

PN AAR 130

Isn 3660

manual de

ENFERMEDADES VIROSAS DE LA PAPA

LUIS F. SALAZAR



CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)
Lima, Perú

1982

Sección 4

TRANSMISION DE LOS VIRUS DE PAPA	31
4.1 TRANSMISION MECANICA	31
4.1.1 Transmisión por contacto entre tubérculos o brotes de tubérculos	31
4.1.2 Transmisión por contacto entre hojas y raíces	32
4.2 TRANSMISION POR AFIDOS	32
4.2.1 Nota sobre la biología de los áfidos	33
4.2.2 Tipos de transmisión	33
4.2.3 Virus de papa transmitidos por áfidos	35
4.3 VIRUS TRANSMITIDOS POR OTROS INSECTOS	35
4.3.1 Transmisión por saltahojas	35
4.3.2 Trips	37
4.3.3 Coleópteros	37
4.4 TRANSMISION POR NEMATODOS	37
4.4.1 Virus transmitidos por nematodos	37
4.4.2 Nematodos vectores de virus	37
4.5 TRANSMISION POR HONGOS	38
4.6 TRANSMISION POR SEMILLA SEXUAL	39

Sección 5

DETECCION DE VIRUS POR SEROLOGIA	41
5.1 PRINCIPIOS BÁSICOS	41
5.2 PRUEBAS SEROLOGICAS	42
5.2.1 Microprecipitación	42
5.2.2 Látex sensibilizado con anticuerpos	43
5.2.3 La técnica serológica por medio de conjugados enzimáticos (ELISA)	44
5.3 ALGUNOS PROBLEMAS Y SOLUCIONES EN LA APLICACION DE ELISA ..	46
5.3.1 Reacciones no específicas	46
5.3.2 Especificidad de ELISA	51
5.3.3 Determinación de límites de confianza en lecturas colorimétricas	51
5.3.4 Reutilización de las placas de microtitulación	52

Sección 6

OTROS METODOS DE DETECCION DE VIRUS Y VIROIDES	53
6.1 PLANTAS INDICADORAS	53
6.2 DETECCION DEL VIROIDE DEL TUBERCULO AHUSADO DE LA PAPA (PSTV)	53
6.2.1 Detección en tomate	54
6.2.2 El uso de <u>Scopolia sinensis</u>	59
6.2.3 Detección de PSTV por electroforesis	59
6.2.4 Ventajas y desventajas en detección de PSTV por electroforesis y por tomate	61
6.2.5 Detección de PSTV por hibridación de ácidos nucleicos	61

Sección 7

CARACTERISTICAS DE LOS PRINCIPALES VIRUS DE PAPA	65
--	----

Sección 8

ECOLOGIA Y CONTROL	69
8.1 ECOLOGIA VIRAL	69
8.1.1 Especificidad del vector	69
8.1.2 Sistemas de supervivencia y diseminación	70
8.1.3 Influencias del clima y del ambiente	71
8.1.4 Influencias del huésped en la evolución de virus y viceversa	72
8.1.5 Efecto de prácticas culturales en diseminación de virus ..	73
8.1.6 Forma y cantidad de diseminación dentro del campo	74
8.1.7 Pérdidas debidas a enfermedades virosas	74
8.2 MEDIDAS DE CONTROL	75
8.2.1 Protección	75
8.2.2 Erradicación	80
8.2.3 Resistencia genética	82
8.2.4 Determinación de fuentes de resistencia y evaluación de poblaciones	84
8.2.5 Producción de semilla libre de virus	89
8.2.6 Principios de detección de virus en un programa de semillas	91
8.2.7 Límites de tolerancia de infección viral	92

Sección 9

REFERENCIAS SELECTAS 95

9.1	PRINCIPIOS Y TECNICAS GENERALES	95
9.2	VIRUS DE PAPA	96
9.3	TRANSMISION, DISEMINACION Y ECOLOGIA	97
9.4	DETECCION DE VIRUS	99
9.5	RESISTENCIA A VIRUS	100
9.6	EFFECTO DE LOS VIRUS	100
9.7	ERRADICACION DE VIRUS	101

APENDICES 103

APENDICE 1	Método para purificar γ -Globulina	103
APENDICE 2	Método para conjugar la enzima con γ -Globulina ...	104
APENDICE 3	Reactivos y "Buffer" necesarios en ELISA	105
APENDICE 4	Procedimiento para sensibilizar látex	106
REFERENCIAS	SOBRE EL APENDICE 4	109
APENDICE 5	Procedimientos para preparación de geles de acrilamida para separación electroforética de ácidos nucleicos	110

FIGURAS

FIGURA 1	Diferentes tipos de partículas virales, viroides y micoplasmas de papa	5
FIGURA 2	Síntomas causados por virus en el follaje	23
FIGURA 3	Síntomas causados por virus en el follaje	25
FIGURA 4	Síntomas causados por virus, viroides y micoplasmas en follaje y tubérculos	27
FIGURA 5	Anormalidades de origen no viral	29
FIGURA 6	El principio del método de doble anticuerpo para detectar virus	47
FIGURA 7	Reacción típica de precipitación con látex	49
FIGURA 8	Placa de ELISA con PVY que muestra reacción positiva (hoyos claros = amarillo) y negativa (hoyos oscuros = transparentes)	49

FIGURA 9	Síntomas causados por virus en plantas indicadoras ...	55
FIGURA 10	Métodos de detección de PSTV	57
FIGURA 11	Reducción del rendimiento en relación con el porcentaje de plantas infectadas con virus en un cultivo con infección secundaria	77
FIGURA 12	Inoculación masiva de plántulas de papa con pistola de presión ("spray gun") para evaluar resistencia a PVX y PVY	87

TABLAS

TABLA 1	Distribución, por su asociación al cultivo, de los virus y viroides que infectan <u>Solanum tuberosum</u> L.	2
TABLA 2	Síntomas locales o sistémicos causados por virus de papa en algunos hospederos de diagnóstico	9
TABLA 3	Grupos de virus que atacan plantas en los cuales hay uno o más miembros que afectan a la papa	11
TABLA 4	Afidos vectores y no vectores de virus de papa	36
TABLA 5	Detección del PSTV en semilla botánica de papa	63
TABLA 6	Características de los principales virus que afectan la papa	66
TABLA 7	Algunas fuentes de resistencia a virus de papa	83
TABLA 8	Tolerancia máxima de virus en semilla básica (última multiplicación)	93

✓

NOTA DEL AUTOR

En los últimos años el conocimiento sobre las enfermedades de la papa, especialmente de aquellas causadas por virus, se ha incrementado grandemente lo cual hace difícil mantener revisiones al día sobre el tema.

El Centro Internacional de la Papa (CIP), para atender su necesidad en entrenamiento, consideró oportuna la publicación de un manual sencillo que pudiese servir de guía en cursos de adiestramiento en su sede central o en las regiones. Así, el autor fue designado para compilar este manual en 1974. Sin embargo, la información presentada en la primera edición muy pronto resultó escasa ante el desarrollo de la virología en papa, tanto en el CIP como en otras instituciones. Por esta razón, la presente edición, incrementada en ciertos capítulos, representa un intento de llenar un vacío en información sobre virus de papa para estudiantes de habla hispana.

La información que aquí se presenta de ninguna manera sustituye a la existente en libros y manuales sobre el tema y más bien trata de dirigir al lector en la búsqueda de mayor información en ellos. Algunos capítulos han sido más elaborados que otros por la importancia práctica en el control de las enfermedades virosas.

Con el fin de abreviar, las citas bibliográficas se han omitido en el texto pero dicha información está contenida en las referencias selectas incluidas al final del manual.

Lima, setiembre de 1982

L.F. Salazar

ACRONIMOS DE LOS VIRUS MENCIONADOS EN EL MANUAL

PVA	:	Potato virus A
PVM	:	Potato virus M
PVS	:	Potato virus S
PVX	:	Potato virus X
PVY	:	Potato virus Y
PVT	:	Potato virus T
PLRV	:	Potato leafroll virus
APLV	:	Andean potato latent virus
APMV	:	Andean potato mottle virus
PBRV	:	Potato black ringspot virus
TRSV	:	Tobacco ringspot virus
TBRV	:	Tomato blackring virus
TNV	:	Tobacco necrosis virus
TRV	:	Tobacco rattle virus
TMV	:	Tobacco mosaic virus
PMTV	:	Potato mop-top virus
PSV	:	Potato stunt virus
PAMV	:	Potato aucuba mosaic virus
WPMV	:	Wild potato mosaic virus
CMV	:	Cucumber mosaic virus
PYDV	:	Potato yellow dwarf virus
BCTV	:	Beet (sugar) curly top virus
TSWV	:	Tomato spotted wilt virus
TSV	:	Tobacco streak virus
PSTV	:	Potato spindle tuber viroid
PYVV	:	Potato yellow vein virus
PDMV	:	Potato deforming mosaic virus
SALCV	:	Solanum apical leafcurl virus

NOMBRES EQUIVALENTES DE ENFERMEDADES DE LA PAPA CAUSADAS POR VIRUS
Y AGENTES RELACIONADOS
(De Hooker, W.J. 1981. "Compendium of potato diseases".)

Nombre común Agente causal	Otros nombres	Español	Alemán	Francés
Alfalfa mosaic virus AMV	Lucerne mosaic Calico Tuber necrosis virus	Mosaico de la alfalfa	Kalikokran- kheit	
Andean potato latent virus APLV		Virus la- tente de los Andes		
Andean potato mottle virus APMV		Moteado andino		
Aster yellows, stolbur, and allied disease Mycoplasma	Purple top wilt Tomato big bud Purple top roll Haywire Late breaking virus Blue stem Moron Purple dwarf Yellow top Bunch top Apical leafroll	Punta mo- rada Amarilla- miento apical violáceo	Stolburkran- kheit Parastolbur Metastolbur	
Deforming mosaic PDMV		Mosaico de- formante		
Potato aucuba mosaic PAMV	Pseudo net ne- crosis Tuber blotch Viruses F and G	Mosaico aucuba Mosaico necrótico	Akuba Mo- saik Aucuba- mosaik	Mosaïque d'auchuba
Potato leafroll virus PLRV	Potato phloem necrosis Tuber net necrosis	Enrolla- miento Enrollado Enanismo amarillo	Blattrollk- rankheit Blattroll- virus Knollennetz- nekrose	Enroulement
Potato mop-top PMTV	Mop-head Yellow mottling virus	Mop-top de la papa		

Nombre común Agente causal	Otros nombres	Español	Alemán	Francés
Potato spindle tuber viroid PSTV	Unmottled curly dwarf Tomato bunch top Gothic	Tubérculo ahusado	Spindelk- nollen- krankheit	Tubercules en fuseau Tubercules fusiforme
Potato virus A PVA	Mild mosaic	Mosaico suave	Rauhmosaik	Frisolée mosaique
Potato virus M PVM	Potato leaf- rolling mosaic Interveinal mosaic Paracrinkle Potato viruses E and K	Mosaico crespo	Rollmosaik	
Potato virus S PVS				
Potato virus T PVT				
Potato virus X PVX	Potato latent Potato mild mosaic Potato simple mosaic Healthy potato virus Potato viruses B and D	Mosaico latente Mosaico leve	Kartoffel X-Mosaik Leichtes Mosaik	Mosaique légère
Potato virus Y PVY	Rugose mosaic Streak Leafdrop streak scipple streak Potato virus C	Mosaico rugoso Mosaico severo	Strichelk- rankheit	Bigarrure Frisolée
Potato yellow dwarf PYDV		Enanismo amarillo	Gelbzwerg- igkeit	
Potato yellow vein PYVV	Vein yellowing virus	Amarilla- miento de las nerva- duras		

~~xtv~~

~~ix~~

Nombre común Agente causal	Otros nombres	Español	Alemán	Francés
Sugar beet curly top BCTV	Green dwarf	Punta crespa Broto crespo (Portuguese)		
Tobacco mosaic TMV		Mosaico del tabaco		
Tobacco necrosis TNV	Potato ABC disease	Virus de la necrosis del tabaco	Tabakne- krose- virus	
Tobacco rattle TRV	Stem mottle Spraing Corky ring- spot		Ratel- Virus Propfen- bildung Profenkran- kheit Stengelbunt- krankheit Stengelbunt Tabakmauche- virus	Tacheture
Tobacco ringspot TRSV	Andean potato calico			
Tomato black ring TBRV	Bouquet Pseudo- aucuba	Bouquet Pseudo- aucuba	Bukett- krankheit Bukettvirus Gelbflecki- gkeit	Bouquet
Tomato spotted wilt TSWV	Spottled wilt	Marchitez apical Necrosis de los brotes Necrose do topo (Portuguese) Viracabeca (Portuguese)	Bronzefle- ckenkrankheit	
Tobacco streak TSV		Necrose branca do fumo (Portuguese)		




Sección 1

INTRODUCCION

El efecto de los virus en la papa fue observado desde que ésta fue introducida a Europa (siglo XVII), al notar principalmente el enrollamiento o encrespamiento de las hojas y su asociación con bajos rendimientos. Debido a que el agente causante de estas enfermedades no había sido aún identificado, los síntomas o 'degeneración' de las variedades fueron atribuidos a la continua propagación vegetativa. Recién en el siglo XX las infecciones por virus fueron reconocidas como la causa principal de la llamada 'degeneración'.

Los virus infectan las plantas huéspedes (entran y se multiplican) y generalmente inducen enfermedad (desviación de la actividad biológica que resulta en la aparición de síntomas). Cuando la enfermedad no es evidente, la planta huésped puede ser tolerante o un portador asintomático. Desde las plantas infectadas, los virus se diseminan a plantas sanas por medio de sus vectores (insectos, nematodos u hongos), por contacto de partes de plantas enfermas con plantas sanas, y mecánicamente por medio de la maquinaria, el hombre y los animales.

Los virus y agentes similares que se han encontrado afectando a la papa en el mundo son numerosos, pero afortunadamente muy pocos revisten importancia económica significativa generalmente por su ocurrencia esporádica en el cultivo. Estos pueden ser divididos en dos grupos muy definidos por su asociación con el huésped (Tabla 1). Los virus que dependen en la papa para su supervivencia y diseminación generalmente tienen rango de huéspedes restringido a moderado, mientras que aquellos que no dependen en la papa para su supervivencia y diseminación tienen rango de huéspedes más amplio y pueden causar enfermedades económicamente importantes en otros cultivos.

Algunos virus son comunes en todas o casi todas las áreas donde se cultiva la papa, mientras que otros sólo son prevalentes en algunas. La mayor variabilidad de los virus de papa y sus variantes puede ser hallada en la región andina de Sudamérica. Como esta región es el centro de

TABLA 1. Distribución, por su asociación al cultivo, de los virus y viroides que infectan Solanum tuberosum L.

Virus dependientes de papa para supervivencia y diseminación		Virus no dependientes de papa para supervivencia y diseminación		No determinado
PVX	PLRV	TRV	CMV	PBRV
PVY	APLV	TMV	TBRV	PSTV
PVS	APMV	TSWV	TRSV	PYVV*
PVM	PSV		SALCV	PDMV*
PMTV			TSV	
PAMV			AMV	
WPMV			PYDV	
PVT			BCTV	

* Su origen viral aún no ha sido confirmado.

origen de la papa, la variabilidad es mayor en algunos virus que dependen de la papa para su supervivencia y diseminación, probablemente debido a su larga asociación con el huésped. La identificación de los virus de la papa y el reconocimiento de las enfermedades que causan al cultivo es de importancia primordial para el desarrollo de las medidas de control. Por ello, siempre ha existido gran interés en desarrollar métodos de detección sensitivos y eficientes en todos los programas de papa del mundo.

En este manual se describen las propiedades más resaltantes de los virus de papa y agentes similares, las enfermedades que causan y los métodos más apropiados de detección y control disponibles en el presente.

