	----	P	Y	K	:	82			
GLRaV-3p55	400	: I	A	Q	V	L	C	R	Y	S	D	L	T	C	L	A	R	R	H	Y	G	I	R	R	N	N	K	T	L	S	Y	V	D	O	T	L	----	A	Y	D	A	C	I	T	:	35				
GLRaV-3CP	221	: E	P	P	Q	Y	L	A	Y	P	T	P	T	F	I	T	A	T	L	N	G	L	V	N	E	K	--	V	M	A	Q	H	G	V	P	P	K	F	P	P	Y	T	L	C	V	R	:	43		
GLRaV-3CPm	387	: T	T	V	S	F	M	R	Y	F	A	H	T	T	I	T	L	L	I	E	K	K	I	Q	P	A	C	T	--	A	L	A	K	H	G	V	P	K	R	F	T	P	Y	C	F	A	L	:	41	
CTVCPm	147	: E	A	L	R	F	A	C	T	F	E	L	H	L	C	M	A	R	L	R	F	O	L	Y	E	N	K	--	R	T	T	R	A	G	T	P	H	E	G	L	S	A	F	L	S	:	44			
CTVCP	132	: T	A	L	E	V	M	G	R	T	N	D	A	L	Y	L	A	P	C	R	Q	R	N	L	S	Y	G	G	--	R	P	L	D	A	G	I	P	A	G	Y	H	L	C	A	P	L	T	:	42	

Las líneas negras denotan aminoácidos comunes entre las especies analizadas (tomado de Salazar *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 6

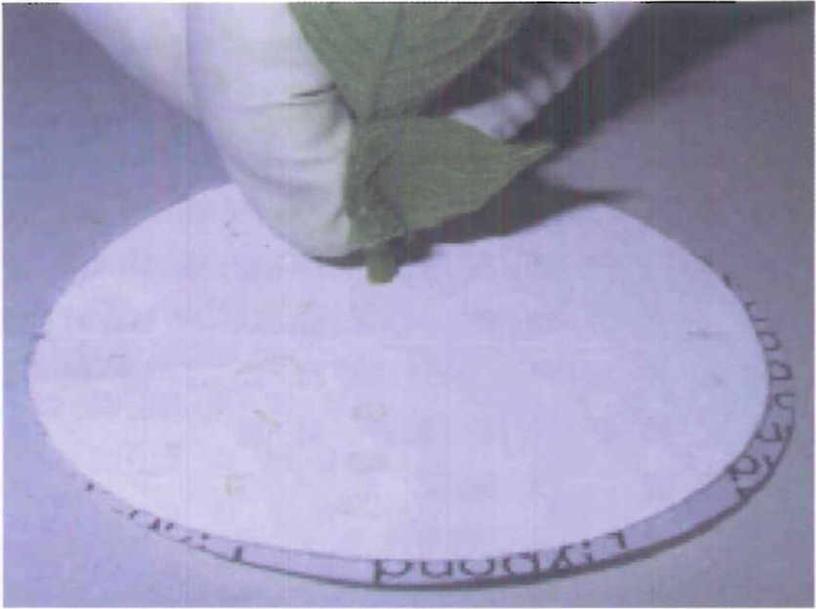
ALGUNAS TÉCNICAS ADAPTADAS EN EL LABORATORIO DE VIRUS VEGETALES – IBUN Y PROTOCOLOS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS QUE INFECTAN PAPA

Técnicas serológicas

Inmunoimpresión IMI

- Cortes de material vegetal (pecíolo, tallo, hojas) se imprimen suavemente sobre una membrana de nitrocelulosa de 45 μm . Del mismo corte se realiza una segunda impresión.
- Dejar secar por 5 minutos.
- Colocar de 10 a 15 ml de leche descremada al 5% en PBS o TBS durante 1 h o durante la noche a 4°C.
- Agitar suavemente y descartar.
- Adicionar el anticuerpo primario a la dilución descrita por el kit de la casa comercial en 15 a 20 ml de buffer ECI.
- Dejar 1 h en agitación lenta a 37°C o 2 h a temperatura ambiente. Descartar.
- Lavar 3 veces durante 5 minutos con PBST.

Figura 45. Técnica de inmunopresión (IMI). Impresión de tejido sobre membrana de nitrocelulosa.



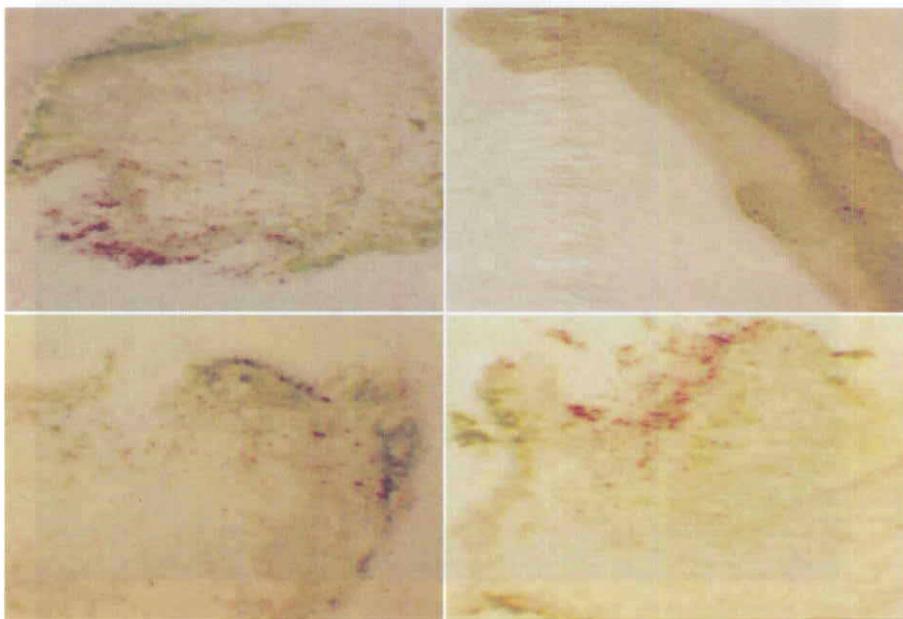
- Adicionar el anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina en buffer ECI, según la dilución adecuada.
- Dejar actuar por 2 h, agitando a 37°C o a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces durante 5 minutos con PBST en agitación suave.
- Adicionar el sustrato de la enzima fosfatasa: nitro-blue-tetrasodio/bromo-cloro-indol-fosfato (NBT/BCI) y dejar actuar hasta la aparición de coloración violeta en las muestras positivas.
- Se lava abundante y cuidadosamente con agua destilada.
- Es cualitativa y se efectúa al estereoscopio, donde se observa un precipitado violeta oscuro.
- Observar directamente o bajo estereoscopio.

La Figura 46 presenta varios cortes de tejido con concentraciones virales diferentes.

Buffer de anticuerpo y conjugado

- 0,2 g de albúmina de suero bovino (BSA).
- 2 g de polyvinylpyrrolidona (PVP) peso molecular 24-40.000.
- 0.02 g de Azida de sodio (opcional).

Figura 46. Diferentes grados de infección en impresiones de tejido infectado por virus (PVY, PVX, PLRV, PVS).



La coloración violeta corresponde a una muestra virus positiva. Muestra negativa sin coloración. Microfotografías con estereoscopio. Ampliación 40 x 20.

- Llevar a 100 ml de PBST 1X.
- Ajustar pH a 7,4.
- Almacenar a 4°C.

