

Principales virus que afectan al cultivo de papa y metodologías para su identificación y caracterización

Main viruses affecting potato crop and methodologies for their identification and characterization

ANA CECILIA GONZÁLEZ-FRANCO¹, MARIANA RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ¹
Y LORETO ROBLES-HERNÁNDEZ^{1,2}

Recibido: Junio 3, 2013

Aceptado: Noviembre 25, 2013

Resumen

El objetivo de esta revisión fue realizar una descripción de los principales virus que afectan al cultivo de papa, así como de las técnicas utilizadas actualmente para su detección e identificación. Algunos de los virus que más afectan al cultivo de papa en el mundo son PLRV, PVY y PVX, los cuales también pueden producir infecciones mixtas que aumenten aún más las pérdidas en rendimiento y calidad. Por lo anterior, el diagnóstico preciso de estos agentes causales es un requisito previo esencial para un control efectivo. Para este fin, un amplio espectro de métodos serológicos, bioensayos con plantas indicadoras y técnicas moleculares se han desarrollado y están actualmente en uso en muchos laboratorios de diagnóstico. Se espera que este manuscrito funcione como una guía para el personal que se encuentra involucrado en el diagnóstico y control de los principales virus fitopatógenos del cultivo de la papa.

Palabras clave: *Solanaceae*, PVY, PVX, PLRV, RT-PCR, Microarray, MIA, virus de la papa.

Abstract

The aim of this review was to provide a description of the main viruses affecting potato crop as well as the techniques currently used for detection and identification. Some of the viruses that afflict potato crop in the world are PLRV, PVY, and PVX, which can also produce mixed infections that exacerbate yield and quality losses. Therefore, the accurate diagnosis of these causal agents is an essential prerequisite for effective control. Thus, a wide range of serological methods, bioassays with indicator plants and molecular techniques have been developed and are currently in use in many diagnostic laboratories. This manuscript will provide guidance to personnel that is involved in the diagnostic and control of the main phytopathogenic viruses of potato.

Keywords: *Solanaceae*, PVY, PVX, PLRV, RT-PCR, Microarray, MIA.

Introducción

La papa es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar en producción (FAOSTAT, 2009). No obstante, se reportan más de 30 agentes virales que infectan este cultivo y que reducen su rendimiento y la calidad del tubérculo (Bradshaw *et al.*, 2007).

¹ Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Agrotecnológicas. Ciudad Universitaria S/N Campus 1 Chihuahua, Chih., México. 31310. Tel. (614) 439-1844 ext. 3119.

² Dirección electrónica del autor de correspondencia: lrobles@uach.mx.

Por su alta prevalencia y sus efectos en la producción, los virus más estudiados son *Virus Y de la papa* (PVY), *Virus del enrollamiento de la hoja de papa* (PLRV) y el *Virus X de la papa* (PVX). Los síntomas del enrollamiento de las hojas causados por el PLRV, y los mosaicos ocasionados por PVX y PVY fueron de los primeros en ser observados en los cultivos de papa. Las enfermedades virales son las responsables primarias de la degeneración gradual de los cultivares, las cuales se traducen principalmente en la reducción del rendimiento (Salazar, 1997; Bradshaw *et al.*, 2007).

Estimar las pérdidas por infecciones virales es complicado, pues depende de diversos factores que incluyen las variantes virales, el cultivar y la edad de las plantas, los factores climáticos, la presencia de otros virus, entre otros (Guzmán, 2010). En muchos casos, la presencia conjunta de dos virus en la misma planta exacerba la expresión de los síntomas, aumentando las pérdidas (Bradshaw *et al.*, 2007). Por otro lado, determinar la distribución y la variabilidad genética de dichos patógenos es fundamental para los programas de manejo integrado y mejoramiento genético de la papa (Gil *et al.*, 2012). El objetivo de esta revisión es realizar una descripción de los principales virus que afectan al cultivo de papa, así como de las técnicas utilizadas actualmente para su detección e identificación.

Virus x de la papa (PVX)

El PVX es uno de los virus más comunes que infectan al cultivo de la papa y está distribuido mundialmente. PVX puede infectar a más de 240 especies de plantas pertenecientes a 16 familias, siendo la *Solanaceae* la que concentra más hospederos para este virus.

Las plantas a menudo no muestran síntomas, pero cuando ocurren, el virus puede causar clorosis, mosaicos y reducción en el tamaño de la hoja (Figura 1). La fuente de este virus son los tubérculos infectados. Además, es transmitido mecánicamente y hasta ahora no se conocen insectos que actúen como vectores (Burrows, 2005).

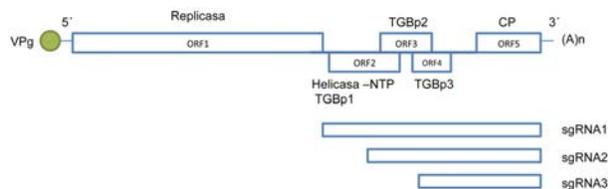
Figura 1. Plantas de papa cultivar Agata mostrando la sintomatología característica causada por PVX (Imagen de González-Franco, A.C. y Robles-Hernández, L.).



Las pérdidas en producción que puede causar este virus pueden ser superiores a 10% (CIP, 1996), pero puede llegar a ser un virus devastador si se presenta en infecciones mixtas; por ejemplo, cuando existe infección del PVX con el PVY, los síntomas se intensifican y las pérdidas pueden llegar a ser hasta 70% (Burrows, 2005; Asamenew, 2007).