Sección 2

BREVE INTRODUCCION A LAS PROPIEDADES DE LOS VIRUS

2.1 COMPOSICION

Los dos componentes básicos de los virus son: ácido nucleico (ácido ribonucleico, RNA, o ácido desoxirribonucleico, DNA) y proteína. El ácido nucleico contiene la información que determina las propiedades de los virus como: infectividad, tamaño y forma de la partícula, propiedades generales de la cubierta proteica y probablemente las relaciones con sus vectores.

La mayoría de virus que afectan a la papa contienen RNA pero al menos dos de ellos ("beet curly top virus" y "solanum apical leaf curl virus") parecen contener DNA. El RNA puede ocurrir como de una o dos hebras, siendo la primera la forma más común. El porcentaje del peso de la partícula representado por RNA varía desde 5% hasta 40% dependiendo del virus. Algunos virus tienen moléculas de RNA de varios tamaños encapsadas en una misma o en diferentes partículas. En todos los virus la proteína es el componente que se halla en mayor concentración. Su función es la encapsidación del ácido nucleico. Sin embargo, las propiedades inmunológicas dependen de la proteína y posiblemente en el caso de algunos virus es necesaria para iniciar la infección y tiene una función importante en la transmisión por vectores.

Los agentes causantes de enfermedad más pequeños que se conocen son los viroides (Figura 1F), los cuales ocurren en la naturaleza como un RNA de una sola hebra, circular, y con alto grado de apareamiento de bases, sin cubierta proteica.

2.2 TAMAÑO Y FORMA

Estas características pueden ser determinadas con ayuda del microscopio electrónico. El tamaño es usualmente expresado en nanómetros (nm; 1nm; = 0,000 001 mm) o en Angstroms (\AA ; $1\text{\AA} = 0,1 \text{ nm}$).

Las partículas de los virus pueden ser alargadas o isométricas. Las partículas alargadas tienen simetría helicoidal y pueden ser bastones rígidos (Figura 1B), o flexuosas, las cuales usualmente se denominan filamentos (Figura 1A). Su longitud puede variar desde 45 hasta 2 000 nm y su ancho entre 11 y 19 nm.

Las partículas isométricas tienen apariencia redondeada (Figura 1C) o hexagonal (Figura 1D) y pueden variar entre 20 y 70 nm de diámetro. Algunos virus isométricos ocurren como partículas dobles (por ejemplo, el BCTV) o triples (SALCV) (Figura 1E). Las partículas baciliformes ocurren en PYDV y AMV.

Algunos virus ocurren normalmente con dos o más partículas de diferente tamaño (virus con genomas divididos). El TRV, por ejemplo, es un virus que se presenta con partículas de dos tamaños. La partícula más larga (190 nm) contiene la información que determina la infectividad y virulencia, mientras que la más pequeña (45-115 nm dependiendo de la variante) contiene la información que, entre otras propiedades, determina la producción de la cubierta proteica. La inoculación solamente con la partícula larga o su ácido nucleico reproduce el ácido nucleico que es infectivo pero no se producen partículas virales; mientras que la inoculación sólo con la partícula corta no causa infección. El AMV es un ejemplo de un virus con cinco tipos de partículas en el que por lo menos tres de ellas son necesarias para causar infección.

En una población de partículas de cualquier virus el tamaño aceptado es aquél representado por la longitud de la media modal (valor de la longitud que ocurre con mayor frecuencia).

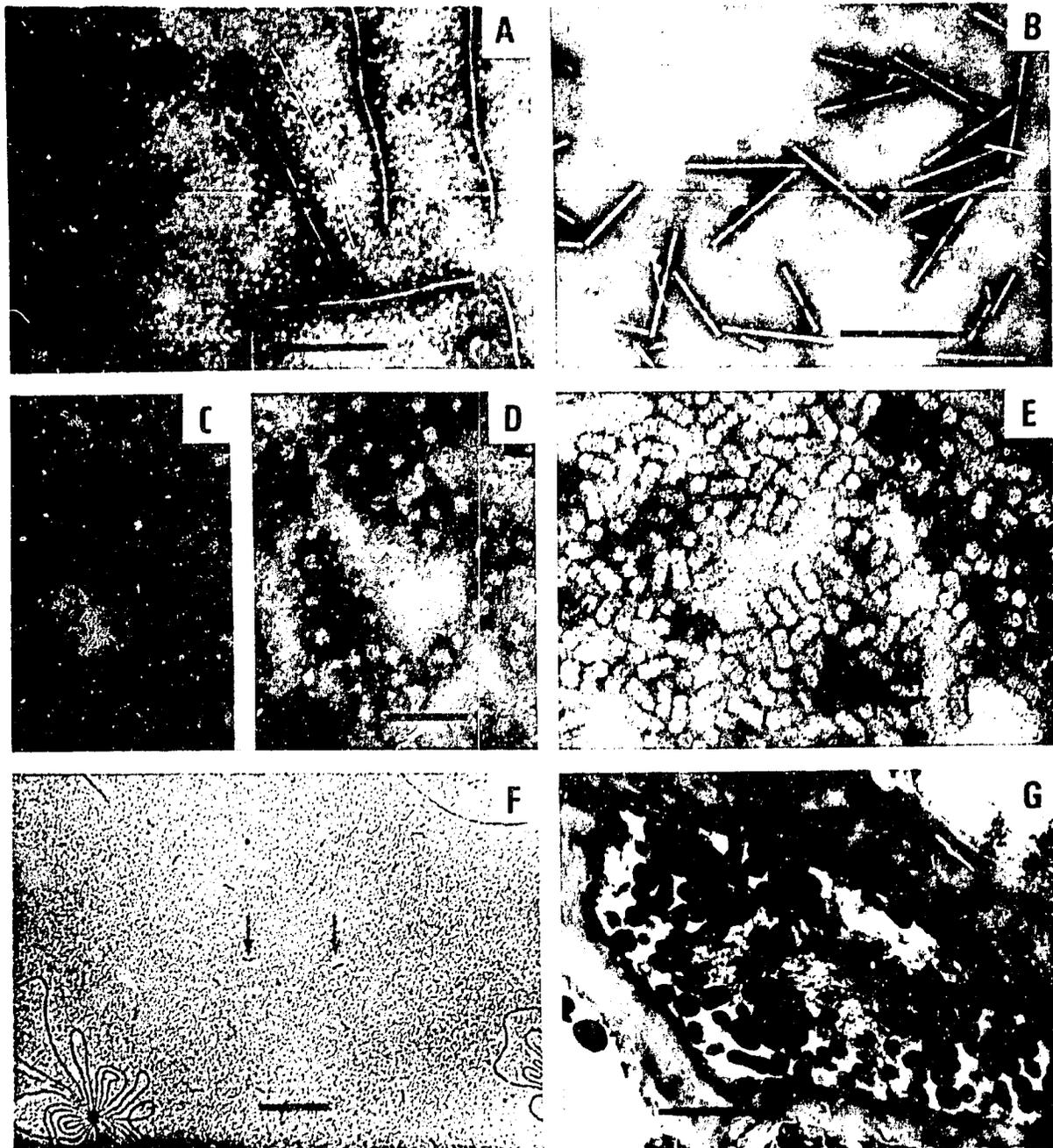


FIGURA 1. Diferentes tipos de partículas virales, viroides y micoplasmas de papa.

- A) Partículas alargadas flexuosas de PVY; referencia = 300 nm.
- B) Partículas alargadas rectas (bastones) de TMV; referencia = 300 nm.
- C) Partículas redondeadas de TSV; referencia = 50 nm.
- D) Partículas isométricas de PLRV; referencia = 100 nm.
- E) Partículas triples de SALCV; referencia = 100 nm.
- F) Moléculas de PSTV (flechas); referencia = 250 nm. (Foto cortesía de T.O. Diener.)
- G) Cuerpos pleomórficos de MLO's dentro de una célula del floema; referencia = 1000 nm.

2.3 VARIANTES ("STRAINS")

"Strains" son variantes de un virus que pueden diferir en virulencia, sintomatología producida en una variedad en particular, rango de hospederos y síntomas, propiedades físicas, habilidad para ser transmitidos por vectores, reacciones inmunológicas, etc. La mayoría de virus de la papa tiene diferentes variantes. Cuando una variante infecta una planta, generalmente evita la infección con otra variante del mismo virus. Este fenómeno llamado protección cruzada ha sido usado o propuesto como un método de control de PVX, ya que la infección de las plantas con una variante menos virulenta las protege de la infección con variantes más severas.

2.4 INFECCION Y DISEMINACION

El término infección en virología es considerado como el proceso inicial de entrada y multiplicación del virus en el hospedero. Un hospedero es por lo tanto una planta susceptible en la cual un virus puede multiplicarse.

Infección primaria significa infección por el virus durante la estación de cultivo, mientras que infección secundaria se denomina comúnmente a aquella originada de tubérculos infectados o de otras partes para propagación vegetativa de la planta.

Los virus que se diseminan por la semilla botánica dan lugar a infección secundaria.

Las plantas puedan mostrar síntomas como consecuencia de la infección o los síntomas pueden ser "enmascarados" debido a la variante del virus, el genotipo de la planta y el medio ambiente. En el último caso, el hospedero es un portador asintomático y el virus es considerado como causante de infección latente o asintomática. Plantas de papa o malezas infectadas que crecen dentro o fuera del campo de cultivo pueden constituir reservorios de virus de donde pueden ser diseminados mecánicamente o por medio de vectores a plantas sanas.

Previous Page Blank

La diseminación de virus desde estos reservorios es comúnmente conocida como diseminación primaria, mientras que la diseminación de los virus de plantas de papa infectadas dentro del cultivo se conoce como diseminación secundaria.

2.5 RANGO DE HOSPEDEROS

La mayoría de virus infectan no sólo al hospedero principal sino también a otras especies en otros géneros y familias.

La capacidad para infectar unas cuantas especies o un gran número de ellas es conocida como rango de hospederos. Este puede ser restringido, moderado o amplio, dependiendo del número de especies que el virus puede infectar. Un ejemplo de rango de hospederos restringido es aquél del PVT o el APMV; uno moderado es el caso del APLV o el PVX, mientras que uno amplio es el del TRV. Evidentemente, los virus que dependen de la papa para sobrevivir tienen un rango de hospederos restringido o moderado, mientras que aquéllos no dependientes de dicho cultivo, como el TRV o el TMV, tienen rangos de hospederos amplios. Algunos hospederos reaccionan con síntomas conspicuos, sean éstos generalizados o localizados, y pueden ser usados como hospederos de diagnóstico o plantas indicadoras. En la Tabla 2 se nombran las plantas indicadoras más adecuadas para algunos virus conocidos de papa.

2.6 RELACIONES ENTRE VIRUS Y CLASIFICACION

El estudio de las diversas propiedades de los virus de vegetales ha permitido el desarrollo de sistemas de clasificación y con ello el agrupamiento de virus con propiedades similares. Las propiedades principales que se han tomado en cuenta son: forma y tamaño de la partícula (o las partículas); tipo, número y tamaño del ácido nucleico; relaciones inmunológicas; y, vector y tipo de transmisión.

Las reacciones inmunológicas son de alta significación para la determinación de variantes de los virus y como método de diagnosis. Por ello, al igual que la transmisión, son detalladas en capítulos separados.

TABLA 2. Síntomas* locales (L) o sistémicos (S) causados por virus de papa en algunos hospederos de diagnóstico.

	PVX	PVX	PVA	PLRV**	PVS	PVM	PVT	APMV	APLV	PMTV	TRV	PSTV
<u>Nicotiana tabacum</u>	L,S	S	S	-	-	-	-	S	S	-	L,S	-
<u>N. clevelandii</u>	S	S	S	-	-	-	-	(S)	S	-	S	-
<u>N. glutinosa</u>	S	S	S	-	-	-	-	S	S	-	S	-
<u>N. debneyi</u>	S	S	S	-	(S)	(L)	S	S	S	S	S	-
<u>Physalis floridana</u>	L,S	L,S	S	(S)	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Lycopersicon esculentum</u>	S	S	S	-	-	S	-	-	-	-	-	(S)
<u>Datura stramonium</u>	S	-	-	(S)	-	-	-	S	-	-	-	-
<u>D. metel</u>	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Gomphrena globosa</u>	(L)	-	-	-	L	L	-	-	-	-	L	-
<u>Chenopodium amaranti- color</u>	L	L/-	-	-	L/-	L/-	(S)	-	(L)	(L)	(L)	-
<u>C. quinoa</u>	L	L/-	-	-	L/S	-	S	-	L	-	L	-
<u>Phaseolus vulgaris</u>	-	-	-	-	-	L	L/-	-	-	-	L	-
Clone A6	L	(L)	(L)	-	L/-	-	-	-	-	-	-	-

* Para cada virus se registran sólo síntomas con valor en diagnóstico. La susceptibilidad o insusceptibilidad del huésped al virus no se ha considerado. Síntomas sin valor en diagnóstico se representan por -.

** Transmitido por áfidos o injerto.

Las letras dentro de círculos indican el mejor síntoma de diagnóstico para cada combinación virus-huésped.

La papa (Solanum tuberosum L.) es quizás una de las especies vegetales más susceptibles a muchos virus. En la Tabla 3 se enumeran los diversos grupos de virus en los cuales hay uno o más miembros que afectan a la papa.

La clasificación de virus tiene una gran importancia para predecir las propiedades de un virus poco estudiado o en estudio. De la misma manera permite suponer el riesgo que podría representar algún virus en un sistema ecológico y también puede servir para desarrollar medidas adecuadas de control.

TABLA 3. Grupos de virus que atacan plantas en los cuales hay uno o más miembros que afectan a la papa.

Grupo de virus	Miembro típico en papa	Tamaño de partícula (nm)	Tipo y N° de piezas del ácido nucleico	Transmisión natural
Tobraviruses	TRV	190-45x22	RNA (2)	Nematodos
Tobamoviruses	TMV-PMTV	300x18	RNA (1)	Mecánica, Hongo
Potexviruses	PVX	520x13	RNA (1)	Mecánica,
Potyviruses	PVY	740x11	RNA (1)	Afidos
Closteroviruses	None	1200-2 000x10	RNA (1)	Afidos
?	PVT	640x10	RNA (1)	Semilla botánica
Carlaviruses	PVS	640x11	RNA (1)	Mecánica, áfidos
Luteoviruses	PLRV	25	RNA (1)	Afidos
Rhabdoviruses	PYDV	380x75	RNA (1)	Saltahojas
Cucumoviruses	CMV	30	RNA (4)	Afidos
Geminiviruses	BCTV	17 (pares)	? (DNA)	Saltahojas
	PALCV	17 (triples)	?	?
Tymoviruses	APLV	28	RNA (1)	Escarabajos
Comoviruses	APMV	28	RNA (2)	Escarabajos
Nepoviruses	PBRV	28	RNA (2)	Nematodos
Iilarviruses	TSV	28	RNA (4)	Mecánica?
Tomato spotted wilt	TSWV	80	RNA (1)	Trips
Tobacco necrosis virus	TNV	26	RNA (1)	Hongos
Alfalfa mosaic virus	AMV	58, 52, 42x18	RNA (3)	Afidos

Sección 3

SINTOMATOLOGIA

3.1 INFORMACION BASICA

Los síntomas observados en plantas de papa infectadas por virus pueden ser impresionantes y complejos. Algunos virus pueden inducir síntomas en la mayoría de los órganos de la planta mientras que otros sólo en algunos. El estudio de la sintomatología requiere de una observación cuidadosa y periódica de las plantas infectadas con el fin de determinar con precisión la calidad, intensidad y prevalencia de cualquier desvío anormal. Dependiendo de cuando ocurre la infección, se desarrollan dos clases de síntomas: primarios y secundarios. Los síntomas primarios son aquellos que ocurren durante la estación de cultivo inmediatamente después de que las plantas han sido infectadas (infección primaria). El ejemplo más común es el enrollamiento de los brotes apicales por infección primaria con PLRV. Los síntomas secundarios son aquellos exhibidos por plantas desarrolladas de tubérculos infectados. Por ejemplo, el enrollamiento a partir de las hojas basales con PLRV.