Substrato NBT/BCIP y Buffer

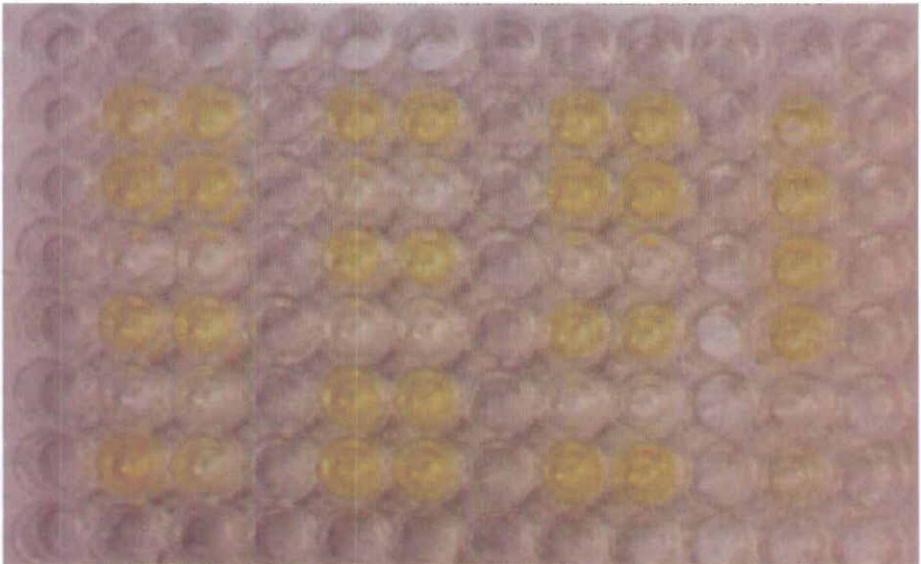
- Si se cuenta con pastillas SIGMA FAST se macera la pastilla dentro de su envoltura se vierte el contenido en 12 ml de agua destilada (producto altamente tóxico y cancerígeno, maneje con cuidado)
- También se prepara a partir de polvo de NBT (40 mg de NBT en 2 ml de formamida al 70% y BCIP (20 mg de BCIP en 2 ml de dimetil formamida) que también se encuentran preparados por separado. Se prepara una solución amortiguadora con:
 - Tris 0.605 g
 - NaCl 0.292 g

- Mg Cl 2 6 H2 O 0.051 g
 - llevo a 500mL con agua destilada
 - pH 9.5
- Se toman 20 ml de la solución amortiguadora y se le adiciona 100 ?L del stock NBT y 100 ?L del stock BCIP

ELISA

Una placa de ELISA con la detección de virus de papa (PVY, PLRV, PVX, utilizando anticuerpos específicos se ilustra en la Figura 47. La coloración amarilla confirma la presencia del virus (virus positivo) y la coloración transparente confirma la condición virus negativo (Guzmán *et al.*, 2001).

Figura 47. Placa de ELISA positiva para virus (color amarillo fuerte)



Protocolo ELISA indirecto (DASI)

- Recubrir la placa de ELISA con anticuerpo policlonal en dilución 1:100 en buffer coating (o la dilución indicada por casa comercial).
- El anticuerpo se diluye en tampón de carbonato (Buffer de cubrimiento estéril) a pH 9,6.

- Incubar la placa durante 3 h a 37°C.
- Descartar buffer de cubrimiento.
- Lavar placas 4 veces por 3 minutos con PBS-T.
- Adicionar 100 μ l de antígeno (material vegetal contaminado) macerado en buffer de extracción (1:10, p/v).
- Incubar toda la noche a 4°C.
- Lavar con PBS-T 5 veces por 3 minutos.
- Adicionar 100 μ l del anticuerpo monoclonal en el buffer PBST y BSA 0,5.
 - Incubar durante 3 h a 37°C. Descartar monoclonales.
 - Lavar 3 veces por 3 minutos con PBS-T.
- Adicionar el anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (GAM)-AP, diluido en 1:10,000 en buffer ECI.
- Lavar con PBS-T
- Adicionar 100 μ l de sustrato de fosfatasa (p-nitrofenil fosfato - PNP-). Utilizar una pastilla de 5 mg macerada en 5 ml de buffer sustrato. Mantener en oscuridad.
- Leer la absorbancia de los pozos en lector de ELISA con filtro de 405 nm, 30 minutos y 1 hora despues (también puede leerse después de toda la noche si se mantienen las muestras a 4°C).
- Detener la reacción con 30 μ l de NaOH 3M.

Protocolo DAS ELISA

Se utiliza el mismo anticuerpo policlonal para la fijación en la placa como para la detección del virus. Las diluciones se realizan según la indicación de la casa comercial. Como conjugado a la fosfatasa alcalina se usa el GAR-AP (*Goat anty Rabbit*). Los lavados entre los pazos y los tiempos de lectura son similares a los presentados para ELISA- DASI.

Buffer de anticuerpo y conjugado (ECI).

- 0,2 g de albúmina de suero bovino (BSA).
- 2 g de polyvinylpyrrolidona (PVP) peso molecular 24-40.000.
- 0,02 g de Azida de sodio (opcional).

- Llevar a 100 ml de PBST 1X.
- Ajustar pH a 7,4.
- Almacenar a 4°C.

Buffer de extracción/preparación de antígeno

- 1 L PBS-T
- 20 g polivinil pirrolidone (PM 40000)

En este buffer se maceran las muestras (concentración 1:10 de nervadura o tallo) dentro de bolsas plásticas o en mortero. El homogenizado se centrifuga en tubos eppendorf a 6.000 rpm por 5 minutos. Luego se toma el sobrenadante, el cual contiene el antígeno. Se debe hacer un duplicado de cada muestra e incluir controles positivos y negativos.

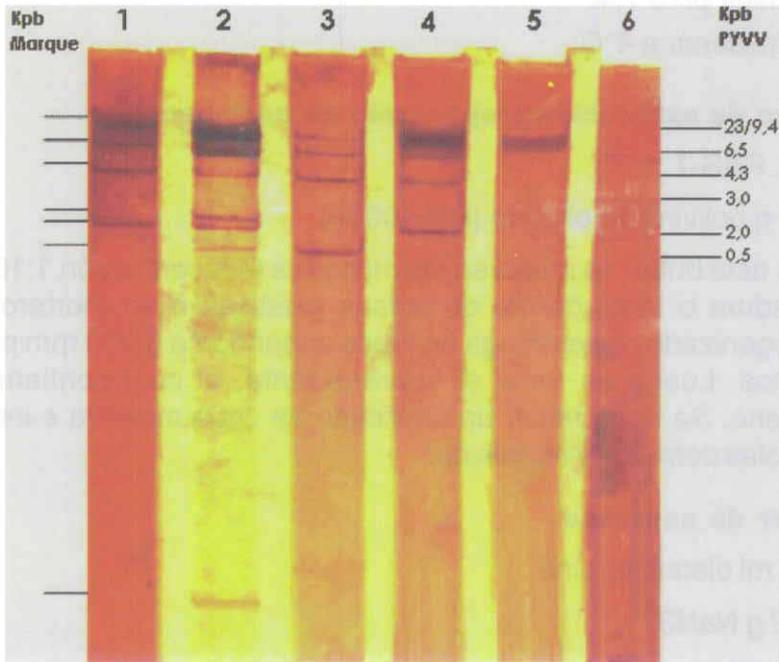
Buffer de sustrato

- 97 ml dietanolamina
- 0.2 g NaN₃
- pH 9.8 con HCl

Perfiles de dsRNA para PYVV

La metodología de dsRNA fue adaptada para PYVV a partir de la técnica de extracción de dsRNA del CTV adaptada por Guzmán entre los años 1994 y 1998, basada en las propuestas de Doods (1984), Moreno *et al.* (1990) y Valverde (1996). Para el PYVV se realizaron algunas modificaciones como el uso de una mayor cantidad de material vegetal (20-30 g de hojas y nervaduras mientras que se utilizan 3 a 7 g de corteza para cítricos). Además, se adicionó mercaptoetanol para los extractos de papa. La técnica de dsRNA para PYVV se ilustra en la Figura 48 que se obtuvo dentro del trabajo de tesis de Nancy Arciniegas (2003). Se observan 4 bandas conspicuas con pesos moleculares entre 9,0 y 2,5 Kb que pueden corresponder al RNA genómico y a dsRNA defectuosos. También Salazar (2000) y Livieratus *et al.* (2004) reportan patrones similares para un aislado peruano.

Figura 48. Patrones de dsRNA de aislados de PYVV de Cundinamarca



Tomado de: Arciniegas *et al.*, 2004).

Técnica

- Tomar de 20 a 30 g de la muestra y macerar en Nitrógeno líquido.
- Trabajar en cámara de extracción.
- En un erlenmeyer de 250 ml colocar:
 - 14 mg de Bentonita.
 - 14 ml de STE 2X.
 - 2 ml de SDS 10%.
 - 20 ml de fenol saturado en STE 1X.
 - 60 µl de mercaptoetanol.
 - muestra macerada.
- Agitar por 1 hora a 4°C o a temperatura ambiente.
- Pasar la muestra a tubos resistentes a fenol y centrifugar a 8.000 rpm durante 30 minutos.