El PVX es un *Potexvirus* de la familia *Alphaflexiviridae* (ICTV, 2009). Tiene forma filamentosa de aproximadamente 550 nm de longitud y 11-18 nm de ancho; su genoma está compuesto por una sola hebra de ARN con polaridad positiva de aproximadamente 6,4 kb. Su genoma codifica para al menos cinco marcos de lectura abiertos (ORFs), donde el ORF 1 codifica para la replicasa viral (RdRp) de 166 kDa. Los ORF2, ORF3 y ORF 4 se superponen y comprenden un bloque triple de genes que codifican para las proteínas del movimiento (MP); el ORF2 codifica la proteína TGBp1 de 25 kDa, el ORF3 codifica la proteína TGBp2 de 12 kDa y el ORF4 codifica la proteína TGBp3 de 8 kDa. Finalmente, el ORF5, codifica a la cubierta proteica (CP), de 25 kDa (Asamenew, 2007). En su extremo 5' posee una capucha de metil-guanosina y su extremo 3' está poliadenilado (Asamenew, 2007; Verchot *et al.*, 2007). En la Figura 2 se esquematiza la conformación del genoma del virus PVX, donde cada caja representa un ORF y las líneas representan RNA genómico y tres RNA subgenómicos (RNAsg).

Figura 2. Esquematación del genoma de PVX (Adaptado de Asamenew, 2007).



Virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV)

El PLRV causa una de las enfermedades virales más importantes en la papa. La enfermedad afecta el rendimiento y la calidad de los tubérculos. Las pérdidas en rendimiento son difíciles de cuantificar, pero pueden llegar hasta un 90%; estas pérdidas pueden ser casi tan altas como el porcentaje de plantas con síntomas visuales de infección (Jayasinghe, 1988; Gul *et al.*, 2011).

El virus se localiza en los tejidos del floema, donde causa necrosis y aumento en la síntesis de calosa, carbohidrato que bloquea el transporte del almidón de las hojas hacia los tubérculos provocando el enrollamiento de las hojas (Jayasinghe, 1988; Gul *et al.* 2011).

Los síntomas primarios típicos para *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* inician en las hojas apicales con enrollamiento, se observa crecimiento erecto y clorosis; después de cierto tiempo los síntomas se transfieren a las más viejas (Figura 3 y 4). Los síntomas secundarios se presentan con un crecimiento reducido y erecto. Las hojas inferiores se enrollan severamente y se vuelven rígidas (Jayasinghe, 1988; Gul *et al.*, 2011).

La mayoría de las variedades de papa no muestran síntomas en los tubérculos, solamente algunas como Russet Burbank y Green Mountain desarrollan necrosis reticulada en las células del floema de los tubérculos (Jayasinghe, 1988).

PLRV es transmitido por áfidos en una manera persistente-circulativa. También es transmitido por tubérculos infectados, pero no

mecánicamente. Varias especies de áfidos pueden transmitir el PLRV, pero el áfido *Myzus persicae* es el vector más importante (Gul *et al.*, 2011).

Figura 3. Síntoma de enrollamiento de hoja en plantas de papa cultivar Felsina (Imagen de González-Franco, A.C. y Robles-Hernández, L.).



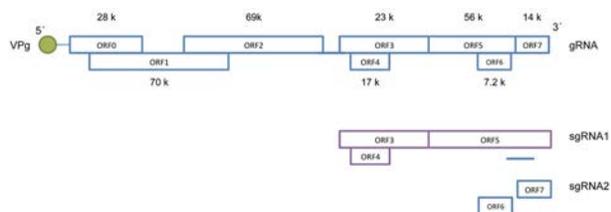
Figura 4. Síntomas de PLRV en plantas de papa cultivar Ruby Lou. Izquierda: enrojecimiento de los márgenes de las hojas (Adaptado de Mortimer, 2010). Derecha: enrollamiento de hoja de papa (Gul *et al.*, 2011).



El PLRV es el miembro tipo de los polerovirus. Es un *Luteovirus* cuyas partículas virales son esféricas, no envueltas, con un diámetro de 24 nm (Jayasinghe, 1988). Su genoma es ARN lineal, monopartita de sentido positivo y mide 5987 nucleótidos de largo; posee una proteína viral unida al genoma (VPg) en su extremo 5' pero carece de cola poliadenilada en su extremo 3'. Tiene seis marcos de lectura abierta (ORFs) dispuestas en dos bloques separados por una pequeña región intergénica (Li *et al.*, 2007); sin embargo, de acuerdo con Taliensky *et al.* (2003) y Kaplan *et al.* (2007) hay ocho ORFs (Figura 5). El ORF0 codifica la proteína de 28 kDa P0 involucrada en la

acumulación del virus (Sadowy *et al.*, 2001). El ORF4 codifica para una proteína putativa de movimiento OP17 y su CP está implicada en la transmisión por vectores y movimiento del virus (Kaplan *et al.*, 2007).

Figura 5. Esquema del genoma de PLRV. Los ORFs se muestran con los pesos moleculares aparentes de sus productos génicos (Adaptado de Jaag *et al.*, 2003).



Virus Y de la papa (PVY)

Las pérdidas en el rendimiento por causa de infecciones por el PVY se encuentran entre un 10 y un 80% dependiendo del cultivar, las características de la cepa viral, las condiciones de almacenamiento y del control de insectos y maleza; además, la necrosis del tubérculo puede afectar la calidad de los cultivos y reducir aún más el rendimiento comercial (Pérez y Rico, 2004).