En forma general, un virus tiende a causar un tipo particular de síntoma. Sin embargo, existen varios virus que producen síntomas similares en la misma variedad de papa, o algunas variedades que reaccionan en forma diferente con el mismo virus. Además las infecciones simultáneas con dos o más virus pueden complicar el estudio sintomatológico al producir síntomas más severos o diferentes de aquellos causados por cada virus individualmente. Por estas razones, aunque la sintomatología es una ayuda importante para detectar plantas infectadas en el campo, no es siempre un criterio seguro para identificar al virus involucrado.

Una planta infectada y que no muestra síntomas se denomina portador asintomático. Este es el caso de las variedades llamadas "tolerantes". Desde el punto de vista de la diseminación del virus, este tipo de planta puede ser más peligroso que otro que reaccione con síntomas. El

"enmascaramiento" de síntomas, común con algunos virus de papa, puede ser debido a condiciones del medio ambiente, al genotipo de la planta y a la variante del virus. Entre los factores ambientales, la temperatura es el de mayor importancia. Por ejemplo, el mosaico producido por PVX no se observa o es muy ligero a temperaturas superiores a 28°C o menores de 10-12°C.

De otro lado, la combinación del genotipo de la planta y de la variante del virus parece ser importante en la intensidad del síntoma. Por ejemplo, se ha observado que variedades primitivas de S. tuberosum ssp. andigena naturalmente infectadas con PVX o PVY generalmente no muestran síntomas conspicuos. En este caso es difícil separar estos dos factores y más bien parece ser un balance biológico desarrollado a través del tiempo por la selección de variantes suaves del virus y variedades tolerantes del hospedero. El efecto del genotipo del hospedero es determinante en la calidad del síntoma causado por PLRV. En variedades de S. t. ssp. tuberosum el síntoma es el típico enrollamiento de las hojas, mientras que en cultivares primitivos de S. t. ssp. andigena se produce un síntoma denominado "enanismo amarillo" con o sin enrollamiento conspicuo en las hojas. En este último caso no se ha descartado aún la presencia de otro virus desconocido en plantas infectadas.

A continuación se describen los síntomas más comunes hallados en papa por infección con virus, viroides o micoplasmas. Al final se menciona otro grupo de síntomas causados por defectos genéticos o condiciones fisiológicas de la planta, los cuales pueden ser confundidos con síntomas causados por infecciones virales.

3.2 SINTOMAS CAUSADOS POR VIRUS EN PAPA

3.2.1 Síntomas en el follaje.

.1 Aclaramiento de nervaduras. Nervaduras con color más claro que el normal. Generalmente empieza por la base de los folíolos y principal-

mente como consecuencia de infección primaria. Usualmente es transitorio, antecediendo a los mosaicos.

.2 Mosaico o moteado. Áreas de color verde claro o cloróticas en las hojas. Algunas veces estas áreas son predominantes dejando algunas áreas de color verde normal circunscritas como "islas".

.3 Amarillamiento. Es la pérdida del color verde en las hojas. Puede ser total, parcial o el reemplazo del verde por amarillo intenso. Hay varios tipos:

.3.1 Clorosis. Es la pérdida del color verde normal uniformemente en parte o en todo el follaje. No ocurre en forma de manchas o puntos.

.3.2 Cálico. Presencia de áreas de color amarillo intenso en contraste con el verde normal de las hojas. Generalmente se presenta como áreas grandes que empiezan en cualquier lado del folíolo.

.3.3 Aucuba. Manchas amarillas en las hojas. Usualmente son pequeñas, localizadas o diseminadas. Las manchas pueden coalescer pero aún individualizarse.

.3.4 Líneas y arcos amarillos o cloróticos. Se incluyen anillos completos, anillos parciales (arcos) y líneas sinuosas en las hojas.

.3.5 Amarillamiento de nervaduras. Amarillamiento de las nervaduras o a los costados de las mismas.

.4 Pigmentación anormal. Manchas irregularidades de color diferente al verde o amarillo. Se destacan dos tipos:

.4.1 Antocianescencia. Pigmentos azules, púrpuras, violetas o negros (no necróticos) en áreas irregulares generalmente visibles en el envés de los folíolos. Gran parte de la hoja puede mostrar la pigmentación. Usualmente asociada con deformación de la hoja, enrollamiento o encrespamiento.

.4.2 Bronceamiento. Coloración gris u opaca presente usualmente en la parte superior de la hoja. Puede ser parcial o de todo el follaje.

.5 Cambios en forma, tamaño o textura.

.5.1 Reducción del tamaño de las hojas. Hojas de tamaño reducido en comparación con aquellas de plantas sanas. Este síntoma puede no ser fácilmente detectado si cerca no existen plantas sanas.

.5.2 Enrollamiento. Encarrujamiento o doblez extrema del folíolo teniendo la nervadura central como eje y generalmente más prominente hacia la punta del folíolo.

.5.3 Encrespamiento. Sinuosidad en el margen de los folíolos. Generalmente está asociado con mosaico o moteado.

.5.4 Deformación de las hojas. Las hojas pierden su forma normal por alargamiento o ensanchamiento del limbo. Generalmente está asociado con engrosamiento u otro defecto de las nervaduras.

.5.5 Rugosidad. La superficie de la hoja es rugosa o ampollada; generalmente ocurre en toda el área foliar de la planta.

.5.6 Hoja coriácea. Folíolos que se tornan quebradizos.

.5.7 Enación. Sobrecrecimientos de la lámina de las hojas usualmente a lo largo de las nervaduras.

.6 Cambios en el ángulo de inserción de las hojas.

.6.1 Erectez. Las hojas forman ángulos agudos (menos de 60°) en relación con el tallo.

.6.2 Epinastia. Las hojas forman ángulo obtuso (más de 90°) en relación con el tallo, generalmente asociado con una curvatura del pecíolo.

.7 Necrosis del follaje.

.7.1 Necrosis apical. Acronecrosis o necrosis descendente (reacción de hipersensibilidad), en todos o sólo algunos tallos.

.7.2 Necrosis sistémica. Líneas o manchas necróticas distribuidas parcialmente o en todo el follaje. También se incluyen anillos necróticos, arcos o líneas sinuosas.

.7.3 Necrosis de las nervaduras. Necrosis sistémica en las nervaduras por el envés de los folíolos. Puede ocurrir a lo largo de toda la nervadura, parcialmente, o como necrosis discontinua. Los folíolos pueden doblarse hacia abajo.

.7.4 Caída de hojas. Caída parcial o total de hojas necróticas. Usualmente empieza por las hojas de la parte inferior de la planta. Algunas hojas muertas pueden quedar colgando del tallo.

.8 Cambios en el aspecto general de la planta.

.8.1 Enanismo. Plantas que generalmente emergen más tardíamente y permanecen pequeñas en comparación con plantas sanas. Algunas veces los tallos son exageradamente gruesos.

.8.2 Debilidad. Tallos delgados y débiles. Plantas usualmente prostradas.

.8.3 Arrosetamiento. Hojas pequeñas y encrespadas reunidas en apículos terminales a lo largo del tallo. Algunas veces denominado "bouquet".

.8.4 Escoba de brujas. Proliferación de brotes axilares en tallos principales; generalmente asociada con clorosis y reducción del tamaño de las hojas. Este síntoma es comúnmente relacionado con infección por micoplasma (MLO).

3.2.2 Síntomas en tubérculos.

.1 Cambios en forma y posición.

.1.1 Ahusamiento. Estrechamiento gradual del grosor del tubérculo; más pronunciado en la inserción con el estolón.

.1.2 Tubérculos aéreos. Crecimiento de tubérculos en las axilas de las hojas, con estolones o sin ellos. Es un síntoma común en infecciones con micoplasmas.

.1.3 Sobrecrecimientos. Hinchamientos o tuberculillos que crecen del tubérculo principal.

.1.4 Rajaduras. Rajaduras finas, superficiales o profundas.

3.2.2.2 Necrosis del tejido.

.2.1 Anillos necróticos. Manchas anilladas o líneas irregulares visibles sea en la superficie o más profundamente en los tubérculos.

.2.2 Lesiones necróticas. Usualmente lesiones circulares, hundidas y secas de tamaño variable.

.2.3 Necrosis en red. Líneas necróticas que forman red en el interior del tubérculo.

.2.4 Manchas necróticas internas. Lesiones necróticas circulares o irregulares internas en el tubérculo.

3.2.2.3 Pérdida del vigor de brotes.

.3.1 Ahilamiento de brotes. Brotes delgados y generalmente alargados.

.3.2 Necrosis de brotes. Brotes total o parcialmente necróticos.

3.3 ANORMALIDADES SIMILARES A LAS VIRALES PERO DEBIDAS A OTRAS CAUSAS

En papa ocurre una gran cantidad de síntomas cuyo origen no es viral. Algunos de ellos pueden ser debidos a infecciones por microorganismos u organismos, pero la gran mayoría son de origen genético o tienen causas fisiológicas. Sólo algunas de ellas se mencionan a continuación:*

3.3.1 Anormalidades en el follaje.

.1 Cambio de color.

.1.1 Mosaico o moteado. No hay diferencia marcada con los síntomas causados por virus. Generalmente las áreas cloróticas están más circunscritas a áreas definidas y de color más claro que en la mayoría de los mosaicos virales. Generalmente es debido a desviaciones genéticas.

.1.2 Amarillamiento. El color amarillo intenso comúnmente ocurre en un solo lado de la hoja y el cambio de las áreas amarillas a verdes es repentino, sin ninguna señal de transición. Estos síntomas también se denominan quimeras y son desviaciones de origen genético. En algunos genotipos (por ejemplo cultivares de *S. t.* ssp andigena), han sido observados otros amarillamientos ocasionados por aplicación de algunos insecticidas a base de piretroides sintéticos, o por exceso o deficiencia de algunos elementos menores en la fertilización.

.1.3 Clorosis. Este es un síntoma muy común de deficiencia de elementos nutritivos (por ejemplo, deficiencia de nitrógeno o magnesio). Algunas marcas cloróticas han sido observadas por efecto de baja temperatura y pueden conducir a necrosis de las hojas.

* Para mayor información revisar: Hooker W.J., (ed), 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 166 pp.

.2 Anormalidades en la forma de las hojas.

.2.1 Enrollamiento apical. Este síntoma es muy similar al causado por infección primaria con el virus del enrollamiento de las hojas y puede ser producido por toxicidad de la saliva del áfido Macrosiphum euphorbiae cuando se alimenta en esa parte de la planta.

.2.2 Enrollamiento general. Muy similar al causado por PLRV. Es considerado de origen genético. Hay variedades muy propensas a este daño por calor excesivo o deficiencia hídrica.

.2.3 Encrespamiento. A veces asociado con mosaico; parece ser de origen genético.

.2.4 Ampolladuras. También asociado con mosaico y de origen genético. Las hojas aparecen fuertemente rugosas.

.3 Necrosis en hojas y tallos.

Este síntoma no es muy común, sin embargo, la necrosis de las nervaduras se presenta en ciertas progenies híbridas. También se han observado estrías necróticas en los tallos de algunos cultivares o progenies híbridas.

.4 Anormalidades en la forma general de la planta.

.4.1 Enanismo. Este síntoma puede resultar por infecciones con algunos organismos (por ejemplo, Globodera pallida), o por falta de nutrientes.

.4.2 Alargamiento. Crecimiento excesivo del tallo principal en algunas plantas en el cultivo; como consecuencia se notan algunas plantas más altas que lo normal. Generalmente se le ha considerado una reversión genética hacia progenitores silvestres. El rendimiento de plantas con estos síntomas es menor que el de plantas normales.

.4.3 Ramificación excesiva. Muy similar a escoba de brujas, generalmente sin clorosis. Es también considerado una reversión hacia ancestros silvestres. Las plantas afectadas comúnmente producen tubérculos muy pequeños.

.4.4 Engrosamiento de nudos. Este síntoma es comúnmente asociado con epinastia, ligera marchitez y antocianescencia, asemejando infecciones con micoplasmas. Sin embargo, se le ha encontrado causado por infecciones con algunos hongos en las raíces (por ejemplo, Rhizoctonia solani). Las principales diferencias con infecciones por micoplasmas son la menor deformación en la parte apical y ausencia de acortamiento de los entrenudos.

3.3.2 Anormalidades en los tubérculos.

.1 Brotes ahilados.

En ausencia de micoplasmas este síntoma parece ser originado por condiciones adversas de cultivo. Algunas variedades no adaptadas al calor parecen ser susceptibles a producir estos síntomas. Sin embargo, no puede descartarse la presencia de algunos hongos u otros patógenos poco estudiados.

.2 Necrosis.

La necrosis interna o externa en forma de manchas o áreas extensas puede ser producida por diversas causas. Los golpes en los tubérculos después de la cosecha o la aplicación de ciertos productos químicos en dosis excesivas (generalmente productos para eliminar el follaje) son las causas más comunes.

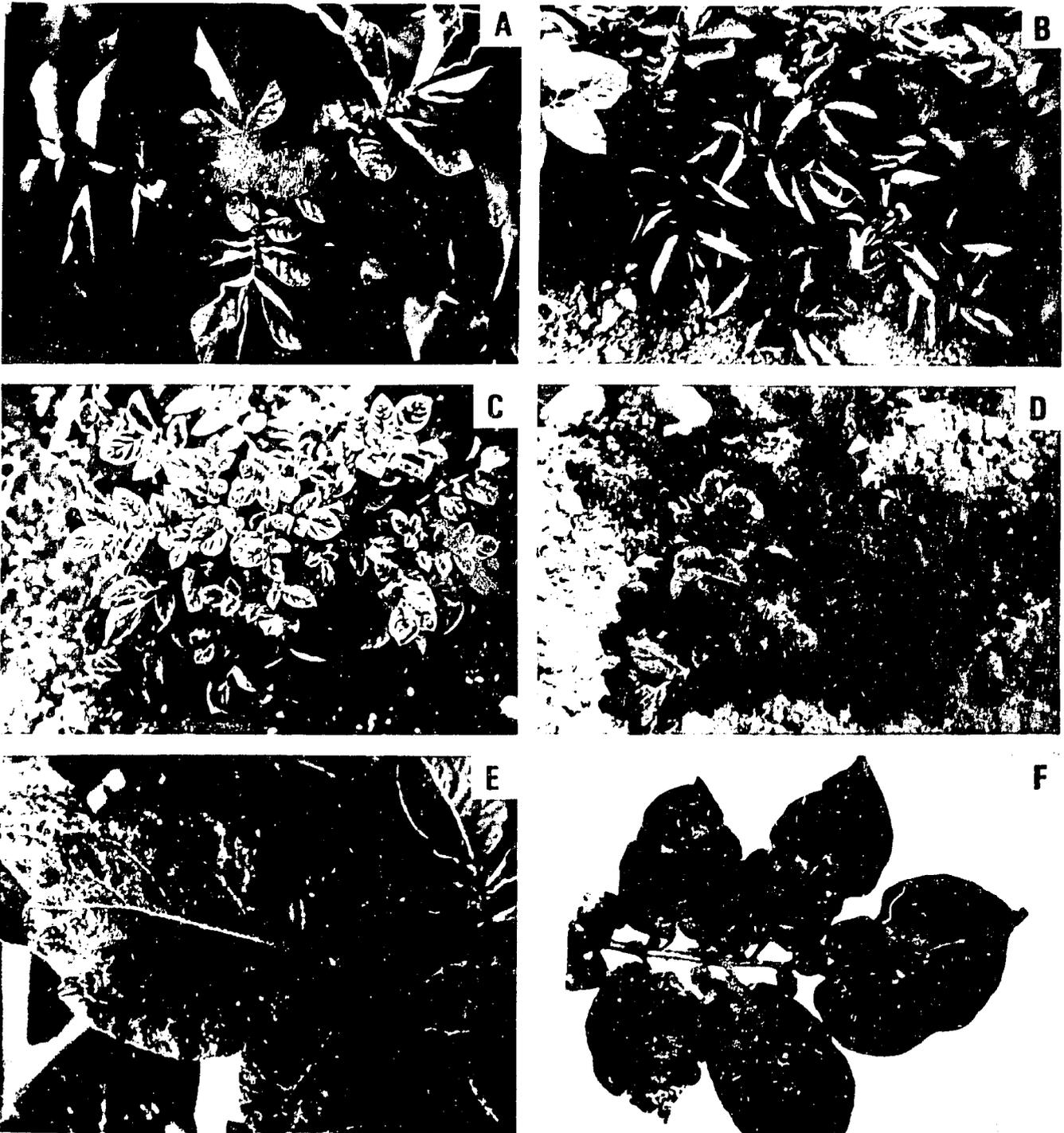


FIGURA 2. Síntomas causados por virus en el follaje.