- Con pipetas Pasteur tomar el sobrenadante y pasar por papel filtro.
- Medir en probeta la cantidad de filtrado obtenida.
- Para cada 20 ml de muestra se adicionan 4,2 ml de etanol al 95% (realizar el cálculo).
- El dsRNA queda en etanol al 16%.
- Adicionar de 1,5 a 2,0 g de celulosa CF 11.
- Agitar suavemente toda la noche.
- Cortar agujas de jeringas.
- Introducir a la base un tapón de fibra de vidrio estéril.
- Sujetar las jeringas a las paredes del erlenmeyer que colecta residuos de lavado.
- Depositar el dsRNA equilibrado en etanol al 16% con jeringas (se obtiene la columna decantada).
- Lavar con 60 ml de STE 1X con etanol al 15%.
- Presionar suavemente con el émbolo de la jeringa.
- Descartar el deshecho del erlenmeyer de lavado.
- Sujetar la jeringa a un erlenmeyer nuevo.
- La columna decantada y lavada se eluye con 14 ml de STE 1X sin etanol (aquí se obtiene el dsRNA puro)
- Medir cantidad obtenida.
- Precipitar el dsRNA con 2,5 vol de etanol absoluto al 95% (a -20°C) y 0,1 vol de acetato de sodio 3M pH 5,5 (NaOAC)
- Conservar a -20°C mínimo por toda la noche en tubos Falcon.
- Centrifugar a 8.000 rpm por 40 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender y centrifugar los eppendorf a 8.000 rpm durante 10 min.
- Descartar el sobrenadante.
- Secar el precipitado al vacío durante 10 minutos.
- Adicionar entre 40 µl y 100 µl de buffer TAE 1X.
- Conservar los eppendorf a -20°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

1. Preparar 1.000 ml de TAE 10X	<ul style="list-style-type: none"> •Tris 48,5 g •Acetato de sodio 27,25 g •Na₂ EDTA 3.7 g •Agua destilada estéril 800 ml •pH 7,8 con ácido acético •Llevar hasta 1.000 ml
2. Preparación stock acrilamida/bisacrilamida al 40%	<ul style="list-style-type: none"> •Acrilamida 29,2 g •Bisacrilamida 0,8 g •Llevar hasta 100 ml de agua destilada estéril
3. Armar la cámara vertical de electroforesis	<ul style="list-style-type: none"> •Limpiar vidrios, separadores, bandas de caucho y peines con etanol al 70% •Probar con agua destilada estéril que no hayan fugas •Recuerde que la acrilamida/bisacrilamida antes de polimerizar es tóxica
4. Preparar dos geles al 6% (a partir de un stock del 40%)	<ul style="list-style-type: none"> •3 ml de stock acrilamida/bisacrilamida al 40% •6 ml TAE 4X •11 ml agua destilada estéril •160 µl persulfato de amonio al 10% •16 µl de TEMED •Adicionar todo en un beaker pequeño •Alistar pipeta Pasteur
5. Dispensado geles 6%	<ul style="list-style-type: none"> •Una vez dispensados, éstos geles se pueden almacenar en la cámara envolviéndolos en papel toalla humedecido con buffer TAE 1X y llevar a 4°C
6. Dispensado de muestras	<ul style="list-style-type: none"> •En parafilm colocar 17 µl de cada muestra y uno o dos marcadores de RNA •3 µL de buffer de carga y resuspender •Se cargan los pozos con jeringa Hamilton que se introduce hasta el fondo de cada pozo y desde allí se dispensa la muestra •Sacar burbujas •Hacer recorrido por 10 minutos •Colocar tapa con electrodos coincidiendo colores rojo y negro •Ajustar la fuente de poder a 100 voltios y corriente constante •El lector indica errores o fugas (suena). Si esto ocurre, se apaga •Llevar la cámara a cuarto frío a 4°C y se inicia electroforesis a 100 voltios constantes durante 4 horas. Inmediatamente continuar protocolo de Tinción

Tinción con nitrato de plata según la técnica de Blum (1977)

1. Fijación	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar solución fijadora: 15 ml de metano l, 6 ml de ácido acético, 54 µl de agua destilada estéril y 45 µl de formaldehído • En una vasija plástica se saca el gel con agua destilada estéril y se bota el agua teniendo en cuenta que el gel no se caiga • Cortar los dientes del gel • Adicionar la solución fijadora • Agitar a 4°C toda la noche o un fin de semana
2. Lavados	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar solución: 30 ml de agua y 30 ml de etanol • Se efectúan 3 lavados de 20 minutos cada uno
3. Pretratamiento	<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 g/l de tiosulfato de sodio o 0106 g para 30 ml de agua destilada • Se agita suavemente por un minuto
4. Lavado	<ul style="list-style-type: none"> • 3 lavados con agua por 20 segundos cada uno
5. Impregnante	<ul style="list-style-type: none"> • Se prepara impregnante: 0,08 g de nitrato de plata AgNO₃, 22,5 µl de agua destilada, agua hasta 30 ml. Se adiciona al recipiente con el gel. • Tapar recipiente con papel aluminio • Agitar por 45 min a 4°C
6. Lavados	<ul style="list-style-type: none"> • 2 lavados con agua de 20 segundos cada uno
7. Revelado	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar: 1,8 g de carbonato de sodio, 15 µl de formaldehído, 600 µl de tiosulfato de sodio en 2 g/l de agua y agua hasta 30 ml. Adicionar al gel. • Agitar hasta aparición de bandas
8. Lavados	<ul style="list-style-type: none"> • Con agua • Uno rápido, otro por 2 min
9. Fijador	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar: 15 ml de metanol, 3,6 ml de ácido acético, 30 ml de agua • Agitar por 10 minutos a 4°C

Preparación de molde de RNA a partir de TRIZOL (Gibco BLR)

1. Pesar 200 mg de tejido vegetal.
2. Homogenizar con 1 ml de TRIZOL.
3. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Adicionar 200 µl de cloroformo, agitar vigorosamente por 15 segundos.
5. Incubar 3 minutos a 30°C.
6. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C.
7. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo eppendorf.
8. Adicionar 500 µl de isopropanol y mezclar muy bien.

9. Incubar a 30°C por 10 minutos.
10. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a 5°C.
11. Encender baño seco a 55-60°C.
12. Remover el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 75%.
13. Agitar con vortex y centrifugar a 7.500 rpm por 5 minutos a 5°C.
14. Descartar el sobrenadante
15. Secar el precipitado al vacío 10 minutos.
16. Resuspender en 20 µl de agua libre de RNasas (con Dietil Piro Carbamato).
17. Incubar a 55-60°C por 10 minutos.
18. Guardar a -20°C.

Preparación del molde de dsRNA (Técnica de Pappu et al., 1993 - Guzmán, 1994, Guzmán et al., 1994)

A Sephadex: Adicionar 2,5 g de Sephadex G-50 a 50 ml del TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) y esterilizar. Cuando esté frío, retirar el líquido utilizando pipeta Pasteur y adicionar nuevo TE estéril, resuspender. Repetir 3 a 4 veces para remover impurezas finas y dextran soluble. Mantener a 4°C dejando TE sobre el Sephadex.

Extracción de RNA

1. En una gradilla se colocan tres tubos eppendorf (tapa rosca) por muestra correctamente marcados.
2. Macerar en nitrógeno líquido 1 g de tejido hasta pulverizar y congelar inmediatamente a -20°C. Pesar 300 mg de cada muestra en uno de los tubos de 1,5 ml, inmediatamente colocar el tubo eppendorf dentro de nitrógeno líquido.
3. Adicionar 500 µl de buffer de extracción (2% SDS, 0,1M Tris pH 8,0 y 2 mM EDTA), 500 ul de fenol (Tris pH 8,0) – cloroformo (1:1) (es decir 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo), vortex suave.
4. Colocar en hielo hasta procesar 4 muestras.
5. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante al segundo tubo eppendorf de tapa rosca nuevo y rápidamente congelarlo en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso (muestra color amarillo indica dsRNA con impurezas).