El PVY se encuentra distribuido en todo el mundo y es transmitido por al menos 70 especies de áfidos de manera no persistente-no circulativa (Martínez *et al.*, 2001).

Puede también transmitirse mecánicamente y por semilla; sin embargo, los áfidos son el medio más veloz de transmisión, y el vector más eficaz es *Myzus persicae* (Smith *et al.*, 1988; Pérez y Rico, 2004; Burrows y Zitter, 2005).

Existen dos patotipos de PVY definidos sobre la base de los síntomas inducidos en la planta de tabaco, el grupo necrótico, representado por la cepa parental PVY^N y el no necrótico, cuya cepa parental es PVY^O (Blanchard *et al.*, 2008).

El grupo no necrótico causa en papa síntomas de tipo mosaico; los síntomas primarios son un moteado y una necrosis de los folíolos, seguida por la muerte de las hojas.

Las plantas infectadas con este virus presentan un menor crecimiento, con hojas arrugadas y fruncidas (Smith *et al.*, 1988). En la planta de tabaco las cepas PVY^O causan aclarado de venas y epinastía, seguido de moteado de venas (Figura 6). Dentro del grupo de PVY que no producen necrosis, además de PVY^O, se encuentran las cepas PVY^C, PVY^Z y PVY^E, las cuales son reconocidas como inductoras de mosaico y manchas leves en las hojas (Smith *et al.*, 1988; Karasev *et al.*, 2010).

El grupo necrótico, representado por PVY^N produce síntomas primarios leves en planta de papa; sin embargo, los síntomas secundarios suelen ser más claros y varían de un moteado atenuado a uno más grave. En plantas de tabaco, las cepas PVY^N causan síntomas primarios similares a PVY^O, con una aparición posterior de lesiones necróticas repartidas en las hojas; las venas primarias empardecen y las hojas colapsan prematuramente contra el tallo (Figura 6) (Smith *et al.*, 1988; Delaunay, 2007).

Las infecciones mezcladas de la raza común PVY^O y la necrótica PVY^N son frecuentes y sus genomas se pueden mezclar produciendo razas híbridas como PVY^{N-W} y PVY^{NTN}. Estas variedades son diferentes de las cepas parentales, serológicamente concuerdan con PVY^O, sin embargo, inducen síntomas de necrosis venal sistémica como PVY^N en plantas de tabaco. Los aislados de PVY^{NTN} pueden, además, causar necrosis en los tubérculos de papa (Figura 7). Los aislados PVY^{N-W} inducen necrosis venal en tabaco y mosaico leve en las hojas de papa (Smith *et al.*, 1988; Delaunay, 2007; Blanchard *et al.*, 2008).

Figura 6. Síntomas desarrollados en *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* tres semanas después de la inoculación con dos patotipos de PVY: A) Síntomas de mosaico por aislado tipo PVY^O y B) Necrosis venal por aislado tipo PVY^N (González-Franco, A.C. y Robles-Hernández, L.).

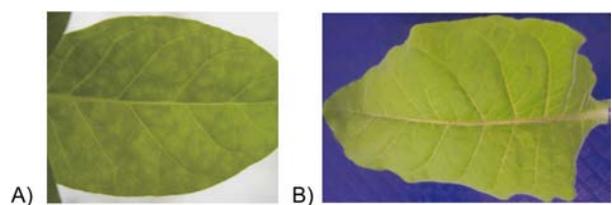
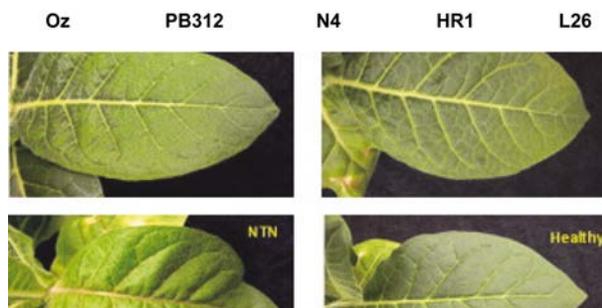
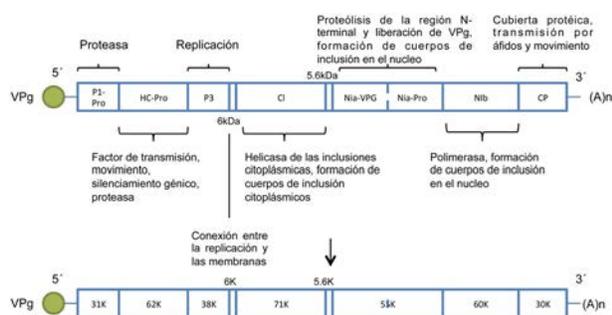


Figura 7. Síntomas inducidos en tubérculo de papa cultivar Yukon Gold por varios aislados de PVY perteneciendo al patotipo PVY^O (Oz) y al PVY^{NTN} (PB312, N4, HR1 y L26) (Adaptada de: Hu *et al.*, 2009).