- A) Enrollamiento apical (síntoma primario) por PLRV.
- B) Enrollamiento ascendente (síntoma secundario) típico de PLRV.
- C) Clorosis y detención del crecimiento (enanismo amarillo) causado por PLRV en un cultivar de *S. andigena*.
- D) Rugosidad, mosaico y arrosetamiento por PVY.
- E) Mosaico común y ligera rugosidad por PVY.
- F) Moteado severo por APMV.

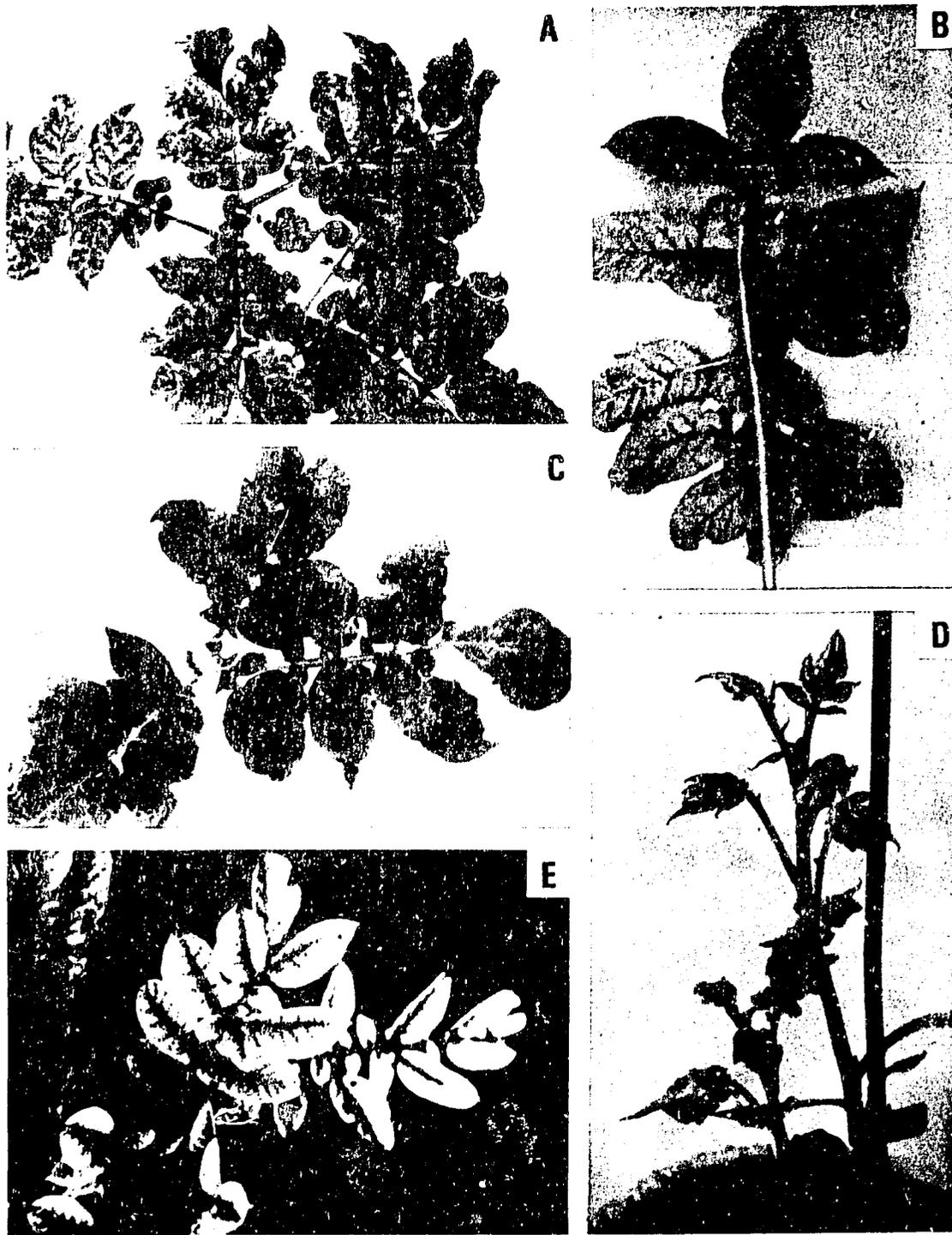


FIGURA 3. Síntomas causados por virus en el follaje.

- A) Mosaico y encrespamiento causado por PVA.
- B) Necrosis de las nervaduras causado por PVY.
- C) Manchas y anillos necróticos por PBRV.
- D) Deformación de las hojas en infección secundaria por TSV.
- E) Amarillamiento de nervaduras (etapa final) por PYVV.

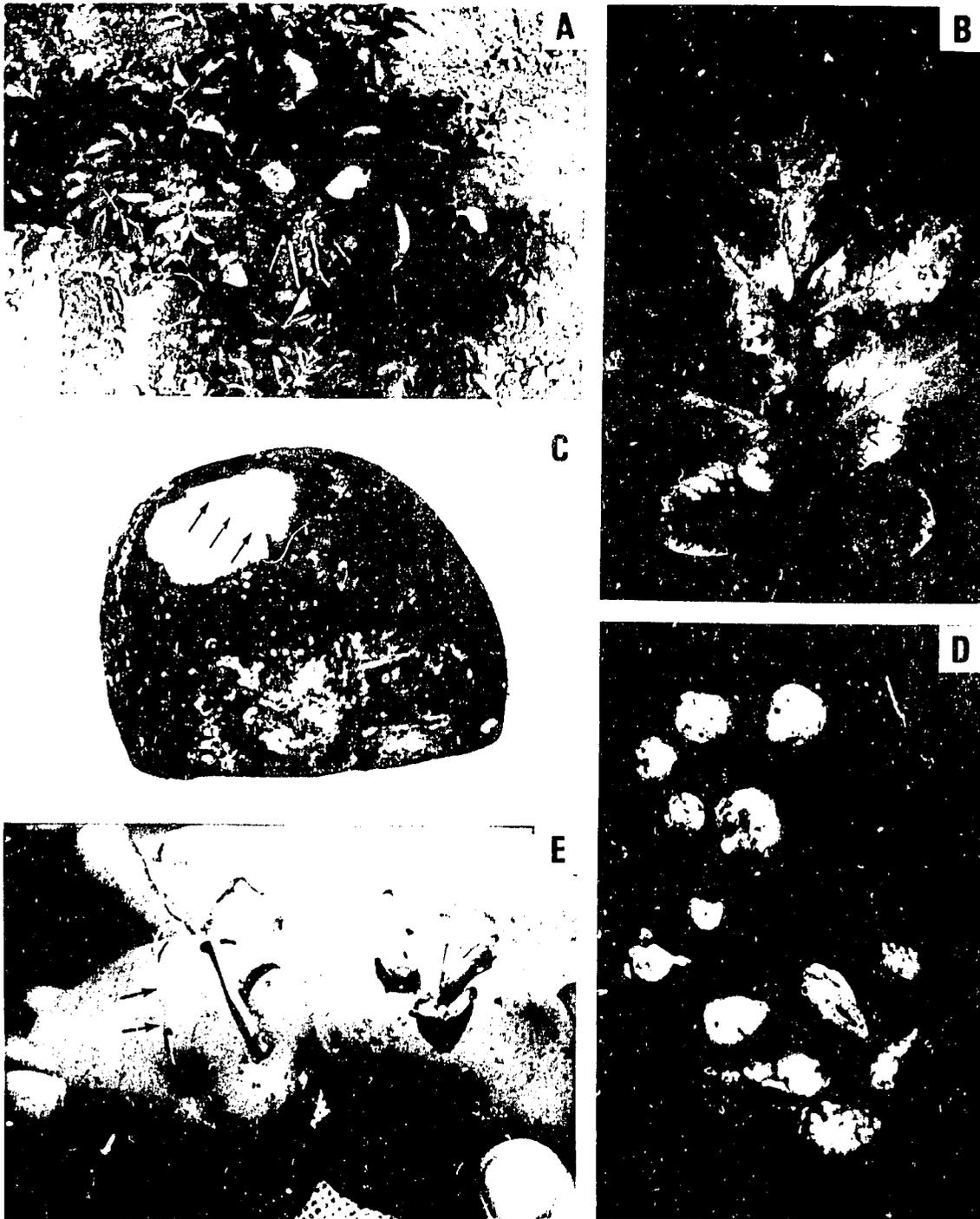


FIGURA 4. Síntomas causados por virus, viroides y micoplasmas en follaje y tubérculos.

- A) Escoba de brujas causado por infección con micoplasmas.
- B) Líneas y manchas amarillas causadas por PMTV.
- C) Anillos necróticos (flechas) en la pulpa del tubérculo por infección primaria con PMTV ("spraing").
- D) Ahusamientos, rajaduras y sobrecrecimientos en tubérculos (parte baja) infectados con PSTV. (Foto cortesía de J.E. Bryan.)
- E) Brotes ahilados en tubérculos infectados (flechas) con PVX + PVY. El tubérculo de la derecha tiene brotes normales.



FIGURA 5. Anormalidades de origen no viral.

- A) Deformación de hojas y ampolladuras aparentemente de origen genético.
- B) Necrosis de las nervaduras (flecha) de origen genético.

Sección 4

TRANSMISION DE LOS VIRUS DE PAPA

En condiciones naturales, los virus de papa pueden ser transmitidos de plantas infectadas a plantas sanas de varias maneras: a) por contacto o transferencia de jugo infectado, b) por semilla o polen, c) por vectores como áfidos, saltahojas, trips, hongos y nematodos.

Para trabajo experimental, la transmisión mecánica es la más importante, pero con aquellos virus que no pueden ser transmitidos mecánicamente pueden utilizarse injertos.

4.1 TRANSMISION MECANICA

Varios virus que afectan a la papa son estables en jugo extraído de plantas infectadas y por ello pueden diseminarse por contacto entre plantas, o pueden ser transferidos por equipos, maquinaria, animales y aun ropa de los operarios. Probablemente ellos entran en las plantas sanas a través de heridas ocasionadas durante el manejo de las plantas.

Los virus transmitidos mecánicamente son PVX, PVS, APMV, APLV, el viroide del tubérculo ahusado y TMV. Algunos de estos posiblemente también sean transmitidos en forma natural por insectos masticadores.

4.1.1 Transmisión por contacto entre tubérculos o brotes de tubérculos.

Algunos virus pueden diseminarse cuando los tubérculos sanos, especialmente si están brotando, se ponen en contacto con tubérculos infectados en el almacén. El PVX parece que no es transmitido en esta forma por los tubérculos. Sin embargo, puede ser transmitido cuando los tubérculos son cortados antes de la siembra. El PSTV también es transmitido fácilmente de esta manera. Aparentemente la transmisión del PVY, PVS y PVM no ocurre de esta manera o no tiene mayor importancia.

4.1.2 Transmisión por contacto entre hojas y raíces.

Bajo condiciones de campo el PVX y el PSTV pueden ser fácilmente transmitidos a plantas sanas que están en contacto con plantas enfermas. La diseminación secundaria de estos virus puede ser alta en un campo bajo cultivo normal. El viento, que favorece el contacto entre plantas, incrementa las posibilidades de diseminación de estos virus. El PVY^N también puede ser transmitido por contacto entre hojas, aunque no fácilmente. La proporción de transmisión de estos virus por contacto no es conocida exactamente. Este tipo de diseminación depende de varios factores como la susceptibilidad del cultivar, la virulencia de la variante del virus, el estado de fertilidad del cultivo, el espaciamiento entre los surcos y la distancia entre plantas, además de otros.

Aparentemente, la transmisión por contacto es más frecuente en invernaderos que en condiciones de campo. Esto quizás depende del estado fisiológico de las plantas, las cuales son más jugosas y susceptibles bajo condiciones de invernadero. Se ha observado la transmisión de PVX por contacto entre raíces, pero no existe tal evidencia para otros virus de papa.

4.2 TRANSMISIÓN POR AFIDOS

Esta forma de transmisión es trascendental en papa, pues los dos virus más ampliamente distribuidos e importantes, enrollamiento de las hojas (PLRV) y virus Y de la papa (PVY), son transmitidos por áfidos.

Además de transmitir virus, los áfidos también pueden causar daños al cultivo. En plantas de papa infestadas con el áfido Macrosiphum euphorbiae, ocurre un síntoma parecido a infecciones virosas denominado "enrollamiento de las puntas".

4.2.1 Nota sobre la biología de los áfidos.

Los áfidos tienen un ciclo de vida bastante complejo en el que alternan generaciones sexuales y asexuales. Huéspedes primarios son aquellos en los cuales los áfidos depositan sus huevos. Usualmente son plantas perennes, arbustos o árboles. Los huevos permanecen latentes en el huésped primario y cuando las nuevas hojas empiezan a desarrollarse, eclosionan produciendo hembras ápteras. La descendencia inmadura es denominada ninfas y se desarrolla a través de cinco estados. Después de unas cuantas generaciones las hembras ápteras producen hembras aladas. Estas nuevas generaciones migran a huéspedes secundarios. Durante la migración se alimenta en malezas o plantas remanentes de cultivos anteriores. Las hembras aladas colonizan los huéspedes secundarios o un cultivo y llegan a ser las fundadoras de generaciones vivíparas. A partir de éstas, los áfidos se dispersan dentro del cultivo y de un cultivo a otro.

Los áfidos también pueden invernar como generaciones vivíparas y son capaces de infestar los cultivos más temprano que aquellos que invernan como huevos. En áreas tropicales donde la longitud del día y la temperatura raramente estimulan la producción de formas sexuales y donde los huéspedes alternantes son escasos, muchas especies de áfidos pueden mantener sus poblaciones en huéspedes secundarios.

4.2.2 Tipos de transmisión.

Durante la migración en regiones de clima templado o durante la búsqueda de huéspedes preferidos en regiones tropicales, los áfidos llegan a las plantas e insertan sus estiletes en las hojas y pueden ocurrir tres formas de comportamiento de los áfidos: a) la planta puede desagradarles y por ello la abandonan inmediatamente; b) la planta puede gustarles y se quedan quizás por el resto de sus vidas en la misma planta o en plantas similares (un cultivo compuesto de gran número de plantas similares es un buen ambiente para este segundo comportamiento); y c) pueden alimentarse en la planta por un tiempo y luego abandonarla debido a factores extrínsecos al huésped.

Uno u otro de estos comportamientos puede dar lugar a uno o varios de siguientes tres tipos de transmisión de virus:

.1 Transmisión no persistente. Los virus son adquiridos y transmitidos en pocos minutos por áfidos que están en el proceso de prueba en el huésped. Estos virus han sido denominados "virus transmitidos por estilete" y también son rápidamente eliminados del insecto. El mejor ejemplo es el PVY.

.2 Transmisión semipersistente. Algunos áfidos, como el Myzus persicae, que se mueven frecuentemente mientras colonizan un cultivo, pueden adquirir ciertos virus en unos 15 minutos y transmitirlos hasta por dos días. Esta forma de transmisión es denominada semipersistente. No se conocen virus en papa que sean transmitidos de esta manera.

.3 Transmisión persistente. Los virus que se transmiten persistentemente necesitan períodos más largos para ser adquiridos y transmitidos. Entre adquisición y transmisión es necesario un período de latencia (o incubación). Los áfidos pueden retener estos virus por el resto de su vida. El virus del enrollamiento de las hojas, el virus más importante del cultivo, es transmitido de esta manera.