7. Repetir hasta que todas las muestras estén congeladas.
8. Purificar dsRNA por medio de columna de exclusión de Sephadex G-50.
 - a. Colocar un pequeño tapón de fibra de vidrio estéril en una columna plástica de 1 ml (jeringa de insulina sin aguja). Colocar bolita hasta el extremo con la ayuda de un palillo de madera estéril.
 - b. Adicionar el Sephadex con pipeta Pasteur estéril hasta completar toda la superficie y sin hacer burbujas (aquellas con burbujas se descartan). Colocar la columna dentro de un tubo eppendorf y todo esto dentro de un tubo de centrifuga de 15 ml.
 - c. Centrifugar a 1.600 rpm por 4 minutos. Retirar el TE del tubo Falcon y continuar adicionando Sephadex hasta que el volumen de la columna sea de 0,9 ml.
 - d. Lavar la columna dos veces con 150 μ l de TE, centrifugando cada vez a 1.600 rpm por 4 minutos.
 - e. Aplicar 150 μ l de la muestra (del paso 6) y centrifugar a 1600 rpm por 4 minutos, la muestra queda en el tubo tapa rosca.
9. Recuperar el eluyente en un tubo eppendorf de tapa rosca, colocar el tubo en hielo, para procedimiento de PCR inmediato o congelar a -80°C (muestra transparente: dsRNA purificado).

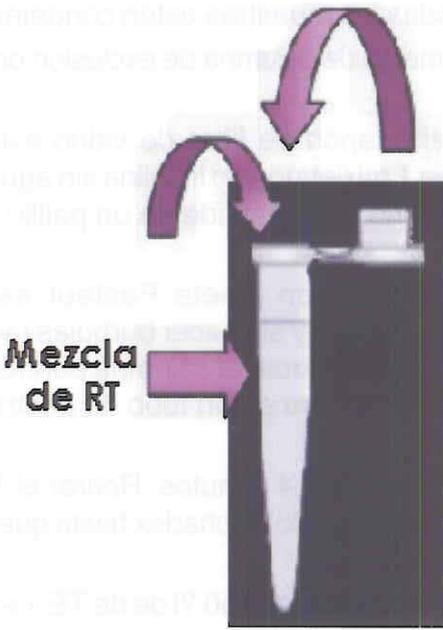
Amplificación de genes por RT-PCR para la detección de PYVV

Extracción del RNA

- a) Con el reactivo Trizol (Gibco) siguiendo las indicaciones de la casa comercial se obtiene RNA total.
- b) Con Fenol-Cloroformo y purificación con columna de Sephadex G-50.

Protocolo en un solo tubo

- a) A partir de molde de trizol o dsRNA
- b) A partir del extracto purificado por Sephadex
- c) Mezcla de RT-PCR



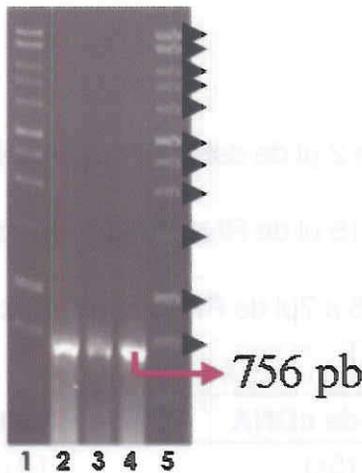
Mezcla RT-PCR	Volumen de 25 μ l
10 X PCR	2.5 μ l
100mM DTT	1 μ l
MgCl ₂ 25mM	1 μ l
dNTPs (mezcla 10 mM)	2 μ l
Cebador 3' (100 pmol)	1 μ l
Cebador 5' (100 pmol)	1 μ l
Agua ultra pura	a completar
Inhibidor de RNasa (40U/?l)	0,5 μ l
MMLV (200U/?l)	1 μ l
Taq (5U/?l)	0,6 μ l
Molde de RNA Sephadex (70°C x 5')	15 μ l

Centrifugación rápida y se coloca en amplificación en las siguientes condiciones:

1. 39°C por 60 minutos
2. 70°C por 15 minutos
3. 95°C por 5 minutos
 - 35 ciclos: 94°C por 1 minuto; 50°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto (la temperatura de anillamiento depende del cebador del virus a detectar)

La Figura 49 ilustra el producto de PCR del gen de la proteína de la cápside de PYVV (cebadores en Offei *et al.*, 2004; Lieveratus *et al.*, 2004).

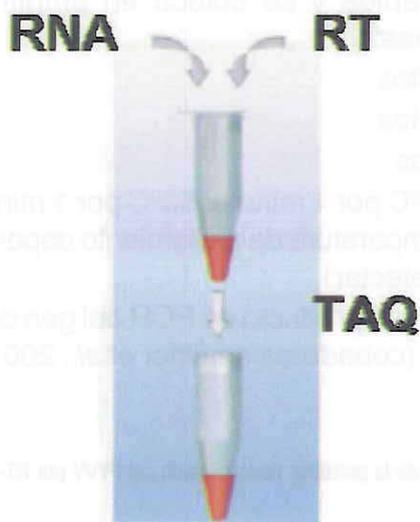
Figura 49. Detección del gen de la proteína de la cápside del PYVV por RT-PCR en un solo tubo.



Los carriles 1 y 5 corresponden a marcadores de peso molecular 1 Kb. Los carriles 2, 3, 4 corresponden a diferentes aislados de PYVV. Gel de agarosa al 1%, tinción con bromuro de etidio. Fragmento de 756. (Guzmán *et al.*, 2004).

Protocolo en dos tubos

En este caso, la reacción de transcriptasa reversa para la obtención del cDNA y la amplificación por PCR se realizan por separado, utilizando tubos diferentes como muestra el siguiente esquema.



1. Molde de RNA

- Se utilizan 2 μ l de dsRNA (de una dilución de 2 μ l en 10 μ l de agua)
- Se utiliza 15 μ l de RNA pasado por columna de Sephadex G-50
- Se utiliza 5 a 7 μ l de RNA obtenido por Trizol

2. Reacción de RT

Síntesis de cDNA	Volumen de 40 μ l
Buffer RT (5x)	10 μ l
DTT 100 mM	4 μ l
dNTPs 20 mM	1,2 μ l
Inhibidor de Rnasas 400U	1,25 μ l
Agua	22,55 μ l
MMLV (200 U/ μ l)	1,0 μ l

- Adicionar el RNA molde (pasado por 70°C por 7 minutos) a la mezcla anterior e incubar todo a 42°C por 1 hora. Inactivar a 70°C por 15 minutos. Colocar en hielo de inmediato.

3. Mezcla de PCR

Preparar la siguiente mezcla:

Buffer PCR 10X	10 μ l
MgCl ₂ 25mM	8 μ l
dNTPs 20mM	1,2 μ l
Cebador 5' 100pmol	1 μ l
Cebador 3' 100pmol	1 μ l
Agua	68,8 μ l
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0,5 μ l
cDNA	10 μ l
Volumen total	100 μ l

4. Condiciones de amplificación

1. 96°C por 5 minutos (1 ciclo).
2. 96°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos (32 ciclos).
3. 72°C por 10 minutos (1 ciclo).
5. Análisis en gel de agarosa al 1%

Cargar de 7 a 10 μ l de muestra. Se debe obtener una banda de 756pb.

Amplificación de genes por IC-RT-PCR

La técnica de IC-RT-PCR fue utilizada por Nolasco (1993), Guzmán (1998) y Guzmán *et al.* (2002) para la detección del CTV y de Virus del Ñame (YMV, YMMV). También, en el laboratorio de virus vegetales del IBUN se han obtenido resultados positivos con esta técnica para la detección de los Virus Y, PLRV y PVX de la papa. La técnica se basa en el uso de anticuerpos específicos para la fijación de la partícula viral en el tubo de PCR y posteriormente la utilización de todos los principios de la RT-PCR para la amplificación del gen deseado. El requisito es entonces disponer de un anticuerpo específico para un virus determinado. Además, la partícula viral deseada se fija sin residuos de la planta. Es una técnica considera-

da como «limpia» debido a que no se utilizan reactivos de riesgo como el fenol o el cloroformo, los cuales se requieren para la extracción de RNA por otras metodologías. Es, por lo tanto, útil para aquellos virus para los cuales se cuenta con anticuerpos.