El PVY es un *Potyvirus* miembro de la familia *Potyviridae* de RNA monocatenario positivo. Las partículas virales del PVY tienen una estructura helicoidal, de forma filamentosa, flexibles y miden unos 730 nm por 11 nm (Smith, 1931; Smith *et al.*, 1988; Burrows y Zitter, 2005; Kehoe y Jones, 2011). El genoma del PVY (Figura 8) consta de aproximadamente 9.7 kb, el cual contiene un único marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por regiones no codificantes, este ORF se traduce como un único polipéptido de aproximadamente 350 kDa con una proteasa VPg unida covalentemente al extremo 5' mediante una tirosina y una cola de poli adenosina en el extremo 3' del genoma (Susaimuthu *et al.*, 2008) que es procesado proteolíticamente para madurar las proteínas virales: P1-pro, HC-Pro, y NIa. Los productos proteicos finales son: P1-pro, HC-Pro, P3, CI-Helicasa, 6 kDa, NIa, NIb y CP (Martínez *et al.*, 2001; Astier *et al.*, 2007).

Figura 8. Esquema del genoma del PVY (Adaptado de Astier *et al.*, 2007).



En un estudio reciente se publicó el descubrimiento de la presencia de un segundo ORF corto nombrado pipo y que se encuentra incrustado en el cistrón P3 del ORF antes descrito; este ORF pequeño resulta ser un gen conservado y característico de los virus de la familia *Potyviridae* (Chung *et al.*, 2008). Estudios de interrupción de este gen demuestran que la capacidad de sobrevivencia e infectividad del virus se ve afectada (Chung *et al.*, 2008); además, en otro estudio con un miembro distinto de la familia *Potyviridae* sugiere que este ORF pequeño está implicado en el movimiento intercelular (Vijayapalani *et al.*, 2012).

Métodos de detección e identificación de los diferentes virus

Las pruebas biológicas de detección se basan en el análisis de la virulencia y la agresividad de los aislados virales, mediante el uso de plantas hospedantes indicadoras que expresan una gama de síntomas, de acuerdo con las diferentes propiedades del inóculo en estudio. Para la identificación y caracterización de PVY se utilizan principalmente *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* (hospedero susceptible a las propiedades necróticas de PVY^N, PVY^{NTN} y PVY^{N-Wi}), donde se observa una severa necrosis de nervaduras en sus hojas (Ramírez *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009), y algunas variedades de papa que puedan expresar reacción de hipersensibilidad a PVY^O, y producción de tubérculos con síntomas de necrosis cuando están infectados por cepas del patotipo PVY^{NTN} (Hu *et al.*, 2009; Galvino *et al.*, 2012). Por otro lado, *Chenopodium amaranticolor* hace posible la distinción entre PVY^O que produce lesiones locales en la hoja inoculada y PVY^N que provoca infección sistémica (Salazar, 1990; Jacquot, 2007).

Para PLRV se pueden utilizar hospedantes como *Physalis floridana* y *Datura stramonium* que reaccionan con síntomas característicos; *P. floridana* presenta clorosis entre las nervaduras, ligero enrollamiento de la base de

las hojas, reducción del tamaño de las hojas y del crecimiento de las plantas; las hojas infectadas sistémicamente desarrollan clorosis intervenal y las hojas más viejas pueden enrollarse ligeramente. *D. stramonium* desarrolla una fuerte clorosis entre las nervaduras (Jayasinghe, 1988).

Para la identificación de PVX se utilizan como plantas indicadoras: *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* y *Gomphrena globosa* L. En esta última, cuatro a cinco días después de la infección, presenta pequeñas manchas grises en el sitio de inoculación, que van aumentando de tamaño y se van rodeando de una zona rojiza. Las plantas afectadas en forma sistémica por el virus presentan zonas cloróticas o de mosaico entre las nervaduras de las hojas (UNAD, 2012).

Pruebas serológicas

Estas pruebas se basan en la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en la que un anticuerpo reconoce e interacciona sólo con la porción de antígeno que le dio origen, o con otra muy semejante (Nome, 1995). La técnica ELISA fue desarrollada en 1971 para emplearla en medicina, y adaptada en 1977 a la patología vegetal, en especial para la detección de virus en plantas. La técnica ELISA tipo sándwich es la más utilizada para la detección de virus fitopatógenos. La prueba consiste, en un primer paso, en sensibilizar la superficie de las celdillas del plato o placa con una capa de anticuerpo primario, luego se coloca la muestra y se añade el anticuerpo secundario, pero esta vez conjugado con una enzima; una reacción positiva se observa con un cambio de color provocado por la unión del sustrato a la enzima. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Nome, 1995; Rivers, 2007).

De acuerdo a la variabilidad de cepas de algunos virus fitopatógenos, se han creado sueros que hacen posible la detección de todos los aislamientos de alguna especie de virus en específico como PVY (sueros policlonales) o la

identificación de aislamientos de acuerdo con sus patogrupos (sueros monoclonales), por ejemplo PVY^N vs PVY^O. Las características de la secuencia codificante para la proteína de la cubierta de los virus determina la especificidad de la detección serológica de los aislamientos (Jacquot, 2007).

La aparición de nuevas variantes en ciertos virus, como PVY^{NTN} y PVY^{N-W} evidenció las limitaciones de las herramientas inmunoserológicas disponibles, ya que en algunos casos no es posible diferenciar entre las variantes virales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales agrupan a PVY^{N-W} en el grupo PVY^O y no son capaces de hacer la distinción entre PVY^{NTN} y aislados PVY^N (Jacquot *et al.*, 2011).