Los virus transmitidos en forma no persistente y semipersistente son también conocidos como no circulativos, mientras que aquellos transmitidos persistentemente pueden ser circulativos. La retención de virus después de la muda (ecdysis) es un criterio empleado para distinguir entre virus circulativos y no circulativos. Sólo los virus circulativos son retenidos a través de la muda. Algunos virus se multiplican en el vector; sin embargo, no se conoce ningún caso en papa.

Dos virus de papa, el PVY^C y el mosaico aucuba (PAMV) son transmitidos por Myzus persicae sólo si los insectos se alimentan previamente en una planta infectada con una variante transmisible del PVY o el PVA. Este tipo de transmisión es denominado transmisión dependiente.

4.2.3 Virus de papa transmitidos por áfidos.

Los virus PLRV, PVY, PVA, PVM, mosaico de la alfalfa y mosaico del pepinillo son transmitidos por áfidos en el campo. Algunas variantes del PVS son también transmitidas por áfidos. Entre éstos, Myzus persicae es el vector más importante de los virus de papa pero Macrosiphum euphorbiae, Aphis nasturtii, Aulacorthum solani, Aphis fabae y algunos otros tienen una función importante en la dispersión de virus. En la Tabla 4 se indican algunos áfidos que colonizan la papa y otros que generalmente sólo visitan el cultivo.

4.3 VIRUS TRANSMITIDOS POR OTROS INSECTOS

4.3.1 Transmisión por saltahojas.

El virus del enanismo amarillo de la papa (PYDV) es transmitido por saltahojas. Dos variantes de PYDV son reconocidas. Una es transmitida por Aceratagallia sp. (A. sanguinolenta) y la otra es transmitida por Agallia constricta y A. quadripunctata. Este virus es circulativo y se propaga en el vector. Los micoplasmas son también transmitidos por saltahojas en el cultivo de papa. "Aster-yellows" ("stolbur" o "potato purple-top wilt") es transmitido por Macrosteles fascifrons. "Aster-yellows" ocurren como tres grupos de variantes: "Stolbur" que es transmitido por Hyaalsthes obsoletus, Euscelis plebejus, Aphrodes bicinctus y Macrosteles laevis; "parastolbur" es transmitido por E. plebejus; y "metastolbur" que no tiene insecto vector conocido. Escoba de brujas se sabe que es transmitido por Ophiola flavopicta.

TABLA 4. Afidos vectores y no vectores de virus de papa.*

Nombre del áfido	Virus de papa transmitidos			
	PLRV	PVY	PVA	PVM
COLONIZAN PAPA				
<u>Aphis gossypii-frangulae</u>	-	±	-	+
<u>Aphis nasturtii</u>	+	+	+	+
<u>Aulacorthum solani</u>	+	±	±	+
<u>Macrosiphum euphorbiae</u>	+	±	±	+
<u>Myzus ascalonicus</u>	+	-		
<u>Myzus persicae</u>	+	+	+	+
<u>Rhopalosiphoninus latysiphon</u>	±	-	-	
RARA VEZ COLONIZAN PAPA				
<u>Acyrtosiphon pisum</u>		+		
<u>Acyrtosiphon primulae</u>	-	+		
<u>Aphis fabae</u>	+	+		
<u>Cavariella pastinaceae</u>		+		
<u>Macrosiphoniella sanborni</u>		+		
<u>Myzus certus</u>	-	+		
<u>Myzus ornatus</u>	+	+	-	
<u>Neomyzus cucumflexus</u>	+	+	+	
<u>Rhopalosiphoninus staphileae</u>	+	+		
<u>tulipaellus</u>				
<u>Rhopalosiphum padi</u>		+		

* Adaptado de Kennedy et al., 1962, and Beemster y Rozendaal, 1972.

4.3.2 Trips.

El virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV) es transmitido por Thrips sp.

4.3.3 Coleópteros.

El virus andino latente de la papa (APLV) que ocurre en Suramérica es transmitido en baja proporción por Epitrix sp., que es una plaga común en los cultivos de papa de la región andina. El APMV es transmitido por Diabrotica viridula Auct.*

4.4 TRANSMISION POR NEMATODOS

4.4.1 Virus transmitidos por nematodos.

Estos son de dos tipos, cada uno de los cuales tiene un rango amplio de huéspedes y algunos son transmitidos por semilla y polen.

- .1 Aquellos con partículas tubulares que pertenecen al grupo Tobravirus, ej. el virus "rattle" del tabaco (TRV).
- .2 Aquellos con partículas isométricas que pertenecen al grupo de Nepovirus, ej. TRSV, PBRV y TBRV.

4.4.2 Nematodos vectores de virus.

Todas las especies de nematodos transmisoras de virus pertenecen a la superfamilia Dorilaimidae. Los Tobravirus son transmitidos por especies en el género Trichodorus, y los Nepovirus por especies de Xiphinema y Longidorus. Estas dos últimas especies son muy relacionadas y comúnmente identificadas dentro de la subfamilia Longidorinae.

* Abad, J.A. y L.F. Salazar. (En imprenta)

Ambas especies en su estado adulto varían en longitud entre de 1,4 y 10 mm y poseen un estilete hueco y largo que insertan en las raíces de las plantas para alimentarse del contenido celular. Algunos nematodos que son vectores de virus también son patógenos de plantas aunque no han sido registrado como tales en papa.

Los ejemplares de especies de Trichodorus son relativamente cortos y gruesos. Tienen casi 1 mm de longitud y un estilete ligeramente curvo. Este nematodo se alimenta en las células epidermales cerca de la punta de raíz.

4.5 TRANSMISION POR HONGOS

Sólo se conocen dos virus de papa que son transmitidos por hongos. El PMTV es transmitido por Spongospora subterranea. El TNV, que produce la enfermedad ABC en los tubérculos de papa, es transmitido por Olpidium brassicae.

La transmisión del PVX por Synchytrium endobioticum ha sido reportada pero no confirmada en condiciones de campo. Todos los hongos vectores producen zoosporas móviles las cuales son los vectores potenciales del virus. La liberación de zoosporas de los zoosporangios es altamente dependiente de abundante humedad en el suelo. Todos los vectores son más activos a temperaturas comparativamente bajas, por ejemplo 10°C a 20°C. En un suelo infectado, el secamiento mediante períodos largos a temperatura ambiental no destruye la infectividad, mientras que cuando el vector es un nematodo este tratamiento destruye la infectividad en el suelo.

La relación entre el hongo vector y el virus es muy compleja. El virus es adquirido por las zoosporas antes de su enquistamiento y penetración en las raíces o durante esas etapas. El virus es inicialmente superficial en las zoosporas pero su posterior localización no es conocida. Hay alguna evidencia que sugiere que el TNV es llevado externamente en el esporangio de descanso.

En el caso del PMTV, el virus parece ser llevado internamente en las esporas. No existe evidencia de que el virus ocurra en la zoosporas originadas del zoosporangio, pero por analogía con el virus del mosaico del trigo esto es muy posible que ocurra.

4.6 TRANSMISION POR SEMILLA SEXUAL

Algunos virus tienen la propiedad de ser transmitidos por la semilla sexual (comúnmente llamada también semilla botánica o semilla verdadera en el caso de la papa). En virología este tipo de transmisión es conocida como transmisión vertical y, en papa, siempre ha sido importante sólo en los programas de mejoramiento; sin embargo, con la posibilidad reciente de establecer cultivos a partir de la semilla botánica, este tipo de transmisión puede llegar a ser un factor limitante en el desarrollo de un cultivo. Afortunadamente, se conocen pocos virus en papa que tengan esta propiedad y aunque varios han sido transmitidos artificialmente bajo condiciones de invernadero (TRSV y AVB-0*) se desconoce su valor bajo condiciones naturales. Sin embargo, debido a que aquellos virus ocurren sólo esporádicamente en el cultivo, es probable que no tengan mayor importancia.

Dada su alta transmisión por la semilla botánica (hasta 100%) el viroide del tubérculo ahusado (PSTV) es el más importante. El PVT también ha sido transmitido experimentalmente con alta frecuencia (hasta 65%) pero aún se desconoce su transmisión bajo condiciones naturales. El APLV fue transmitido en 1% en un experimento pero experimentos posteriores resultaron negativos.

Tanto el PSTV como el PVT son transmitidos por el polen o el óvulo de plantas infectadas, pero no se ha podido demostrar que se infecte la planta madre al usar polen infectado.

* Arracacha virus B - Oca strain.

Sección 5

DETECCION DE VIRUS POR SEROLOGIA

5.1 PRINCIPIOS BASICOS

Los métodos serológicos, a juzgar por el volumen de trabajos que se han realizado y los resultados que se han obtenido, son de un valor incalculable para la identificación, para la diagnosis de rutina y como método cuantitativo para el estudio de los virus. Por esto se debe tener conocimiento de las ventajas y limitaciones de la serología.

Si un animal de sangre caliente es infectado con un agente que causa enfermedad, tal como una bacteria o un virus, aparecen en su sangre, como respuesta a la infección, proteínas del tipo de las globulinas. Estas proteínas son denominadas anticuerpos. En el suero de la sangre de este animal se puede demostrar la presencia de anticuerpos por la propiedad de combinarse "in vitro", produciendo una reacción visible con la bacteria o virus que causó la infección. Este acto de combinación, el cual puede ser demostrado de muchas maneras, constituye la base de las pruebas serológicas. Un animal puede producir anticuerpos no solamente en respuesta a la infección con un agente causante de enfermedad, sino también con una gran cantidad de materiales extraños, generalmente proteínas y polisacáridos. Cualquier sustancia que estimula la producción de anticuerpos y puede combinarse con ellos "in vitro" se denomina antígeno. La mayoría de los virus (nucleoproteínas) que afectan a la papa son buenos antígenos. Al suero que contiene anticuerpos se le denomina antisuero, mientras que al suero proveniente de un animal, al que nunca se le ha inyectado un material antigénico, se le denomina siero normal.

Con el fin de producir antisueros específicos para un determinado virus, éste debe ser inyectado al animal (generalmente un conejo) que se inmuniza en forma pura y no alterada, para lo cual el virus debe ser purificado por cualquier método que demuestre ser eficiente.

La vía y el número de inyecciones, el intervalo entre las mismas y la cantidad de virus que debe inyectarse a un animal, con el fin de obtener

antisueros con alta concentración de anticuerpos (títulos altos), varía con el virus, el animal que se ha de inyectar, etc. Generalmente se emplea un procedimiento que haya sido exitoso para ese virus u otro similar. Después de un tiempo prudencial en el cual se considera (o se detecta) que se ha formado la mayor cantidad posible de anticuerpos, se extrae la sangre del animal inmunizado y se separa la fracción suero. Este antisuero es valorado seguidamente para determinar su título.

5.2 PRUEBAS SEROLOGICAS

Para la detección y el estudio de virus han sido descritas muchas pruebas serológicas. A continuación se mencionan sólo tres empleadas para diagnosis rutinaria de virus de papa.

5.2.1 Microprecipitación.

Esta técnica ha sido bastante usada para detectar virus de papa en forma rutinaria. Consiste en mezclar una gota de antisuero, convenientemente diluido en solución salina (0,85% de cloruro de sodio), con una gota del jugo extraído de la planta en prueba. La agregación de partículas de virus con anticuerpos da lugar a la precipitación. La extracción del jugo se puede hacer de muchas maneras: con prensas hidráulicas, en rodillos extractores, en morteros y también en bolsas de plástico. Esta última es quizás la forma más práctica y menos cara. El jugo debe ser clarificado por centrifugación entre 3 000 a 6 000 rpm por 5 ó 10 minutos. También se puede clarificar por congelación a 10°C, seguido de una centrifugación a baja velocidad.

Debido a que tanto la concentración de virus como la de anticuerpo deben estar presentes en un nivel óptimo para que ocurra la reacción, deben probarse al menos dos diluciones del jugo infectado.

La reacción positiva se observa generalmente bajo un microscopio de luz con campo oscuro. Esta es fácil de reconocer al compararla con la mues-

tra negativa incluida como testigo. En toda serie de pruebas debe incluirse una muestra sana y otra enferma tratada en la misma forma que el resto de las muestras en prueba.

5.2.2 Látex sensibilizado con anticuerpos.

El método de látex está basado en la prueba de microprecipitación y se realiza en la misma forma. La diferencia radica en que el anticuerpo es adherido a partículas de látex* (esferas de poliestireno de 810 nm de diámetro). Cuando es mezclado con jugo de planta infectada se produce la agregación entre las esferas de látex y las partículas de virus. La floculación del látex permite magnificar la reacción anticuerpo-antígeno.

El método es 100 a 1 000 veces más sensitivo que la microprecipitación. Además, ofrece otras ventajas como: a) no requiere la clarificación de la savia, b) la reacción aparece más rápido, c) no es necesario usar microscopio para observar la reacción, y d) se necesita muy poco anti-suero. A continuación, se describe el procedimiento que se usa en el CIP para realizar la prueba.**

- .1 Con una regla y con un lápiz de cera, trazar líneas paralelas separadas 0,8 cm en el fondo de una placa Petri. Luego, trazar líneas perpendiculares a las primeras para formar cuadrículas.
- .2 En una bolsa, separar las hojas de la planta en prueba, tomadas de diferentes alturas del tallo. Tener cuidado de no tocarlas con las manos. Para detectar PVS es esencial incluir hojas de la parte media y baja de la planta. Es necesario tener dos testigos: uno negativo (de una planta sana) y otro positivo (de una planta infectada con el virus que se va a probar).

* Ver Apéndice 4.

** (Adaptado de: Fribourg C.E. y J. Nakashima. 1981. Prueba de Látex para detectar virus de papa. Gufa de laboratorio CIP).

- .3 Extraer el jugo por medio de un extractor automático, un mortero, o macerando dentro de la bolsa de plástico, con 0,3 ml de Tris-buffer (0,05 M Tris-HCl pH 8,0 + 1% bisulfito de sodio + 0,5% Tween-20). Colectar el jugo en un tubo de ensayo.
- .4 Hacer dos diluciones del jugo (1/10 y 1/100) en Tris-buffer.
- .5 Colocar una gota del jugo diluido 1/100 en un cuadrado de la placa y, usando la misma jeringa, poner en otro cuadrado una gota del jugo diluido 1/10. Con otra jeringa limpia poner una gota del látex sensibilizado con anticuerpo sobre cada una de las gotas de jugo anteriores.
- .6 Tapar la placa y agitarla en un agitador rotatorio a 130 vueltas por minuto durante media a una hora.
- .7 Quitar la tapa y leer los resultados sobre un fondo oscuro. La agregación es fácilmente observada en las muestras positivas. En reacciones negativas, la suspensión permanece uniformemente lechosa (Figura 7).

5.2.3 La técnica serológica por medio de conjugados enzimáticos (ELISA).

ELISA es un acrónimo de "enzyme-linked immunosorbent assay". ELISA ha demostrado ser más sensitiva que cualquier otra técnica serológica para detectar virus de plantas. El principio de ELISA está basado en el uso de una enzima conjugada a moléculas de anticuerpo (gamma-globulina) para detectar las partículas de virus "atrapadas" por anticuerpos adheridos a un medio sólido. Puesto que una pequeña cantidad de enzima puede hidrolizar una cantidad mayor de substrato, la reacción se ve así amplificada y por ello aumenta la sensibilidad de la técnica. La hidrólisis del substrato da lugar al cambio de color de la solución y esto permite determinar los resultados visualmente o cuantificarlos por medio de un colorímetro.

El método original (directo) fue denominado de doble anticuerpo o "sandwich" y es el generalmente empleado. La obtención de la gamma globulina, la conjugación con la enzima y tampones ("buffers") necesarios para la prueba, se describen en los Apéndices 1,2 y 3, respectivamente. A continuación se describe el método directo usado en el CIP.* (Ver Figura 6.)