Protocolo de IC-RT-PCR

Utilizar soluciones amortiguadoras, agua dd ultra pura, tubos y puntas estériles.

1. Fijación del anticuerpo específico

Se realiza adicionando a un tubo de PCR anticuerpos policlonales o monoclonales diluidos en buffer de cubrimiento (500 mM Tris-HCl, 2% PVP (40.000), 1% PEG 8.000, 140 mM NaCl, 0,05% de PBS-Tween, pH 8,2) en la dilución adecuada de 1 µg/ml o según la indicación de la casa comercial (generalmente con diluciones 1:100, 1:200 o 1:1000). El anticuerpo se deja fijar durante 4 h a 37°C.

2. Lavado con PBS-Tween

Retirar el anticuerpo y lavar con PBS-Tween estéril 3 veces por 5 minutos.

3. Antígeno

Se macera el material vegetal (hoja o corteza) en buffer de extracción de ELISA en dilución 1:10 (p/v). El macerado se centrifuga a 5.000 rpm durante 5 minutos. Se adicionan 100 µl de sobrenadante al tubo de PCR y se deja 4 h a 37°C o, alternativamente, se deja durante la noche a 4°C.

4. Lavado

PBS-Tween, dos veces por 5 minutos y el tercer lavado con agua dd ultra pura

5. Reacción de RT

Colocar el tubo de PCR a 70°C por 10 minutos, pasados los cuales se debe colocar en hielo inmediatamente.

- Adicionar 10 µl de la mezcla de RT

Mezcla RT	volumen de 10 μl
Agua ultra pura	2 μ l
Buffer PCR 5 X	2 μ l
DTT (100 mM)	1 μ l
Inhibidor de RNasa (20U/?l)	1 μ l
dNTPs (10mM)	2 μ l
Cebador reverso (100 pmol)	1 μ l
MMLV-RT (200U/?l)	1 μ l

- Incubar a 39°C durante 60 minutos (o según los requerimientos de la transcriptasa reversa, según la casa comercial)
- Llevar a 95°C por 5 minutos y luego a hielo de inmediato.
- Adicionar 40 μ l de mezcla de PCR y resuspender

Mezcla de PCR	volumen de 50 μl
Buffer 10X PCR	5 μ l
dNTPs (10mM)	2 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1 μ l
Cebador 3' (100 pmol)	1 μ l
Cebador 5' (100 pmol)	1 μ l
Agua ultrapura	29,475 μ l
Producto de RT	10 μ l
Taq 5U/?l	0.5 μ l

- Centrifugar rápidamente (spin) y llevar a termociclador

6. Condiciones de amplificación

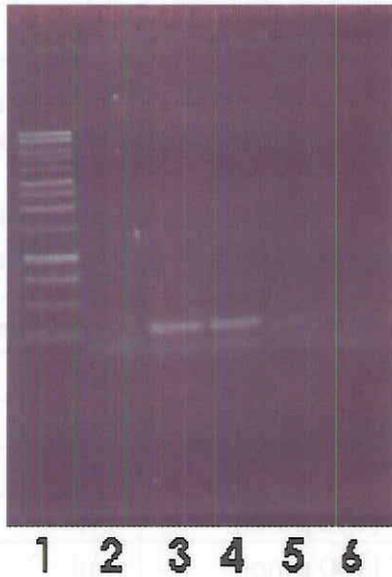
- 94°C por 3 minutos (1 ciclo)
- 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto (la temperatura de anillamiento según el cebador) (35 ciclos)
- 72°C por 10 minutos (1 ciclo)

7. Análisis en gel de agarosa

Los productos de PCR se corren en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X o TBE 1X durante 45 minutos. El gel se tiñe con bromuro de etidio a 50 µg/ml en buffer de electroforesis, durante 15 minutos.

La Figura 50 corresponde a los productos de PCR de la proteína de la cápside del Virus del Mosaico Medio del Ñame (YMMV).

Figura 50. Amplificación de la proteína de la cápside del Virus del Mosaico Medio del Ñame. Fragmento de 250 pb.



Carril 1: Marcador 100 pb. Carril 2: control negativo. Carriles 3 a 6: muestras positivas. (Guzmán *et al.*, 2001).

Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórficas (RFLPs)

Una manera sencilla para estimar variabilidad entre los genomas virales es a través de la obtención de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLPs). Para tal efecto, los productos de PCR se exponen a una o diferentes enzimas de restricción (*Hinf*1, *Eco*R1, *Pst*1, etc.) y los fragmentos se visualizan por migración en un gel de agarosa al 2 o 3%, teñido con bromuro de etidio o de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata.

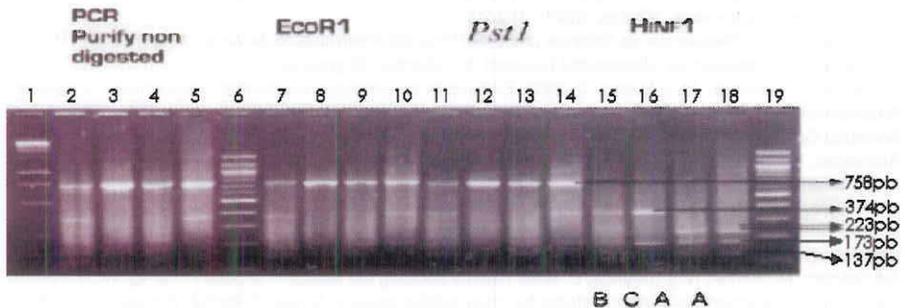
Producto de PCR	4 μ l
Buffer de enzima (10X)	3 μ l
BSA (10X)	0,3 μ l
Enzima de restricción	0,5 μ l
Agua ultrapura	22,2 μ l
Volumen total	30 μ l

Incubar la mezcla a 37°C por 4 h o más. Correr de inmediato 15 μ l en un gel de agarosa al 2% o 3% durante 45 minutos. Teñir el gel con bromuro de etidio.

Los fragmentos de restricción migran en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturalizantes. Se utiliza bromuro de etido o tinción con nitrato de plata.

La Figura 51 ilustra la restricción del PYVV con *Hinf*1, *Eco*R1 y *Pst*1.

Figura 51. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica –RFLPs– realizados con *Hinf*1, *Eco*R1 y *Pst*1 del PYVV



Tomado de: Guzmán *et al.*, 2004.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Alba, V. 1950. Viropatógenos. Conferencia Latinoamericana de Especialistas en Papa. Bogotá. p.52- 58.
- Albouy, J. y Devergne, J.C. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. Ediciones Mundi Prensa. Barcelona, pp:500.
- Agrios, G.N. 1998. Fitopatología. Segunda edición. UTHERA. Noriega Editores. México. 838
- Agronovsky, A.; Folimonova, S.; Folimonova, A.; Denisenko, O. y Zinovkin, R. 1997. The beet yellows closterovirus p65 homologue of HSP70 chaperones has ATPase activity associated with its conserved N-terminal domain but does not interact with unfolded protein chains. *Journal of General Virology* 78: 535-542.
- Alzhanova, D.V.; Hagiwara, Y.; Peremyslov, V.V. y Doljia, V.V. 2000. Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. *Virology* 268(1): 192-200.
- Arciniégas, N. 2003. Resistencia de *Solanum phureja* al Virus del Amarillamiento de Venas de la Papa PYVV. Tesis de Maestría en Fitopatología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, pp 115.
- Arciniégas, N.; Guzmán, M. y Núñez, C. 2003. Evaluación de genotipos resistentes y susceptibles al Virus del Amarillamiento de las Venas de la Papa (PYVV) en la colección central colombiana de *S. phureja*. VIII Congreso Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos. 2 a 5 julio 2003. Armenia. Página 86.
- Arciniégas, N.; Guzmán, M. y Núñez, C. 2003. Implementación de técnicas de diagnóstico para el Virus del Amarillamiento de las Venas de la Papa (PYVV). XXIV Congreso ASCOLFI: Fitopatología, Ciencia y Paisaje. 25-27 de junio. Armenia. Página 24.
- Arif, M.; Torrance, L. y Reavy, B. 1994. Improved efficiency of detection of potato mop-top furovirus in potato tubers and in the roots and leaves of soil-bait plants. *Potato Research* 37: 337-381.
- Arli Sokmen, M.; Barker, H. y Torrance, L. 1998. Factors affecting the detection of potato mop-top virus in potato tubers and improvements of test procedures for more reliable assays. *Annals of Applied Biology* 133: 55-63.
- Barker, H.; Reavy, B.; Kuamr, A.; Webstre, K. y Mayo, A. 1992. Restricted virus multiplication in potatoes transformed with the coat protein gene of PLRV: similarities with a type of host gene-mediated resistance. *Annals of Applied Biology* 120: 55-64.
- Barker, H.; McGeachy, K.; Ryabov, E.; Commandeur, U.; Mayo, M. y Taliensky, M. 2001. Evidence for RNA-mediated defence effects on the accumulation of Potato leafroll virus. *Journal of General Virology* 82: 3099-3100.
- Bahner, I.; Lamb, J.; Mayo, M. y Hay, R. 1990. Expression of the genome PLRV: read through the coat protein termination codon *in vivo*. *Journal of General Virology* 71: 2251-2256.
- Bawden, F. y Kassanis, B. 1947. The behavior of some naturally occurring strains of potato virus Y. *Ann. Appl. Biol* 34: 503-516.
- Beemster, A.B.R. and Rozendaal, A. (1972). In: Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production, p. 115; ed. J.A. de Bokx, Wageningen, PUDOC
- Beemster, A. y Bokx, J. 1987. Survey of properties and symptoms. *En: Viruses of potato and seed-potato production. Second Edition. Pudoc Wageningen.* pp 84-113. www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Potato_purple_top_wilt/POPTWO_ds.pdf