Inmunoensayo múltiple con microesferas (MIA). Fue diseñada como una alternativa a la ELISA y permite la detección de varios antígenos simultáneamente, mientras que la técnica ELISA solo permite la detección de un solo antígeno por reacción. Otra ventaja de MIA es el tiempo requerido para el procesamiento de muestras, ya que requiere aproximadamente 2 h, mientras que el DAS-ELISA se completa generalmente en 16 h (Bergervoet *et al.*, 2008). Los fundamentos de la técnica MIA se describen a continuación. Las perlas utilizadas se tiñen internamente con dos fluorocromos y para cada conjunto de microesferas se puede conjugar un anticuerpo específico (Bergervoet *et al.*, 2008). Las perlas recubiertas de anticuerpos se añaden a las muestras después de la transferencia a una placa de microtitulación. Posteriormente, se añaden los anticuerpos secundarios conjugados con un fluorocromo reportero, y se miden en un analizador multiparamétrico (Earley *et al.*, 2002). El analizador multiparamétrico excita los tintes internos de las microesferas con un láser rojo, y al fluorocromo reportero, capturado por el antígeno, con un láser verde (Bergervoet *et al.*, 2008). Esta técnica fue utilizada por Bergervoet *et al.* (2008) en una muestra vegetal naturalmente infectada con PVX, PVY y PLRV, obteniendo resultados comparables con la técnica DAS-ELISA.

Pruebas moleculares

Las diferencias genéticas entre los genomas virales pueden ser utilizadas como objetivos específicos para la detección molecular y la identificación de los aislados virales (Delaunay, 2007). Aunado a lo anterior, la tendencia actual se orienta hacia las estrategias para una rápida identificación de más de un patógeno a través del desarrollo de múltiples plataformas de análisis (Cheng *et al.*, 2013).

La transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) múltiple. La RT-PCR es una de las pruebas moleculares más utilizadas en la detección de virus de plantas, donde una hebra de ARN es empleada para sintetizar ADN complementario (ADNc), el cual es posteriormente amplificado en un PCR tradicional (Vázquez, 2003). Se le llama PCR múltiple cuando se amplifica simultáneamente más de una secuencia de ADN en una sola corrida; para ello, se combinan dos o más pares de cebadores específicos en un mismo tubo, junto con el resto de los reactivos de la reacción. Para la detección y tipificación de algunos virus, existen ensayos de PCR múltiple en los que en una sola reacción se logran diferenciar patotipos virales (Lorenzen *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009).

Un ensayo convencional múltiple de RT-PCR puede detectar PVY y PLRV con éxito en muestras de tubérculos de papa latentes, lo cual representa una ventaja en comparación con ELISA, que necesita de hojas para la obtención de la muestra. Además, se considera que la RT-PCR múltiple proporciona respuestas rápidas y mayor garantía de calidad en la detección que la prueba de ELISA (Mortimer *et al.*, 2009).

Secuenciación de genes y análisis filogenético. El método más utilizado es la secuenciación dideoxi. El término proviene de un nucleótido especial modificado, llamado trifosfato dedidesoxinucleótido (ddNTP). Este nucleótido tiene la capacidad de bloquear la síntesis de ADN por carecer del grupo 3' hidroxilo (Griffiths, 2004).

En el caso del estudio de virus fitopatógenos, las investigaciones que utilizan la secuenciación de genes están enfocadas principalmente a el análisis filogenético de los diversos tipos de virus, ya que continuamente se encuentran nuevas cepas con características serológicas que no concuerdan con el daño que ocasionan en plantas indicadoras o con los resultados de las pruebas de identificación por RT-PCR (Hu *et al.*, 2009; Robles *et al.*, 2010; Galvino *et al.*, 2012).

PCR en tiempo real. Esta técnica se ha convertido en el método más preciso y sensible para la detección y cuantificación de patógenos de plantas. Es una variante de la PCR, la cual es utilizada para amplificar y cuantificar simultáneamente el producto de la amplificación (Zipper, 2004).

El uso de un sistema de un solo tubo para múltiples repeticiones de la PCR en tiempo real tiene la ventaja sobre un sistema de dos etapas, ya que estos métodos no se basan en la electroforesis en gel de agarosa de los amplicones, que requieren una manipulación de tubo abierto, reduciendo el riesgo de contaminación y el riesgo de resultados falsos positivos (Agindotan *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2013). La temperatura de fusión (T_m) de las secuencias diana expande el poder del análisis en tiempo real, ya que la temperatura de fusión se basa en las características de disociación de ADN de doble cadena y permite que este análisis sea específico para el fragmento diana (Chomic *et al.*, 2011).

El producto de amplificación se genera a través de PCR en tiempo real en presencia de un colorante fluorescente. El colorante se intercala en el interior del surco menor de la hélice y emite fluorescencia brillante en estado ADN de doble cadena. Siguiendo la amplificación en tiempo real, la etapa de fusión se lleva a cabo mediante el aumento paulatino de la temperatura, que resulta en la disociación del producto de amplificación de doble cadena y la liberación del colorante fluorescente. La disminución de la fluorescencia se puede convertir en picos de fusión (Chomic *et al.*, 2011).

El análisis de pico de fusión utilizando un colorante simple ofrece un método sensible, específico, rápido y de alto rendimiento para la detección y diferenciación de varios virus a la vez; por ejemplo, se ha reportado la identificación de hasta cinco virus de la papa en una sola corrida incluyendo a PVX, PVY, PLRV, PVA y PVS (Cheng *et al.*, 2013).