- .1 Añadir 200 μ l de γ -globulina purificada y convenientemente diluida (la dilución debe determinarse previamente) en "coating buffer" a cada hoyo de la placa de microtitulación. Incubar por 2-4 horas a 37°. Vaciar la placa. Lavar las placas añadiendo PBS-Tween, dejar tres minutos. Repetir el lavado tres veces. Vaciar la placa.
- .2 Añadir 200 μ l de la(s) muestra (s) en prueba en cada hoyo (maceradas y diluidas en PBS-Tween + 2% PVP). Usar controles sanos, enfermos y buffer PBS-Tween-PVP. Incubar a 4°C toda la noche o 37°C por cuatro horas. Lavar las placas como en el paso anterior. La dilución de las muestras es generalmente no menor de 1/10.
- .3 Añadir 200 μ l de la γ -globulina conjugada con la enzima ("alkalyne phosphatase") diluida (determinar la dilución más apropiada) en PBS-Tween + 2% PVP + 0,2% albúmina de huevo, a cada hoyo de la placa. Incubar a 37°C por 3-6 horas. Lavar las placas como anteriormente.
- 4 Añadir 300 μ l de substrato ("p-nitrophenyl phosphate") recientemente preparado en "substrate buffer" a la concentración de 0,6-0,8 mg/ml.
Incubar a temperatura ambiental por el tiempo necesario (15 minutos a una hora) para observar la reacción.

* Basado en la descripción original de Clark y Adams (1977).

Registrar los resultados por:

- a) observación visual (Figura 8)
- b) medida de la absorbencia (O.D.) a 405 nm.

5.3 ALGUNOS PROBLEMAS Y SOLUCIONES EN LA APLICACION DE ELISA

5.3.1 Reacciones no específicas.

Reacciones no específicas son aquellas en las cuales los controles sanos reaccionan con alguna intensidad de color. Teóricamente las muestras sanas no deben mostrar coloración; sin embargo, siempre hay un grado ligero de intensidad de color en los mejores sistemas. Entre las causas principales de reacciones no específicas se han mencionado:

.1 La presencia de lecitinas en las muestras, que permite la adsorción del conjugado globulina-enzima a la placa (Gugerli, 1982).

.2 La reacción inespecífica del sustrato en ausencia de enzima. Esta reacción puede ser debida a factores ambientales (calor, luz, inestabilidad del sustrato, etc.).

.3 La presencia de anticuerpos específicos para proteínas de plantas en el suero.

La primera es más común en muestras de tubérculos. Su eliminación hasta cierto grado puede hacerse alterando los tampones ("buffers") para evitar la adsorción del conjugado a lecitinas. Hasta el momento este aspecto está en estudio en varios laboratorios.

La segunda es difícil de controlar, pero en ausencia de luz tales reacciones son reducidas.

El tercer caso depende de la calidad y cantidad de anticuerpos específicos para el virus en comparación con anticuerpos para proteínas vege-

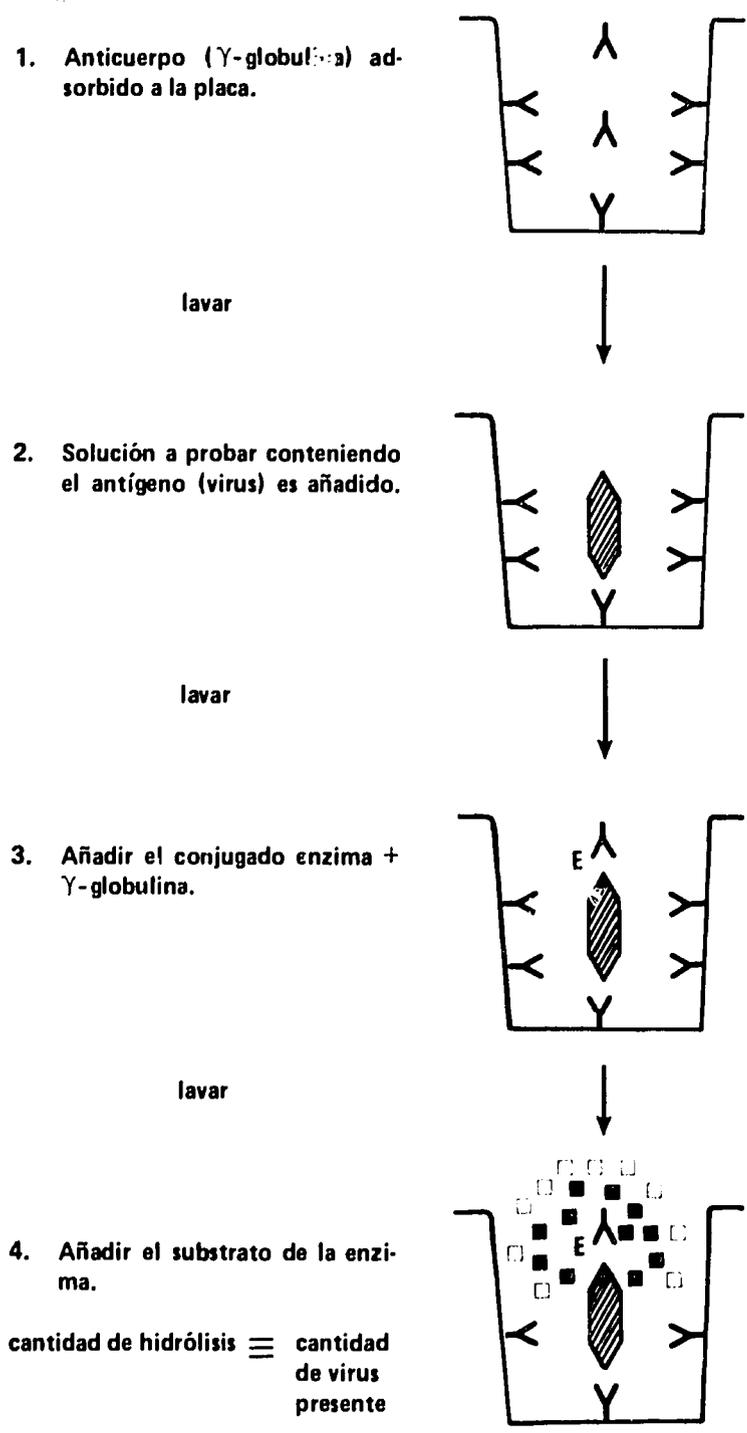


FIGURA 6. El principio del método de doble anticuerpo para detectar virus.

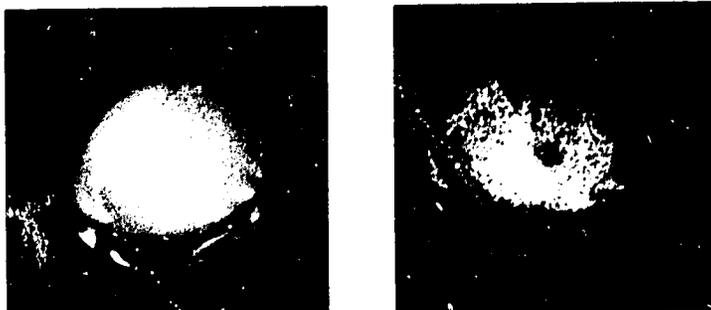


FIGURA 7. Reacción típica de precipitación con látex (derecha).

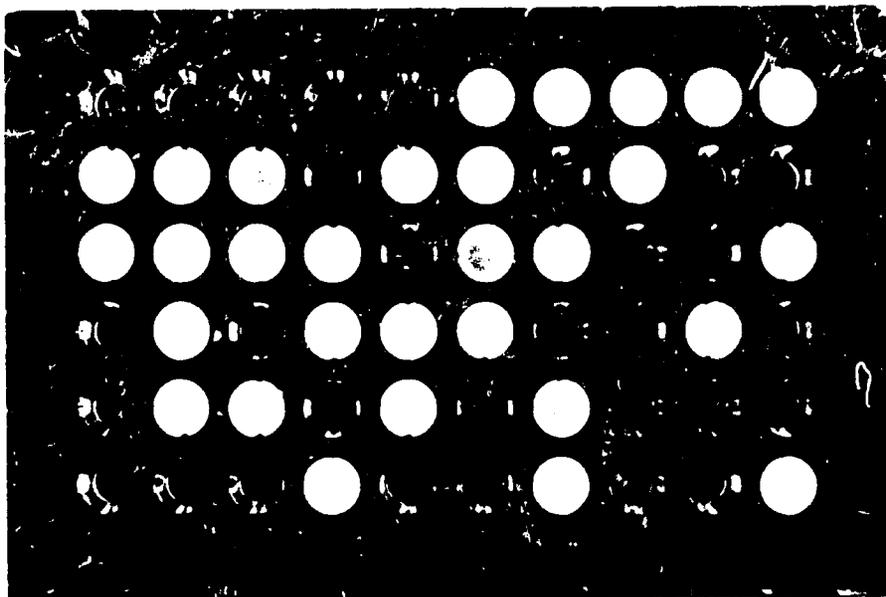


FIGURA 8. Placa de ELISA CON PVY que muestra reacción positiva (hoyos claros = amarillo) y negativa (hoyos oscuros = transparentes).

tales. La eliminación de estos anticuerpos indeseables es difícil pero podría hacerse por cromatografía.

5.3.2 Especificidad de ELISA.

El método directo de ELISA ha demostrado ser demasiado específico para uso rutinario en la detección de algunos virus ya que un antisuero específico para una variante puede no detectar otra variante del mismo virus. En papa, sin embargo, solamente con APLV se ha encontrado este problema.

Aparentemente, la alta especificidad de este método está determinada por el conjugado enzimático. Se ha postulado que la conjugación con enzima afecta la capacidad del anticuerpo para reconocer un antígeno lejanamente relacionado. Se ha observado que mientras más lejanos sean dos antígenos, con el método directo de ELISA, se disminuye la capacidad de un antisuero para reconocer al antígeno heterólogo.

Existen dos métodos que pueden ayudar a resolver el problema. En un caso, si todas las variantes de un virus son conocidas, la mezcla de conjugado enzimático para ellas permitirá la detección de cualquiera de esas variantes. Es evidente que este método requiere el conocimiento previo de la variabilidad de un virus. En el otro caso, la utilización del método indirecto parece tener mejores posibilidades. Para ello se requiere: a) el uso de anticuerpos para un virus obtenido preferiblemente de dos especies de animales y b) un anticuerpo específico para la gamma-globulina. Este último es conjugado con la enzima y usado como conjugado enzimático para reconocer la combinación globulina-antígeno-globulina de un sistema de "sandwich".

5.3.3 Determinación de límites de confianza en lecturas colorimétricas.

Dado que ELISA es un método cuantitativo, teóricamente todo valor superior al control negativo debe ser positivo. Desafortunadamente, en los

controles negativos también existe una variación en la intensidad de coloración del sustrato de la enzima. Debido a esta variación es necesario determinar el límite superior del control negativo. Se ha postulado la utilización de dos veces la desviación estándar de los controles sanos, o un valor preestablecido de 0,05 OD como el valor que añadido al promedio (\bar{x}) del valor del control sano indique el límite de detección. Esto significa que todo valor por encima de tal valor compuesto representa un valor positivo. Este límite aún requiere mayores estudios dado que otros factores, como reacciones no específicas, puedan dar lugar a la obtención de valores errados.

5.3.4 Reutilización de las placas de microtitulación.

Las placas de microtitulación utilizadas para la prueba de ELISA constituyen uno de los factores que elevan el costo de la misma. Sin embargo, experimentos realizados en el CIP* indican que al menos para el caso del PLRV las placas pueden ser reutilizadas siguiendo el procedimiento indicado por Bar-Joseph, Moscovitz y Sharafi**. Este procedimiento consiste en la disociación del complejo virus-conjugado enzimático después de terminada una prueba dejando inalterada la gamma-globulina. La disociación es realizada con la adición de 0,2 M de glicina-HCl, pH 2,2 y la incubación de las placas a temperatura ambiental durante una hora. Este proceso permite el ahorro de gamma-globulina además del costo de la placa.

* Ortega, E. (en publicación).

** Bar-Joseph, M., M. Moscovitz, and Y. Sharafi. 1979. *Phytopathology* 69: 424-426.

Sección 6

OTROS METODOS DE DETECCION DE VIRUS Y VIROIDES

El uso de sintomatología y serología ha sido cubierto en las Secciones 3 y 5, respectivamente. Existen otros métodos que son actualmente empleados en la detección de virus y viroides de papa aunque se consideran de aplicación muy específica o restringida.

6.1 PLANTAS INDICADORAS

Las plantas indicadoras para los principales virus de papa fueron enumeradas en la Tabla 2.

Las plantas indicadoras de reacción localizada (manchas cloróticas y necróticas) son las más utilizadas; sin embargo, no todos los virus tienen huéspedes que reaccionan con producción de lesiones locales. En estos casos deben ser utilizados huéspedes con reacción sistémica.

En la mayoría de casos, la inoculación de las hojas debe hacerse cuando las plantas están en desarrollo activo (para lesiones locales) o cuando están muy pequeñas (2 ó 3 hojas) en huéspedes de reacción sistémica.

Las hojas para inocular deben espolvorearse con un abrasivo fino (Carborundum 600 mesh, Corundum o Celite) antes de frotarlas con un hisopo humedecido en extracto diluido de la muestra. Después de la inoculación es conveniente lavar las hojas con agua corriente para eliminar el exceso de inóculo y abrasivo. Las plantas inoculadas son trasladadas luego al lugar definitivo de incubación (20-22°C, Humedad relativa = 70%) donde serán observadas a intervalos regulares (1-2 días). En la Figura 9 se muestran algunas plantas indicadoras con síntomas típicos de infección con los virus indicados.

6.2 DETECCION DEL VIROIDE DEL TUBERCULO AHUSADO DE LA PAPA (PSTV).

Los viroides son patógenos de plantas constituidos de un RNA de una sola hebra con pesos moleculares de 100 000 a 130 000, desprovistos de capa

proteica lo que impide el uso de serología para su detección. El PSTV es transmitido por contacto de follaje o maquinaria infectada y a través de semilla botánica. Dado que los síntomas en el follaje de papa son difíciles de determinar y que los síntomas en tubérculos pueden no desarrollarse en muchas variedades, es necesario el uso de métodos sensitivos de detección. Los métodos disponibles hasta 1980 se describen a continuación.

6.2.1 Detección en tomate.

El método original consiste en macerar el tejido para probar en "buffer" o agua y luego inocular en tomate (Lycopersicon esculentum). Las plantas de tomate así inoculadas son mantenidas en ambientes con alta temperatura (30°C) hasta la aparición de síntomas. Los síntomas, consistentes en necrosis de las nervaduras, encarrujamiento de las hojas y detención del crecimiento (Figura 10A) son fácilmente observables con variantes severas del viroide. Con variantes suaves los síntomas son muy ligeros o difícilmente distinguibles de los controles sanos.

El método de comparación ("challenge") fue un refinamiento en el empleo de tomate con el fin de detectar variantes suaves del viroide. En esta modificación se inocula un grupo mínimo de dos plantas de tomate con la muestra en prueba, dejando uno sin inocular. Después de un tiempo (2-3 semanas) se observan las plantas de tomate para determinar si hay síntomas. Si no hubiese síntomas, una de las plantas de tomate inoculadas y la que no fue inoculada se inoculan con una variante severa. Después de 2 a 3 semanas de incubación a temperatura superior a 30°C, la planta inoculada solamente con la variante severa deberá mostrar síntomas claros. La planta doblemente inoculada mostrará síntomas de la variante severa si la muestra en prueba estuvo libre de PSTV, o no mostrará síntomas. Si no muestra síntomas se asume que la muestra original contenía una variante suave de PSTV que por el fenómeno de protección cruzada evitó la infección con la variante severa. Si bien este método resulta más preciso, es más laborioso y requiere de mayor espacio en el invernadero.