- Boonham, N.; Hims, M.; Barker, I. y Spence, N. 2004. Potato Virus Y from *Petunia* can cause symptoms of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *European Journal of Plant Pathology* 105(6): 617–621.
- Bové, C.; Vogel, R.; Albertini, D. y Bové, J.M. 1988. Discovery of a strain of citrus tristeza virus K, inducing no symptoms in Mexican lime. En: Proc. 10th Conf. IOCV, 14-16. IOCV Riverside, CA.
- Blum, H.; Beir, H. y Gross, H. 1987. Improved silver stained of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bruce A. McClure and Tom J. Guilfoyle (1989) Tissue print hybridization. A simple technique for detecting organ- and tissue-specific gene expression. *Plant Molecular Biology*, Volume 12, Number 5 / mayo de 1989
- Brunt, A.; Crabtree, K.; Dallwitz, M.; Gibbs, A.; Watson, L. y Zurcher, E. 1996. Plant viruses on line descriptions and lists from the VIDE Database. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Calvert, E.L. 1968. The reaction of potato varieties to potato mop-top virus. *Res. Exp. Rec. Minist. Agric. Nth. Ire.* 17: 31-40.
- Calvert, E.L. 1970. Mop Top Virus. *Agriculture in Northern Ireland* 45: 53-57.
- Calvert, E.L. y Harrison, B.D. 1966. Potato mop-top, a soil-borne virus. *Plant Pathology* 15: 134-139.
- Cambra, M.E.; Camarasa, E.; Gorris, M.T.; Garnsey, S.M. y Carbonell, E. 1991. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. En: *Proceedings of the 11th International Conference of Citrus Virologists (IOCV)* } Riverside, CA. p: 38-45.
- Chia, T.L.; Chan Y. y Chua, N.H. 1995. Tissue-Printing Hybridization for the detection and localization of plant viruses. En: *Molecular methods in plant pathology*. Singh and Singh Editores. Capitulo 11 p. 145 – 149.
- Christie, R. y Edwardson, R. 1982. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Experiments stations monograph series*. University of Florida, Gainesville. pp: 64.
- Christine Tiré, Marc Van Montagu and Gilbert Engler. A new method to perform nonradioactive tissue printing using digoxigenin-labeled riboprobes. *Plant Molecular Biology* 11 (3) 1993.
- Colavita, L; Massa, G y Feingold M. L (2007). En la búsqueda de razas recombinantes de PVY. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Resumen presentado a la «13th Reunión de la European Association for Potato Research (EAPR), sección Virología».
- Coutts, R.H. 2003. Potato yellow vein virus: a whitefly-transmitted closterovirus with a tripartite genome. www.bio.ic.ac.uk/research/rhac/coutts.htm
- Davis, J.; Radcliffe, T. y Ragsdale, D. 2003. (Abstract of paper to be presented at annual meeting of Potato Association of America, Spokane, WA, August 10-14, 2003).
- Delgado, J.; Guzmán, M. y Caicedo, A. 2004. Rastreo del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en el banco de germoplasma de cítricos de Palmira y análisis preliminar de variantes virales por técnicas serológicas y moleculares. XXX Congreso ASCOLFI. 5
- Doods, J.R. 1993. dsRNA in Diagnosis. En: Matthews (ed). 1993. *Diagnosis of Plant virus diseases*. CRC Press. London. pp274- 294.
- Dodds, J.; Jordan, R.; Roistacher, C.N. y Jarupat, T. 1987. Diversity of Citrus Tristeza Virus isolates indicated by dsRNA analysis. *Intervirology* 27: 177-188.
- Dolja, V.V., Herndon, K., Piron, T and Carrington, J.C (1993). Spontaneous mutagenesis of a plant *Potyvirus* genome after insertion of a foreign gene. *J Virol.* 1993 October; 67(10): 5968-5975
- Eugene, S.; Germundsson, A.; Zamyatnin, A. y Valkonen, J. 2005. In: [Research, Plant Biology and Forest Genetics, SLU www2.vbsg.slu.se/rap04/prog2/EugeneS_pomovirus.html](http://www2.vbsg.slu.se/rap04/prog2/EugeneS_pomovirus.html)
- Franco, L. 1998. Transformation of Solanaceous species with the Protein gene and full-length cDNA of Potatol leafroll virus. PhD Thesis. University of Dundee. Dundee, Escocia. Pp. 240
- Gaston, S.M., Soares, M.A., Siddiqui, M., Vu, D., Lee, J.M., Goldner, D., Brice, J.M., Shih, J., Upton, M., Perides, G., Baptista, J., Lavin, J., Bloch, N., Genega, E., Rubin, A y Lenkinski (2005). Tissue-print and print-phoresis as platform technologies for the molecular analysis of human surgical specimens: mapping tumor invasion of the prostate capsule *Nature Medicine* 11, 95-101
- German-Retana, S.; Cadress, T. y Martelli, G. 1999. Closteroviruses (Closteroviridae). En: Granoff A. y Webster, R. 1999. *Encyclopedia of Virology*. Second Edition. Vol 1. p. 266 -273.
- Gibbs, A. y Harrison, B. 1976. *Plant Virology. The Principles*. Edward Arnold Publishers. London. In: *Virus of Plants in Australia - Introduction*
- Gillings, M.; Broadbent, P.; Indsto, J. y Lee, R.F. 1993. Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 44: 305-317.
- Giraud, M.H. 1980. *Virologie générale et moléculaire*. Doin. Paris 617
- Granoff. A y Webster, R. 1999. *Enciclopedia de Virología*. Vol 3. Academic Press New York, pp: 680
- Guzmán M.; Verniere, C.; Niblett, C. y Bové, J.M. 2002. Biological, serological and molecular characterization of two isolates of CTV from Corsica. En: 15 Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV. pp158-163.