Microarreglos de DNA. El principio de los microarreglos radica en la hibridación del ácido nucleico marcado con fluorescencia o radioactividad a sus secuencias complementarias en una superficie sólida, que actúa como sonda. La principal ventaja de este método con respecto a las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa, es la oportunidad de detectar simultáneamente en un único procesamiento muchos patógenos. Hasta decenas de miles de sondas de ADN se pueden detectar en la configuración definida en un portaobjetos de microscopio de vidrio que forma el chip (Bystricka *et al.*, 2005).

Para la identificación de virus, las sondas son secuencias de genes de cada uno de los virus que deben ser detectados en un único ensayo. Dicha micromatriz puede ser expuesta a ADNc marcado con fluorescencia de la muestra a analizar y, finalmente, la placa se escanea para revelar si alguno de los objetivos estaban presentes en la muestra (Boonham *et al.*, 2003).

El método ha demostrado ser capaz de discriminar secuencias con alto grado de identidad de secuencia, por lo que el ensayo podría ser utilizado para detectar cepas estrechamente relacionadas de virus, tales como las cepas de PVY, con más de 89% de identidad de secuencia. La sensibilidad de esta técnica es comparable con la técnica ELISA (Boonham *et al.*, 2003; Bystricka *et al.*, 2005).

Conclusiones

Es importante mencionar que el uso de una sola técnica, ya sea biológica, serológica o molecular, no es suficiente para diagnosticar el agente viral causal de una enfermedad en plantas. La sintomatología por sí sola no permite

distinguir fielmente entre tipos del virus, ya que los síntomas pueden ser muy similares entre enfermedades virales; además, estos varían con la edad, el momento de infección, la temperatura, y la genética, tanto del virus como de la planta huésped. Así mismo, se pueden dar reacciones serológicas cruzadas entre virus relacionados o reacciones serológicas no recíprocas entre pares de virus. Cuando existen infecciones mixtas, la RT-PCR puede fallar al detectar todas las variantes de secuencias o especies, o puede amplificar preferentemente algunos virus (Wei *et al.*, 2009; Holland y Jones, 2006). Por lo antes mencionado, el uso conjunto de múltiples técnicas (biológicas, serológicas y moleculares) es necesario para una identificación y caracterización más precisa de los agentes virales.

Literatura Citada

- AGINDOTAN, B., P. J. Shiel, and P. H. Berger. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142: 1–9.
- ASAMENEW, T. 2007. A study of vascular movement of *Potato virus X* (PVX) TGBp1, TGBp2 and CP using the Commelina yellow mottle virus promoter and GFP. Ph.D. Dissertation, Faculty of the Graduate College of the Oklahoma State University, USA.
- ASTIER, S., J. Albouy, Y. Maury and C. Robaglia. 2007. Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus Ecology. Science Publishers, Enfield, NH, USA. 472 p.
- BERGERVOET, J.H.W., J. Peters, J.R.M.C. van Beckhoven, G.W. van den Bovenkamp, J.W. Jacobson, and J.M. van der Wolf. 2008. Multiplex microsphere immune detection of *Potato virus Y*, X and PLRV. *Journal of Virological Methods* 149: 63-68.
- BLANCHARD, A., M. Rolland, A. Delaunay, and E. Jacquot. 2008. An International Organization to Improve Knowledge on *Potato Virus Y*. URL: www.inra.fr/pvyorganization
- BOONHAM, N., K. Walsh, P. Smith, K. Madagan, I. Graham, and I. Barker. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal of Virological Methods* 108: 181-187.
- BRADSHAW, J., C. Gebhardt, F. Govers, D.K.L. Mackerron, M.A. Taylor, and H.A. Ross. 2007. *Potato biology and biotechnology advances and perspectives*. Elsevier. Italy. 801 p.
- BURROWS, M. and T. Zitter. 2005. *Virus Problems of Potatoes*. USDA-ARS and Department of Plant Pathology Cornell University Ithaca, NY. URL: http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Potato_Virus.htm
- BYSTRICKA, D., O. Lenz, I. Mraz, L. Piheroova, S. Kmocho, and M. Sip. 2005. Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 128: 176–182.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1996. *Manual: Principales Enfermedades, Nematodos e Insectos de la Papa*. Editorial Stella. Lima, Perú. 43 p.