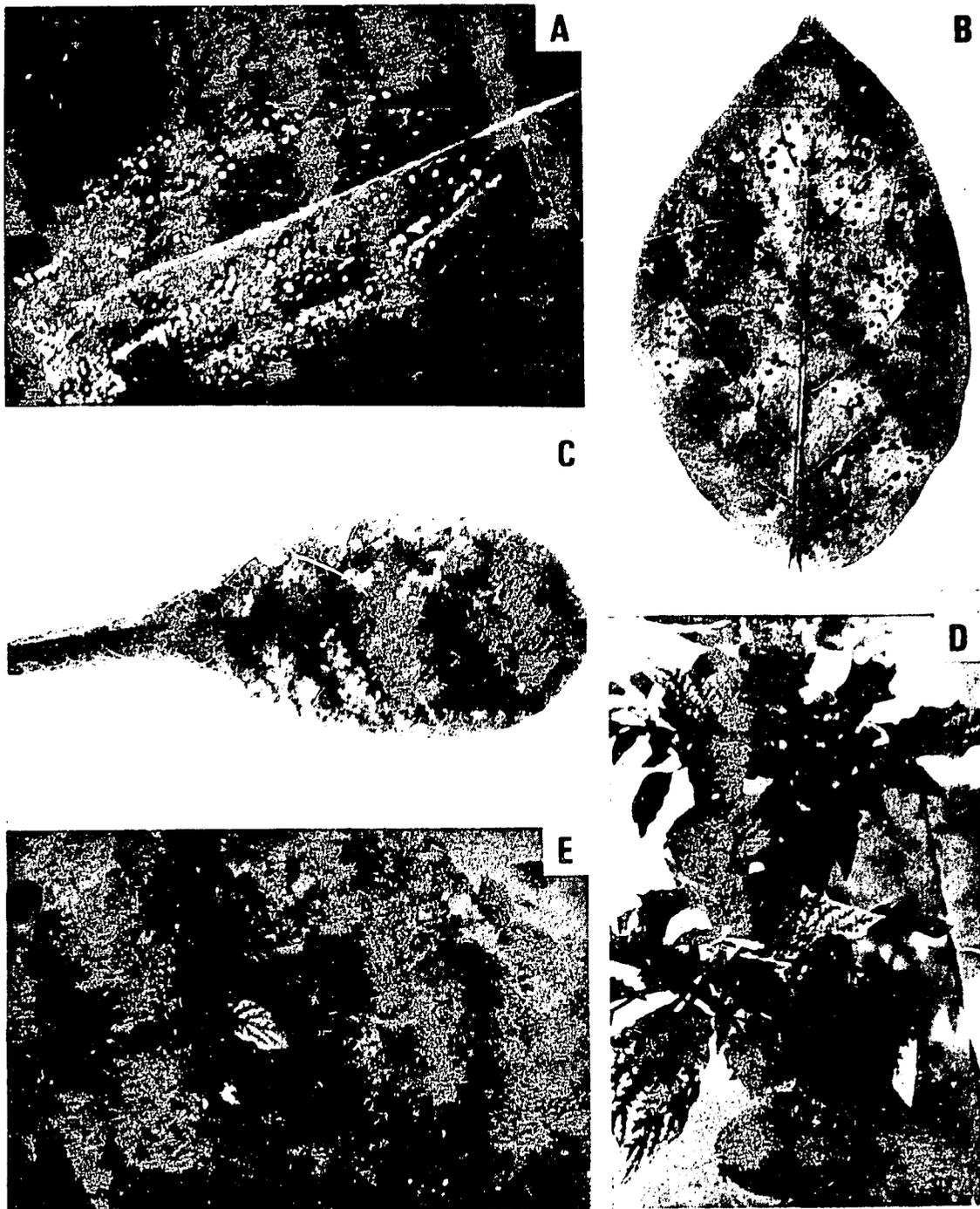


FIGURA 9. Síntomas causados por virus en plantas indicadoras.

- A) Lesiones locales necróticas en Gomphrena globosa por PVX.
- B) Lesiones locales necróticas en hoja del clon de papa A6 por PVY.
- C) Mosaico causado por PVT en Nicotiana debneyi.
- D) y E) Clorosis intervenal por PLRV en Physalis floridana y Datura stramonium, respectivamente. (Fotos E y D cortesía de A. Rizvi.)

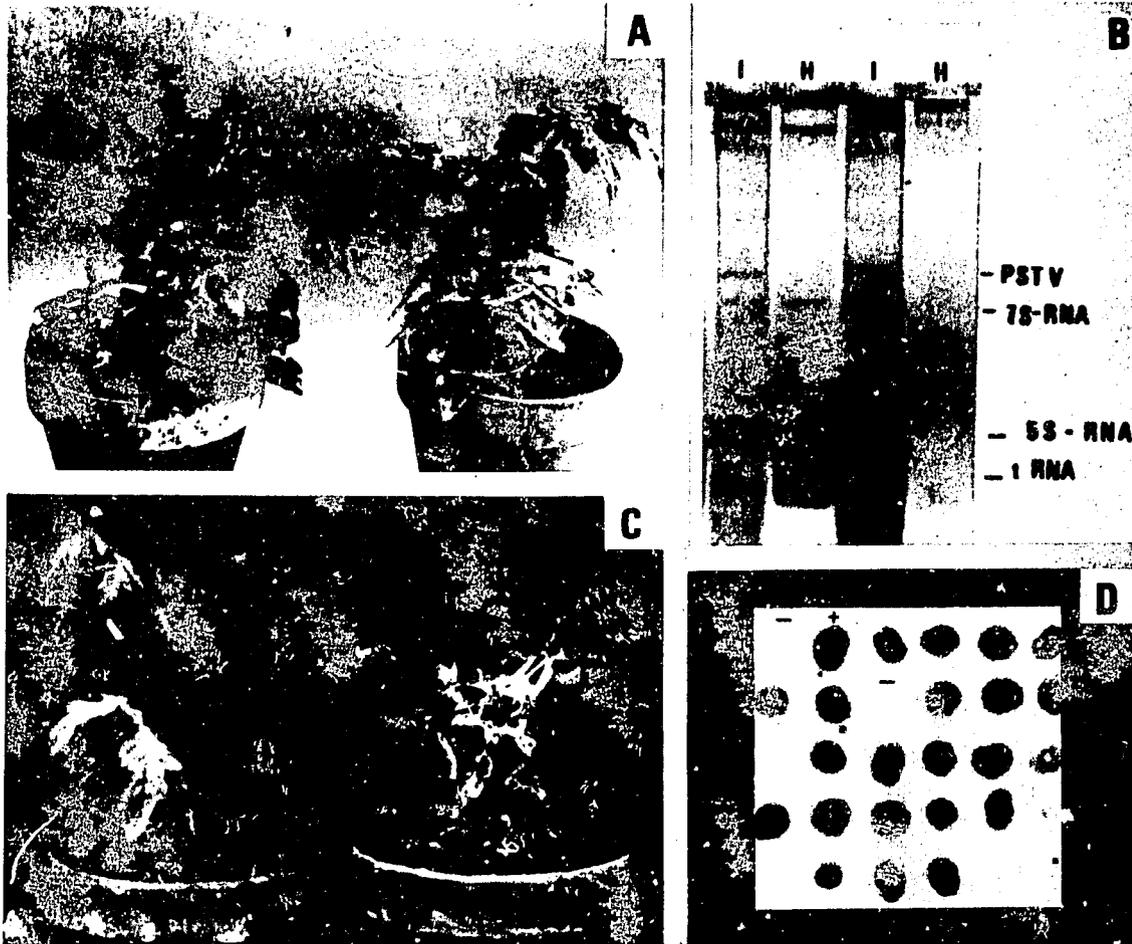


FIGURA 10. Métodos de detección de PSTV.

- A) Arrosetamiento y enanismo en L. esculentum (izquierda) mantenido a 30°C después de la inoculación. Control no inoculado a la derecha.
- B) Detección de PSTV por electroforesis en geles de acrilamida. I = muestra enferma, H = muestra sana.
- C) Albinismo y enanismo en L. esculentum inoculado con PSTV bajo luz fluorescente continua (derecha). Control sano a la izquierda.
- D) Autorradiografía de membrana de nitrocelulosa tratada con el método de hibridación de ácidos nucleicos. (-) = muestra sana, (+) = muestra infectada.

(Fotos A y C: cortesía de W.J. Hooker; D: cortesía de R.A. Owens, y T.O. Diener).

Las pruebas en tomatera bajo luz continua se realizan como en el método original, excepto que las plantas inoculadas se mantienen entre 24 y 30°C bajo luz fluorescente continua (1 000 ft-c). Las plantas de tomate infectadas con variantes (sean suaves o severas) de PSTV desarrollarán albinismo. Además de albinismo, desarrollan necrosis de nervaduras, encarrujamiento del brote y enanismo cuando la variante es severa (Figura 10C).

La detección de PSTV por tomate es suficientemente sensitiva, siendo sus principales desventajas la necesidad de invernaderos, y el tiempo largo para obtener resultados.

6.2.2 El uso de Scopolia sinensis.

S. sinensis es una especie solanácea que muestra lesiones locales y necrosis sistémica cuando se inocula con variantes suaves y severas de PSTV. Las plántulas deben mantenerse, antes y después de la inoculación, con intensidad de luz baja (300-400 ft-c), a 18-23°C, con humedad relativa sobre 60%.

Es importante que las plantas sean fertilizadas con regularidad para asegurar un crecimiento vigoroso y sólo deben inocularse hojas completamente desarrolladas y suculentas. Con variantes severas las lesiones pueden producirse a los 8 ó 10 días mientras que con variantes suaves tardan entre 8 y 14 días. En el CIP, el uso de S. sinensis no ha dado buenos resultados debido a las condiciones ambientales tan precisas que requiere y a la dificultad para producir semilla.

6.2.3 Detección de PSTV por electroforesis.

Dado que el PSTV es un RNA de peso molecular bajo, puede ser detectado en preparaciones de ácidos nucleicos extraídos de plantas infectadas. Al principio el método requería varias etapas para extraer los ácidos nucleicos de bajo peso molecular lo que hacía difícil su aplicación en gran escala. Posteriormente el método fue modificado reduciendo de 4 a 2

días el tiempo necesario para la extracción. La última modificación redujo el tiempo a sólo unas horas y es la que se describe a continuación, tal como se usa en el CIP:

- .1 Extraer la savia de 0,5 g de tejido infectado con 1,5 ml de "buffer" de extracción (20 ml 0,1 M - tetraacetato etilenodiamino de sodio (EDTA) + 10 ml 4 M NH_4OH + 60 ml 10 M LiCl + 50 ml H_2O) y 2 ml de fenol saturado que contenga 10% de m-cresol y 0,1% de 8-hidroxiquinolina. Agitar. Mantener los extractos en hielo.
- .2 Centrifugar el extracto a 9 000 g por 10 minutos.
- .3 Extraer la fase acuosa y añadir dos volúmenes de etanol. Agitar la mezcla y almacenarla a -20°C por 30 minutos a una hora.
- .4 Sedimentar el ácido nucleico a 10 000 rpm durante 10 minutos, disolver el pélet ("pellet") en 0,1 ml de agua destilada y una gota de 20% de sucrosa con azul de bromofenol.

Las muestras están listas para separación electroforética que puede hacerse en geles cilíndricos pero para comparación directa es mejor en láminas ("slabs") de poliacrilamida.* La electroforesis es realizada con 100 voltios a $12-15^\circ\text{C}$ por cuatro horas o hasta que el tinte marcador (azul de bromofenol) haya migrado 9-10 cm.

Los geles se tiñen durante toda la noche con 0,1% de azul de Toluidine O, ó azul de metileno. Se destiñen con 2-3 cambios de agua corriente.

El RNA del PSTV se puede localizar por su migración más lenta que 9S RNA (Figura 10B). En algunos geles la banda de 9S RNA no es fácilmente visible pero el PSTV-RNA puede ser identificado con comparación con el testigo positivo que siempre se incluye y que aparece a la mitad de la distancia entre el origen (parte superior de DNA) y 5S RNA.

* Ver Apéndice 5 para preparación de geles.

6.2.4 Ventajas y desventajas en detección de PSTV por electroforesis y por tomate.

La electroforesis es un método laborioso y caro pero es más aplicable a detección rutinaria que el de la planta de tomate. Aparentemente el método de electroforesis es menos sensitivo que el de tomate cuando se comparan diluciones de un extracto infectado; sin embargo, el tomate puede estar infectado sin mostrar síntomas. La combinación de inoculación en tomate y electroforesis parece ser más sensitiva para determinar infecciones en grandes poblaciones de plántulas, por ejemplo plántulas provenientes de semilla.

Los extractos de 20 a 40 plántulas pueden inocularse en una planta de tomate y después de un período de 15 a 20 días, examinar en ella la presencia de PSTV por electroforesis. De esta manera, si una plántula está infectada, el viroide se multiplicará en tomate hasta alcanzar niveles detectables por los síntomas o por electroforesis.

Otro factor limitante en la detección de PSTV es la temperatura. Ha sido demostrado que el PSTV alcanza concentración alta, detectable por electroforesis, cuando las plantas infectadas han crecido a temperaturas superiores a 25°C. La luminosidad juega un papel menos importante, pero parece que las intensidades mayores de 1 500 ft-c favorecen su replicación, quizás por su asociación con altas temperaturas.

6.2.5 Detección de PSTV por hibridación de ácidos nucleicos.

Este método ha sido recientemente desarrollado y aún no ha sido aplicado en la detección rutinaria del PSTV. Sin embargo, debido a su alta sensibilidad tiene grandes posibilidades de llegar a ser el método de preferencia. En 1980, Owens y Cress* desarrollaron y clonaron un DNA recombinante o complementario (cDNA) del PSTV de doble hebra, que contiene casi toda la secuencia completa de los nucleótidos del viroide.

* Owens, R.A. and D.C. Cress. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5302

Este cDNA, por ser complementario del PSTV, formará híbridos con las moléculas del PSTV tanto en solución como en moléculas fijadas a un soporte sólido. Esta es la base del método.

El cDNA, marcado con un isótopo radioactivo fue posteriormente utilizado por Owens y Diener (1981)* para detectar la presencia de PSTV en follaje o tubérculos de papa. Es evidente que este método, aunque fácil de realizar, requiere de laboratorios preparados para trabajos con radioisótopos. El cDNA extraído de la bacteria Escherichia coli, en la cual ha sido clonado, es marcado con ^{32}P por un proceso denominado de síntesis de reparación ("nick-translation"). Las muestras para probar son mace-
radas en un "buffer" que contenga 200 mM de K_2HPO_4 , 10 mM de dietilditiocarbamato de sodio, ditiotreitól y 0,1% Triton X-100 en la proporción de 1,5 ml por gramo de tejido. El material grueso del extracto es eliminado por centrifugación (2-3 minutos en una centrifuga de mesa a máxima velocidad). Luego 3-5 μl son cuidadosamente adsorbidos en una membrana de nitrocelulosa. De esta manera los ácidos nucleicos extraídos (incluyendo el PSTV si es que está presente en la muestra) quedan fijados en la membrana, la cual se seca a 80°C. El trabajo posterior de hibridación, que consiste en incubar la membrana en una solución que contenga el cDNA (PSTV), en lavar, secar y autorradiografiar para detectar los híbridos formados, es realizado en el laboratorio (Figura 10D). Owens y Diener demostraron que se puede detectar de 83 a 250 pg (1 pg = 10^{-9} mg) de PSTV en extractos de plantas aún cuando el jugo de plantas inhibe la hibridación hasta 10 veces. El método así empleado es 10 veces más sensitivo que la electroforesis. En trabajos posteriores Salazar, Owens, y Diener (en publicación) demostraron que el PSTV puede ser detectado hasta en una semilla botánica de papa (Tabla 5). Además se halló innecesaria la clasificación de los extractos por centrifugación.

* Owens, R.A. and T.O. Diener. 1981. Science 213:670.

TABLA 5. Detección del PSTV en semilla botánica de papa (De Salazar, Owens, y Diener, en publicación).

Tratamiento	N° semillas/tratamiento*		cDNA	Tomate**	
	infectadas	sanas		síntomas	page
A	1	15	+	-	-
B	2	14	-	-	-
C	4	12	+	-	+
D	8	8	+	-	+
E	16	0	+	-	+
F	0	16	-	-	-

* Las semillas fueron embebidas en agua durante cinco días y maceradas en 0,2 ml de "buffer". Fueron adsorbidas en la membrana de nitrocelulosa 3 μ l de extracto puro y diluido 1/2, 1/4 y 1/8.