- Guzmán, M.; Arciniegas, N. y Ruiz, E. 2004. Reconocimiento del virus del amarillamiento de las venas de la papa (PVV) en tres departamentos colombianos y estimación de la variabilidad viral por dsRNA y RFLP. Congreso ASCOLFI – CIAT. pp. 24.
- Guzmán, M.; Caro, M. y García, Y. 2002. Técnica de inmunopresión en membrana de nitrocelulosa: una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PLRV, PVX, PVY y PVS que infectan a la papa *Solanum* spp. Revista Colombiana de Biotecnología 4(2): 45–51.
- Guzmán, M.; Bermúdez, Y. y Castro, C. 2001. Identificación del YMMV en muestras de *Disocorea alata* de la Costa Atlántica colombiana. Caracterización biológica, serológica y molecular. Revista Colombiana de Biotecnología 3(1): 72-79.
- Guzmán M. y Fontanilla, M. 2000. Algunos virus vegetales y los potyvirus del ñame. En: Guzmán, M. y Buitrago, G. (ed). 2000. Ñame, Producción de semillas por biotecnología. Editorial Unibiblos. Bogotá pp 80
- Guzmán, M. 1998. Caractérisation biologique sérologique et moléculaire des isolats du virus de la tristezza des agrumes en Corse. Tesis de Doctorado. Universidad de Bordeaux 2, Victor Segal. Bordeaux, Francia pp:231.
- Guzmán, M.; Manjunath, K.L.; Pappu, S.; Pappu, H.; Febres, V.; Lee, R. y Niblett, C. 1994. Comparación de secuencias del gene de la proteína de la cápside de aislamientos colombianos del Virus de la Tristezza de los Cítricos. Revista Fitopatología Colombiana 18(1-2): 107-113.
- Guzmán, M. 1994. Biología Molecular del Virus de la Tristezza de los Cítricos, vectores y huéspedes. Monografía 1, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá pp: 64.
- Hartono S., Natsuaki, T., Yoshikatsu G and Seiichi O (2003) Nucleotide sequence and genome organization of Cucumber yellows virus, a member of the genus *Crinivirus*. *J Gen Virology*, **84** , 1007-1012;
- Hinestroza, A. 1973. Isolation of infections ribonucleic acid from leaves of *Chenopodium quinoa* infected with the potato virus S. *Phytopathology* 76: 149-152.
- Hsu, H.; Lawson, R.; Lin, N y Hsu, Y. 1995. Tissue Blot immunoassay for analysis of Plant Pathogens. En: Molecular methods in plant pathology. Singh and Singh Editors. Capítulo 11. p. 367-376.
- Huisman, M.; Linthorst, H.; Bol, F. y Cornelissen, B. 1988. The complete sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *Journal of General Virology* 69: 1789-1798.
- Hull, R. 1993. Nucleic Acid Hybridization Procedures. En: Matthews (ed). 1993. Diagnosis of Plant virus diseases. CRC Press. London p253-271.
- Jones, R.A.C. 1993. Experimental transmission of viruses in diagnosis. En: Matthews (ed). 1993. Diagnosis of Plant virus diseases. CRC Press. London pp. 49-72.
- Jones, R.A.C. 1981. Potato Mop-Top Virus. En: Hooker W.J. (ed). 1981. Compendium of Potato Diseases. APS Press, St. Paul, MN. pp. 79-80.
- Jones, R.A.C. 1988. Epidemiology and control of potato mop-top virus. *Dev. Appl. Biol.* 2: 255-270. En Cooper, J.I. and M.J.C. Asher, editors. 1988. Viruses with fungal vectors. Proceedings of a conference at the University of St. Andrews, Aug. 25-27, 1987. Wellesbourne, Warwick, Great Britain.
- Jones, R.A.C. y Harrison, B.D. 1972. Ecological studies on potato mop-top virus in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* 71: 47-57.
- Jones, R.A.C. y Harrison, B.D. 1969. The behaviour of potato mop-top virus in soil and evidence for its transmission by *Spongopora subterranea* (Wallr) Lagerh. *Ann. Appl. Biol.* 63: 1-17.
- Jones, R.A.C.; Fribourg, C.E. y Slack, S.A. 1982. Potato Virus and Virus-Like Diseases. En: Barnett, O.W. y Tolin, S.A. 1982. Plant Virus Slide Series. Set 2. College of Agricultural Sciences. Clemson University. Clemson. pp. 28-29.
- Karasev, A.; Kashina, A.; Gelfano, V. y Dolja, V. 1992. HSP70 related 65kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS lett* 304: 12-14.
- Karasev, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 293–324.
- Kekarainen, T.; Savilahti, H. y Valkonen. J.P.T. 2002. Functional Genomics on Potato Virus A: Virus Genome-Wide Map of Sites Essential for Virus Propagation. *Genome Research* 12(4): 584-594.
- Khurana, S.M.P. 2000. Potato viruses: detection and management. Pages 257–269 in African Potato Association Conference Proceedings vol. 5, edited by E. Adipala, P. Nampata, and M. Osiru.
- Kitajima, E.; Silva, D.; Oliveira, D.; Müller, G. y Costa, A. 1964. Thread-like particles associated with tristezza disease in citrus. *Nature* 201: 1011-1012.
- Kuby, J. 1997. Immunology. Freeman y Company. New York. pp:320
- Kurppa, A.H.J. 1989. Reaction of potato cultivars to primary and secondary infection by potato mop-top furovirus and strategies for virus detection. *EPPO Bulletin* 19: 593-598.
- Livieratos I.C.; Müller, G.; Salazar, L.F.; Eliasco, E. y Coutts R.H.A. 2002. Identification and sequence analysis of Potato yellow mosaic virus capsid protein minor gene. *Virus Genes* 25: 317-322.
- Livieratos, I. C.; Eliasco, E.; Müller, G.; Olsthoorn, R.C.L.; Salazar, L.F.; Pleij, C.W.A. y Coutts, R.H.A. 2004.

- Analysis of Potato yellow vein virus RNA: Evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus Crinivirus. *Journal of General Virology* 85: 2065-2075.
- López-Moya, J. y García, J. 1999. Potyviruses (Potyviridae) En: Granoff, A. y Webster, R. 1999. Enciclopedia de Virología, Vol 3. Academic Press, Inc. New York pp: 680
- Mackenzie, D.; Tremaine, J. y Stace-Smith, R. 1989. Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of the potato virus S RNA. *Journal of General Virology* 70: 1053-1063.
- Matthews, R. 1991. *Plant Virology*. Third edition. Academic Press. New York. 813.
- Méndez-Lozano, J. Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M., and Rivera-Bustamante, R. F. (2003) Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* 93: 270-277
- Milne R.G. 1993. Electron microscopy of *in vitro* preparations. En: Matthews (ed). 1993. *Diagnosis of Plant virus diseases*. CRC Press. London pp. 159- 214.
- Moreno, P.; Guerri, J.; Ballester-Olmos, J.F. y Martínez, M.E. 1991. Segregation of citrus tristeza virus strains evidenced by double stranded RNA (dsRNA) analysis. En: Proceedings of the 11th International Conference of Citrus Virologists (IOCV). Riverside, CA. pp. 20-24.
- Moriones E., J. Navas-Castillo, S. Sánchez-Campos, F. Monci, M.A. Aranda, J.A. Díaz. Changes in natural populations of the geminivirus complex Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Spain. European Whitefly Symposium, Ragusa (Italia), 55, 2001
- Nikolaeva, O. 1995. Nucleic Acid Hybridization methods in diagnosis of plant viruses and viroids. En: *Molecular methods in plant pathology*. Singh and Singh editors. Capítulo 10. pp: 133 – 144.
- Nolasco, G.; de Blas, C.; Torres, V. y Ponz, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods* 45: 201-218.
- Offei, S.K.; Arciniegas, N.; Müller, G.; Guzmán, M.; Salazar, L.F. y Coutts, R.H.A. 2003. Molecular variation of Potato yellow mosaic virus isolates. Brief Report. *Archives of Virology* 149: 821-827.
- Oliveros, O.; Torres, J.; Morales, G.; Guzmán, M.; Acosta, O. y Peñaranda, J. 2001. Two common haplotypes of the CPm gene (p27) in Colombian field isolates of the citrus tristeza virus. 15th International Conference of Citrus Virologists (IOCV). Noviembre 11 a 18.
- Pappu, H.R.; Pappu, S.S.; Niblett, C.L.; Lee, R.F. y Civerolo, E. 1993. Comparative sequence analysis of the coat proteins of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 7: 255-264.
- Plant Viruses Online Descriptions and Lists from the VIDE Database
- Polston, J.; Bubrick, P. y Perring, T.M. 1991. Detection of plant viruses coat proteins on whole leaf blots. *Analytical Biochemistry* 196: 267-270.
- Ramos, P. L., Guevara-Gonzalez, R. G., Peral, R., Ascencio-Ibañez, J. T., Polston, J., Argüello-Astorga, G. R., Vega-Arreguín, J. C., and Rivera-Bustamante, R. F. (2003). Tomato mottle Taino virus pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of cis- and trans-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology* 148:1697-1712
- Robaglia, C.; Durand-Tardif, M.; Tronchet, M.; Boudazin, G.; Astier-Manificier, S. y Casse-Delbart, F. 1989. Nucleotide sequence of the potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology* 70: 935-947.
- Rosannah Taylor*, Gordon Inamine', and James D. Anderson
- Tissue Printing as a Tool for Observing Immunological and Protein Profiles in Young and Mature Celery Petioles. *Plant Physiol.* (1993) 102: 1027-1031
- Ryden, K.; Lovgren, L. y Sandgren, M. 1989. Investigations on potato mop-top furovirus in Sweden. *EPPO Bulletin* 19: 579-583.
- Rubio, L.; Ayllón, M.A.; Guerri, J.; Pappu, H.; Niblett, C.L. y Moreno, P. 1996. Differentiation of citrus tristeza virus closterovirus (CTV) isolates by single-staged conformational polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol.* 129: 479-489.
- Rubio, L.; Ayllon, M.A. Kong, P., Fernández, A., Polek, M.L., Guerri, J., Moreno, P., Falk, B.W. . 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology* 75(17): 8054-8062.
- Saiki, R.; Shark, S.; Faloona, F.; Mullis, G., Horn, G., Erlich, h and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Salazar, L.F. 1994. Virus detection and management in developing countries. En: *Advances in potato pest. Biology and Management*. APS Press. St. Paul. Minnesota. pp. 643-651.
- Salazar, L.F. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la papa CIP. Lima. pp: 221.
- Salazar, L.F. 1998 Technology development for control of yellow vein disease in Colombia. Final Report. CIP, Lima ,Peru pp: 12
- Salazar, L.F.; Müller, G.; Querci, M.; Zapata, J.L. y Owens, R.A. 2000. Potato yellow vein virus: its host range,