- CHENG, J., Y. Jiang, P. Rao, H. Wu, Q. Dong, Z. Wu, X. Ding, and J. Guo. 2013. Development of a single-tube multiplex real-time PCR for detection and identification of five pathogenic targets by using melting-curve analysis with EvaGreen. *Archives of Virology* 158: 379-386.
- CHOMIC, A., L. Winderb, K. F. Armstronga, M. N. Pearsonc, and J. G. Hampton. 2011. Detection and discrimination of members of the family Luteoviridae by real-time PCR and SYBR® Green/RTM melting curve analysis. *Journal of Virological Methods* 171: 46-52.
- CHUNG, B. Y-W, W. A. Miller, J. F. Atkins, and A. E. Firth. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *The National Academy of Sciences of the USA* 105: 5897-5902.
- DELAUNAY, A. 2007. An International Organization to Improve Knowledge on *Potato Virus Y*. URL: www.inra.fr/pvyorganization
- EARLEY, M.C., R.F. Vogt, H.M. Shapiro, F.F Mandy, K.L. Kellar, R. Bellisario, K.A. Pass, G.E. Marti, C.C. Stewart, and W.H. Hannon. 2002. Report from a workshop on multianalyte microsphere assays. *Cytometry* 50: 239-242.
- FAOSTAT, 2009. Producción mundial de papa, 1991-2007. URL: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- GALVINO, S.B.F., A. Figueira, V.V. Camargos, P.S Geraldino, X. Hu, O.V. Nikolaeva, C. Kerlan, and A.V. Karasev. 2012. A Novel type of *Potato virus Y* recombinant genome, determined for the genetic strain PVY^E. *Plant Pathology* 61: 388-398.
- GL, J.F, J.M Cotes, y M. MARIN. 2012. Detección y caracterización molecular del *Virus X de la Papa* (PVX) en regiones productoras de papa de Colombia. *Revista de Protección Vegetal* 27, (2):69-76.
- GRIFFITHS, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin, and W. M. Gelbart. 2004. An Introduction to Genetics Analysis. 7ª Edición. W.H. Freeman & Co. 354-362p.
- GUL, Z., A. Khan and K. Jameel. 2011. Study of *Potato leafroll virus* (PLRV) of Potato in Pakistan. *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research* 2, (1): 24-34.
- GUZMÁN, M., V. Román, L. Franco y P. Rodríguez. 2010. Presencia de cuatro virus en algunas acepciones de la Colección Central Colombiana de papa mantenida en campo. *Agronomía Colombiana* 28(2): 225-233.
- HOLLAND, M. B. and R. A. C. Jones. 2005. Benefits of virus testing in seed schemes. In «Proceedings of 'Potato 2005'- Australian National Potato Conference» (A. J. Pitt and C. Donald, eds), Cowes, Victoria, Australia pp. 81-87.
- HU, X., T. Meacham, L. Ewing, S. Gray, and A. Karasev. 2009. A novel recombinant strain of *Potato virus Y* suggest a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Research* 143: 68-76.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). 2009. Virus Taxonomy: URL: <http://www.ictvonline.org/index.asp>
- JAAQ, H. M., L. Kawchuk, W. Rohde, R. Fischer, N. Emans, and D. Prüfer. 2003. An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(15): 8939-8944.
- JACQUOT, E. 2007. An International Organization to Improve Knowledge on *Potato Virus Y*. URL: www.inra.fr/pvyorganization
- JACQUOT, E., C. Kerlan, V. Balme, and M. Rolland. 2011. Methods for detecting isolates of the *potato virus Y* (PVY) responsible for necroses. United States Patent 8063270. URL: <http://www.freepatentsonline.com/8063270.html>
- JAYASINGHE, U. 1988. *El Virus del enrollamiento de la hoja de papa* (PLRV). Boletín de información técnica 22. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 21p.
- JOOS, T.J.G. 2004. Protein microarray technology. *Expert Review of Proteomics* 1: 1-3.
- KAPLAN, I. B., L. Lee, D.R. Ripoll, P. Palukaitis, F. Gildow, and S.M. Gray 2007. Point mutations in the *Potato leafroll virus* major capsid protein alter virion stability and aphid transmission. *Journal of General Virology* 88: 1821-1830.
- KARASEV, A. V., O. V. Nikolaeva, X. Hu, Z. Sielaff, J. Whitworth, J. H. Lorenzen, and S. M. Gray. 2010. Serological Properties of Ordinary and Necrotic Isolates of *Potato virus Y*: A Case Study of PVY^N Misidentification. *American Journal of Potato Research* 87: 1-9.
- KEHOE, M., and R. Jones. 2011. A proposal to help resolve the disagreement between naming of *potato virus Y* strain groups defined by resistance phenotypes and those defined by sequencing. *Archives of Virology* 156: 2273-2278.
- LI, X., C. Halpin and M.D. Ryan. 2007. A novel cleavage site within the *Potato leafroll virus* P1 polyprotein. *Journal of General Virology* 88: 1620-1623.
- LORENZEN, J., P. Nolte, D. Martin, J. Psyche, and N.C. Gudmestad. 2008. NE-11 represents a new strain variant class of *Potato virus Y*. *Archives of Virology* 153: 517-525.
- MARTÍNEZ, B., C. Llave, F. Atencio, J. Díaz y D. López. 2001. La transmisión de los potyvirus por pulgones (Revisión). *Investigación agraria. Producción y protección vegetal* 16 (2):149-167.
- MORTIMER-JONES, S. M. 2010. Development of Diagnostic Tools for the Seed Potato Industry. Ph.D. Thesis, Murdoch University, Western Australia.
- MORTIMER, S.M., M.G.K. Jones, R.A.C. Jones, G. Thomson, and G. I. Dwyer. 2009. A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses Simultaneously. *Journal of Virological Methods* 161: 289-296.
- NOME, S. F. 1995. Prueba de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicados al cultivo de tejidos. Cap 20. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. 670-675p.
- PÉREZ, M.L. y J.E. Rico. 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. Editorial de la Universidad de Guanajuato. 1ª. Edición. Guanajuato, Guanajuato, México. 143 p.
- RAMÍREZ, V.R., G. Frías y J.P. Martínez. 2006. Caracterización de variantes necróticas del virus PVY detectadas en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Biológicas* 8: 150162.
- RIVERS, E. 2007. Incidencia del *Virus del mosaico del dasheen* (dsmv) y producción de plantas libres del virus en Malanga (*Colocasia* spp.). Tesis. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- ROBLES-HERNÁNDEZ, L., A.C. González.Franco, J. Hernández.Huerta, T. M. Meacham, O. V. Nikolaeva, and A. V. Karasev. 2010. First Identification of an Unusual Recombinant *Potato virus Y* Strain in Potato in Mexico. *Plant Disease* 94 (10): 1262.
- SADOWY, E., M. Juszczyk, C. David, B. Gronenborn, and M. D. Hulanicka. 2001. Mutational analysis of the proteinase function of *Potato leafroll virus*. *Journal of General Virology* 82: 1517-1527.
- SALAZAR, F. 1990. Metodología Para La Detección De Virus de Papa: Pasado, Presente Y Futuro. *Revista Latinoamericana de la Papa* 3: 1-12.
- SALAZAR, L. F. 1997. Identificación y Control de Enfermedades Virales y Fitoplasmas de la Papa. Simposium Internacional de la Papa. Metepec, Estado de México.
- SMITH, I., J. Dunez, R. Lelliot, D. Phillips y S. Archer. 1988. Manual de enfermedades de las plantas. 1ra Edición. Editorial Blackwell Scientific Publications LTD. 76-78p.