- distribution in South America and identification as a crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. Ann. Appl. Biol. 137: 7-19.
- Saldarriaga, A.; Álvarez, A. y Jaramillo, J. 1988. Efecto del amarillamiento de venas transmitido por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en papa. Revista Colombiana de Entomología 14: 3-8.
- Samuel, G (1934). Ann.Appl.biol. 21, 90-111. En: Albouy, J y Devergne, J.C. Eberfremedades producidas por los virus de las plantas ornamentales. INRA. Ediciones Mundi Prensa. Barcelona. 2000 pp 475.
- Sandgren, M.; Plaisted, R.L.; Watanabe, K.N.; Olsson, S. y Valkonen, J.P.T. 2002. Evaluation of some North and South American potato breeding lines for resistance to potato mop-top virus in Sweden. Amer. J. Potato Res. 79: 205-210.
- Shaw, J.G. y Larson, R.H. 1962. *Phytopathology* 52: 170 En: Plant Viruses Online - Potato X potexvirus.
- Shaw, J.G.; Reichmann, M.E. y Hatt, D.L. 1962. *Virology* 18: 79. Plant Viruses Online - Potato X potexvirus
- Smith, K.M. 1972. A textbook of plant viruses diseases. Third edition. Academic Press. New York.pp: 428.
- Tamayo, P. y Navarro, R. 1984. Aumenta la incidencia del virus del amarillamiento de venas de la papa en Antioquia. ASCOLFI Informa 10: 40-42.
- Valverde, R.A. 1990. Analysis of double stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Dis. 74: 255-258.
- Vanderveken, J. 1977. En: Harris, K.F. y Maramorosch, K. (eds). 1977. Aphids as Virus Vectors. Academic Press. New York. 559 p. Plant Viruses Online - Potato Y potyvirus
- Van Regenmortel, M.H.V. y Dubs, M.C. 1993. Serological Procedures. En: Matthews (ed). 1993. Diagnosis of Plant virus diseases. Academic Press. San Diego, New York pp. 159-214.
- Xianzhou Nie- Yanju Bai- Teresa A. Molen and David C. Desjardins (2008). M Development of universal primers for detection of potato carlaviruses by RT-PCR Journal of Virological Methods Volume 149, Issue 2, Pages 209-216

Otras paginas web consultadas

- <http://vegetablemendonline.ppath.cornell.edu/PhotoPages/Potatoes/Viruses/PotVirusFS3.htm>
- vbsg.slu.se/./images/moptop1.gif
- www.inspection.gc.ca/./surv/images/pmtv.jpg
- www.inspection.gc.ca/./surv/images/pmtv1.jpg
- www.inspection.gc.ca/./surv/images/pmtv2.jpg
- www.inspection.gc.ca/./surv/images/pmtv5.jpg
- www.inspection.gc.ca/./surv/images/pmtv6.jpg
- www2.vbsg.slu.se/./images/moptop1.gif

RESEÑA COLABORADORES

Marina Caro Muñoz

Ingeniera Agrónoma de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Es especialista en cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y jefe de laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Ha participado activamente en la conservación en bancos de germoplasma de la colección de papa *Solanum phureja*. Posee experiencia en la detección de virus en papa PVX, PVY, PLRV y PVS mediante la técnica de ELISA. Ha participado en la cadena productiva de caucho mediante la propagación clonal a través de la embriogénesis somática. Así mismo, ha participado en el proyecto para la introducción de la biotecnología en Educación Básica y Media. Es miembro de la Asociación Latinoamericana de la Papa –ALAP– y está inscrita en CEVIPAPA. Es coautora de un artículo sobre inmunopresión en papa publicado en la Revista Colombiana de biotecnología.

Carlos Ñustez

Ingeniero Agrónomo de la Universidad del Tolima con Maestría en Fitomejoramiento de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Profesor Asociado y Director del Programa de Papa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, dentro del cual ha promovido, desarrollado y apoyado investigaciones hacia la consecución de variedades de papa de alta calidad. Ha participado como coautor de numerosas investigaciones y artículos y en la concreción de políticas y directrices de CEVIPAPA y realizado aportes importantes para la cadena de competitividad del cultivo de papa. Es coautor de dos trabajos presentados en congreso nacional.

Nancy Arciniegas

Ingeniera Agrónoma de la Universidad de Nariño. Obtuvo el título de Magister Scientiae en Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia (2004) y, como parte de los requisitos para optar al título, realizó un trabajo bajo la dirección de

la Dra. Mónica Guzmán sobre algunas técnicas de diagnóstico para evaluar la resistencia y susceptibilidad al virus del amarillamiento de venas de la papa (PYVV) de algunas accesiones de *Solanum phureja* en el laboratorio de Virus Vegetales del IBUN, en colaboración con la Facultad de Agronomía. Para este trabajo se requirió adaptar algunas técnicas de rutina utilizadas para el diagnóstico del CTV, con modificaciones menores. Apartes del trabajo de tesis fueron presentados en dos congresos nacionales y se está elaborando un artículo para publicación.

Elizabeth Ruiz

Química de la Universidad Nacional de Colombia (2003) y docente de la Universidad Tecnológica de Tunja (2004). Actualmente realiza estudios de Maestría en Bioquímica en la Universidad Nacional de Colombia. Entre el 2003 y el 2004 colaboró, en la adaptación y validación de la técnica de RT-PCR para la detección del PYVV y para estimar preliminarmente variabilidad potencial por RFLPs. Apartes de este trabajo se presentó en el congreso nacional de ASCOLFI y se publicó en un artículo internacional.

Jenny García Sandoval

Bacterióloga del Colegio Mayor de Cundinamarca (2000). Tiene experiencia en el manejo de ceparios bacterianos. En el 2001, realizó su formación en el Instituto de Biotecnología con la adaptación de la técnica de inmunopresión (IMI) para detección de virus de papa bajo la dirección de la Dra. Mónica Guzmán. Participó en el proyecto sobre introducción de la biotecnología en la educación básica y media en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Es docente de microbiología y asesora en prácticas pedagógicas en desarrollo rural sostenible en la Universidad Pedagógica Nacional. Ha participado en proyectos de investigación pedagógica en la Universidad Pedagógica. Es coautora de un artículo sobre inmunopresión en papa publicado en la Revista Colombiana de biotecnología.