- SMITH, K. 1931. On the composite nature of certain potato viruses of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators. *Proceedings of the Royal Society, B* 109: 251-267.
- SUSAIMUTHU, J., I. Tzanetakis, R. Gergerich, and R. Martin. 2008. A member of a new genus in the *Potyviridae* infects *Rubus*. *Virus Research* 131: 145-151.
- TALIANSKY, M., M.A. Mayo, and H. Barker. 2003. *Potato leafroll virus*: a classic pathogen shows some new tricks. *Molecular Plant Pathology* 4: 81-89.
- UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA (UNAD). 2012 Capitulo 5: Algunos virus vegetales limitantes en el área agrícola. Lección 21. Virus de la papa URL: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203016/contLinea/leccin_21_virus_de_la_papa.html.
- VÁZQUEZ, E. 2003. Bioquímica y Biología Molecular en línea. Instituto de Química de la UNAM. URL: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/pcr.html>.
- VERCHOT, J., C.M. Ye, and D. Bamunusinghe. 2007. Molecular biology of potexvirus: recent advances. *Journal of General Virology* 88 (6): 1643-1655.
- VIJAYAPALANI, P., M. Maeshima, N. Nagasaki-Takekuchi, and W.A. Miller. 2012. Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLOS Pathogens* 8: 4.
- WEI, T., M. Pearson, D. Blohm, M. Nölte, and K. Armstrong. 2009. Development of a short oligonucleotide microarray for the detection and identification of multiple potyviruses. *Journal of Virological Methods* 162: 109-118.
- ZIPPER, H., H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32, (12): 1-10. 

Este artículo es citado así:

González-Franco, A. C, Mariana Rodríguez-Rodríguez y Loreto Robles-Hernández. 2014. Principales virus que afectan al cultivo de papa y metodologías para su identificación y caracterización. *TECNOCENCIA Chihuahua* 8(3): 142-151.

Resumen curricular del autor y coautores

LORETO ROBLES HERNÁNDEZ. Título de Ingeniero Fruticultor (1992) y grado de Maestro en Ciencias de la Productividad Frutícola (1998) por la Universidad Autónoma de Chihuahua, y grado de Doctor en Fitopatología (2004) por la Universidad de Idaho, USA. Es profesor investigador en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realiza investigación en el estudio de enfermedades de cultivos hortícolas. Imparte los cursos de Fitopatología, Microbiología, Control Biológico y Fisiología y Tecnología de Poscosecha. Ha desarrollado proyectos de investigación con financiamiento externo. Ha dirigido y concluido varias tesis de maestría y licenciatura. Ha publicado capítulos de libros, artículos científicos y resúmenes en memorias de congresos nacionales e internacionales. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI), cuenta con el nombramiento de Perfil Deseable por la SEP-PROMEP y tiene dos primeros lugares por la presentación de los mejores trabajos de investigación, otorgados por la Sociedad Mexicana de Fitopatología y la Asociación Mexicana de Microbiología, respectivamente. Es revisor del Journal Plant Disease y de la Revista Mexicana de Fitopatología.

ANA CECILIA GONZÁLEZ FRANCO. Título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1992 y grado de Maestro en Ciencias de la Productividad Frutícola en 1995 por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Obtuvo su Doctorado en Microbiología, Biología Molecular y Bioquímica (2004) en la Universidad de Idaho, USA. Es profesor investigador en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realiza investigación en el Control Biológico de Enfermedades y en la Interacción-Microorganismo-Planta. Imparte las cátedras de Interacción-Microorganismo-Planta, Bioquímica, Química y Biotecnología. Ha desarrollado proyectos de investigación con financiamiento externo. Ha dirigido y concluido varias tesis de maestría y licenciatura. Ha publicado artículos científicos y resúmenes en memorias de congresos nacionales e internacionales. Cuenta con el nombramiento de Perfil Deseable por la SEP-PROMEP y tiene dos primeros lugares por la presentación de los mejores trabajos de investigación, otorgados por la Sociedad Mexicana de Fitopatología y la Asociación Mexicana de Microbiología, respectivamente.

MARIANA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ. Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua en el 2010. Obtención del título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo con la tesis titulada: "Obtención de principios activos de plantas con actividad biológica y aplicación como antifúngico frente a *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*". Actualmente se encuentra adscrita a la Maestría en Ciencias de la Productividad Frutícola, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua con el tema de investigación titulado, "Identificación y caracterización del Virus Y de la papa en diferentes cultivares de papa del estado de Chihuahua".