** Se tomaron 0,15 ml de extracto diluido 1/5 y se inocularon en tomate. Resultados obtenidos por síntomas o electroforesis (PAGE) a los 30 días de la inoculación.

Sección 7

CARACTERISTICAS DE LOS PRINCIPALES VIRUS EN PAPA

En la redacción de esta sección se ha considerado que la información para la mayoría de los virus es abundante y puede ser fácilmente conseguida por el lector que necesite mayores detalles. En la Tabla 6 para cada virus se ha añadido un número que corresponde al de su descripción que aparece en: "Descriptions of Plant Viruses", publicado por "Commonwealth Mycological Institute (CMI) and the Association of Applied Biologists".

En la columna "Huéspedes de diagnóstico" se han incluido uno o dos que a juicio del autor permiten detectar al virus eficientemente y que podrían ser utilizados en un sistema rutinario.

Previous Page Blank

TABLA 6. Características de los principales virus que afectan la papa.

Virus	Síntomas principales	Variantes	Transmisión natural	Tipo y tamaño de partícula (en nm)	Huésped de diagnóstico
PLRV (36)	Enrollamiento de hojas	---	Afidos, persistente	isométrica c. 26	<u>Physalis floridana</u> <u>Datura stramonium</u>
PVY (242)	Mosaico, necrosis, caída de hojas	PVY ^o PVY ^N PVY ^C	Afidos, no persistente	flexuosas c. 730 x 11	clon A6 <u>Solanum demissum</u> Y
PVA (54)	Mosaico	---	Afidos, no persistente	flexuosas c. 730 x 15	clon A6 <u>Solanum demissum</u> A
PVX (4) (200)	Mosaico, infección latente		Mecánica	flexuosas c. 515 x 13	<u>Gomphrena globosa</u>
PVS (60)	Bronceamientos	Común, Andino	Afidos, no persistente, mecánica	flexuosas c. 650 x 12	<u>Nicotiana debneyi</u> <u>Chenopodium quinoa</u>
PVM (87)	Encrespamiento, mosaico	---	Afidos, no persistente, mecánica	flexuosas c. 650 x 12	<u>N. debneyii</u> <u>Datura metel</u>
PAMV (98)	Aucuba	PVF PVG	Mecánica, áfidos con PVY como "helper"	flexuosas c. 580 x 11	<u>N. glutinosa</u> <u>Capsicum annum</u>
PVT (187)	Latente, amarillamiento de venas	---	Semilla botánica, mecánica?	flexuosas c. 640 x 12	<u>C. amaranticolor</u>
PMTV (138)	Aucuba, amarillamiento, mop-top	---	<u>Spongospora subterránea</u>	alargadas c. 300 x 18	<u>C. amaranticolor</u>
TMV (151)	Mosaico?, aucuba	---	Mecánica	alargadas c. 300 x 17	<u>N. tabacum</u>
APLV (124)	Latente, mosaico	Hu., Caj.	Mecánica, <u>Epitrix</u> sp.	isométricas c. 30	<u>C. amaranticolor</u> <u>N. bigelovii</u>
APMV (203)	Moteado	M C	<u>Diabrotica viridula</u> Mecánica?	isométricas c. 30	<u>N. clevelandii</u>

Virus	Síntomas principales	Variantes	Transmisión natural	Tipo y tamaño de partícula (en nm)	Huésped de diagnóstico
TBRV (38)	Arrosetamiento, necrosis	---	<u>Longidorus elongatus</u>	isométricas c. 30	<u>C. amaranticolor</u>
PBRV (TRSV-Ca) (206,17)	Necrosis, cálico	---	<u>Xiphinema</u> sp.	isométricas c. 30	<u>C. amaranticolor</u>
AMV (229)	Cálico	---	Afidos, no persistente	redondeadas a baciliformes 30-60	<u>C. amaranticolor</u> <u>N. tabacum</u>
PYDV (35)	Enanismo, clorosis	---	Saltahojas	baciliformes c. 380 x 75	<u>N. rustica</u>
BCTV (210)	Enanismo, encrespamiento	---	Saltahojas	isométricas dobles c. 20	<u>Beta vulgaris</u>
PALCV*	Encrespamiento y necrosis apical	---	?	isométricas triples c. 17	<u>D. stramonium</u>
TSV (44)	Mosaico, necrosis	---	Mecánica?	redondeadas c. 28	<u>C. quinoa</u>
CMV (1)	Enanismo	---	Afidos, no persistente	redondeadas c. 30	<u>Cucumis sativus</u> <u>C. amaranticolor</u>
PSTV (Viroid) (66)	Ahusamiento y rajaduras de tubérculos	suave severo	Mecánica, semilla botánica	RNA circular	<u>Lycopersicon esculentum</u>
TRV (12)	Necrosis de tubérculos	PRN CAM others	<u>Trichodorus</u> sp.	alargadas c. 190 y 45-115 x 19	<u>C. amaranticolor</u>
TNV (14)	Necrosis de tubérculos	---	<u>Olpidium brassicae</u>	isométricas c. 26	<u>Phaseolus vulgaris</u>
TSWV (39)	Necrosis	---	<u>Thrips</u> sp.	redondeadas c. 70-90	<u>N. glutinosa</u>

* En publicación

Sección 8

ECOLOGIA Y CONTROL*

8.1 ECOLOGIA VIRAL

Antes de planear las medidas de control, es necesario conocer la ecología de los virus con el fin de aplicar los métodos más adecuados y en el momento más oportuno, para romper el ciclo de la enfermedad. Los virus son realmente evidentes en una comunidad vegetal establecida, pero nunca causan epidemias. Los cultivos representan comunidades vegetales innaturales por la presencia de numerosas plantas de una misma especie, las cuales ayudarán a la diseminación de los virus y sus vectorers dando origen a severas epifitotias. Si esta comunidad es aún más alterada por el cultivo de variedades resistentes o tolerantes, los virus tenderán a hacerse poco evidentes mediante la selección de razas, dando lugar al "enmascaramiento" de los síntomas. Las plantas en esta comunidad pueden parecer inmunes, pero las nuevas variedades que se introduzcan pueden sufrir serias pérdidas.

En el estudio ecológico, los virus deben ser relacionados con sus huéspedes, vectores y con el ambiente. A continuación se presentan algunas interacciones de importancia.

8.1.1 Especificidad del vector.

Los virus de plantas son transmitidos de muchas maneras (ver Sección 4). Aquellos transmitidos por organismos son acarreados en forma pasiva por períodos cortos o largos. La transmisión por vectores es muy específica y a menudo la hace un solo grupo, taxón, o especie de vector. El mecanismo de transmisión es muy complejo pero no es puramente mecánico. La cubierta proteica de los virus es la responsable de la especificidad y cualquier variabilidad en ella dará lugar a pérdida de la capacidad de ser transmitido por su vector.

Al desarrollar este capítulo se ha tenido en cuenta especialmente la referencia: B.D. Harrison. 1981. "Plant virus ecology: ingredients, interactions and environmental influences." Ann. appl. Biol. 99: 195.

Ello hace que bajo condiciones naturales haya una fuerte selección y sólo sobrevivan aquellos cuya transmisión (o cubierta proteica) no haya sufrido cambios.

Como la cubierta proteica de los virus debe permanecer relativamente invariable en la naturaleza, es de suponer que su antigenicidad tampoco varíe, y que en consecuencia su detección por medios serológicos no será complicada por la existencia de múltiples formas antigénicas. Lo anterior parece confirmarse con el PLRV en el cual no hay variabilidad antigénica y tampoco variabilidad en transmisión. Con el PVY existe un fenómeno diferente, ya que este virus induce la producción en el huésped de un factor de transmisión proteináceo, que sirve también para la transmisión de otros virus en forma dependiente (caso de PAMV).

8.1.2 Sistemas de supervivencia y diseminación.

En papa, debido a su propagación vegetativa, hay muchos virus que dependen del cultivo para su supervivencia (ver Tabla 1) y por ello las plantas espontáneas o remanentes del cultivo anterior representan un buen medio para sobrevivir. Otros virus pueden sobrevivir en el mismo vector. Este es el caso del PMTV el cual sobrevive por largos períodos en las esporas de descanso de Spongospora subterranea. El otro grupo de virus que afecta a la papa utiliza otros sistemas de supervivencia y por ello no depende del cultivo. Algunos virus como Geminiviruses, Nepoviruses y otros infectan un gran número de especies vegetales. Estos virus sobreviven en malezas infectadas, en cultivos alternantes y en semillas. Dentro de este grupo también hay virus que persisten por largos períodos en el vector, por ejemplo el TRV en Trichodorus sp.

La diseminación de los virus hacia los cultivos depende evidentemente de su forma de transmisión. Aquéllos transmitidos por organismos vectores no necesitan producir alta concentración de partículas para asegurar su supervivencia o para ser transmitidos eficientemente, mientras que aquéllos transmitidos naturalmente por contacto o en forma mecánica (PVX, TMV) requieren la producción de grandes cantidades de partículas con el

fin de incrementar sus probabilidades de transmisión. Los virus transmitidos en forma mecánica en los cultivos han sido incluidos recientemente entre los virus adaptados a cultivos ("CULPAD viruses"), mientras que aquellos que preferentemente se encuentran en especies silvestres o malezas son denominados virus adaptados a malezas ("WILPAD viruses"). Esta denominación, sin embargo, no antagoniza con la clasificación práctica de virus dependientes y no dependientes del cultivo, hecha en la Sección 1 de la presente obra.

8.1.3 Influencias del clima y del ambiente.

Tanto el clima como el ambiente son factores determinantes en las interacciones virus-vector-huésped. Estos tres factores se tratarán por separado, pero en esencia no se pueden desligar.

.1 Influencias en el vector. Las moscas blancas y los saltahojas, como vectores de virus, parecen ser más importantes en condiciones tropicales que en regiones templadas. En estos ambientes hay todavía variaciones determinadas por el clima. Por ejemplo, en las regiones altas de los Andes, el clima frío que se asemeja más al de las regiones templadas, impondrá restricciones a vectores como saltahojas y, en consecuencia, afectará la diseminación de virus transmitidos por ellos. Por el contrario, en las regiones bajas de la zona tórrida, donde la temperatura es más alta, los saltahojas son más prevalentes y activos y, consecuentemente, virus como el SALCV y otros Geminivirus pueden adquirir mayor importancia.

En regiones cálidas y semiáridas son menos comunes los virus transmitidos por vectores que viven en el suelo. Por ello, los virus más comunes en esas áreas son aquellos con vectores que migran largas distancias (por ejemplo, saltahojas y BCTV) o que pueden sobrevivir períodos de sequía en semillas o en esporas de descanso.

.2 Influencias en el virus. Los virus parecen tener cierta adaptación al clima. El APLV y el APMV podrían ser buenos ejemplos de este efecto ya que aparentemente requieren temperaturas bajas para acumularse en los tejidos del huésped. El PSTV es sin lugar a dudas el más afectado por la temperatura baja y se ha demostrado que requiere temperaturas altas para su replicación y acumulación en los tejidos del huésped. Sin embargo, no se puede predecir qué sucedería con el viroide de ser introducido a regiones frías. ¿Podría haber una selección para adaptación a estas condiciones?.

.3 Influencias en el huésped. El clima y el ambiente influyen grandemente en la diversidad de especies vegetales de una región. En las regiones húmedas de la zona tórrida, por ejemplo, la vegetación es más abundante y diversa que en regiones semiáridas o andinas de dicha zona. Aunque podrían encontrarse los mismos virus en ambas regiones, la diseminación de ellos será indudablemente de diversa magnitud. La diseminación de estos virus en ambos ambientes podría estar relacionada con su forma de supervivencia. El PVX, por ejemplo, dada su forma aparentemente exitosa de supervivencia y poca dependencia del clima, puede ser diseminado fácilmente en ambas regiones. El PLRV, por el contrario, no parece ser un problema muy serio en regiones semiáridas con alta temperatura y hasta puede ser inactivado al ser introducido a estas condiciones.

8.1.4 Influencias del huésped en la evolución de virus y viceversa.

La influencia del huésped en la evolución de los virus de plantas es compleja porque el rango de huéspedes en los virus de plantas es más amplio que el de los virus de vertebrados. En papa no hay evidencia directa de esta influencia, pero es posible que la inclusión de resistencia genética extrema pueda originar mutaciones en un virus con genomas de RNA. Es muy probable se haya originado de esta manera la variante HB de PVX que rompe la resistencia extrema (inmunidad) conocida hasta ahora. Sin embargo, esta variante no está ampliamente diseminada, quizás por alguna otra característica aún desconocida y que sea desventajosa para el virus en muchos ambientes ecológicos. De la relación

contraria (de influencia del virus en la evolución del huésped) parece haber cierta evidencia, pues los cultivares tetraploides de papa cultivados tradicionalmente en los Andes muestran síntomas menos obvios de infección por virus que los cultivares modernos. Esto indicaría que en condiciones donde los virus son prevalentes, éstos ejercen una presión de selección efectiva en sus huéspedes.

8.1.5 Efecto de prácticas culturales en diseminación de virus.

Parecería evidente el hecho de que cualquier cambio en prácticas culturales, con respecto a las tradicionalmente empleadas, resultase en un cambio en el tipo y la cantidad de diseminación de los virus. La agricultura llamada de subsistencia, donde pequeños lotes de papa son cultivados en asociación con otros huéspedes, puede dar lugar a diseminación de virus de los otros huéspedes hacia la papa y viceversa. Por ejemplo, en el suroeste de China donde la papa prácticamente es cultivada en asociación con tomate y otras hortalizas, se puede esperar una adaptación o diseminación a la papa de virus como AMV, TMV o CMV. Existe evidencia alta de la incidencia de AMV, fragmentaria en caso de TMV y ninguna en el de CMV. La evolución de la virología en China deberá dar importantes luces a este respecto.

De la misma manera, un cambio en la producción de papa, al utilizar semilla botánica en vez del tradicional tubérculo-semilla podría afectar el balance del tipo de virus de mayor incidencia. Los virus o el PSTV transmitidos por semilla botánica podrían llegar a ser más importantes. En China, donde se adoptó este método de cultivo con anterioridad, algunas regiones parecen mostrar una alta incidencia del PSTV.

Hasta los virus comunes del cultivo, como el PLRV y el PVY, parecen encontrar en las plántulas de semilla botánica de papa un medio más receptivo de transmisión dada su aparente mayor susceptibilidad que plantas provenientes de tubérculos semillas.

8.1.6 Forma y cantidad de diseminación dentro del campo.

Existe una correlación directa entre la incidencia inicial de un virus y la cantidad de diseminación cuando los vectores ocurren bajo condiciones similares. Por ejemplo, campos con infección inicial de 3% y 10% de PVY alcanzaron 25% y 90%, respectivamente. Sin embargo, la actividad de los vectores es mucho más importante que el número. La forma de diseminación o gradiente de infección resultante de la dispersión de un virus desde una fuente de inóculo es afectada grandemente por la actividad del vector. A mayor movilidad del vector el gradiente de infección es más extendido. Con el PVY transmitido por áfidos, el gradiente es más pronunciado que con virus transmitidos por saltahojas. Al compararlo con el PLRV (el mismo áfido vector) se nota en el PVY un gradiente más pronunciado. Esto es debido a su forma de transmisión no persistente. El conocimiento de gradientes de infección tiene mucha importancia práctica en la determinación de distancias de aislamiento de los campos en producción de semilla.

8.1.7 Pérdidas debidas a enfermedades virosas.

Las pérdidas debidas a infecciones virales varían grandemente dependiendo del tipo de daño. Estas pueden ser cualitativas o cuantitativas. Las pérdidas cualitativas están relacionadas con la reducción del valor comercial de los tubérculos como en el caso de las necrosis producidas por TRV, PMTV o PLRV. Las pérdidas cuantitativas se refieren a la reducción en rendimiento debido al efecto de los virus sobre el número y tamaño de los tubérculos.

Si bien es cierto que todos los virus pueden ocasionar reducción del rendimiento en una variedad de papa, no todos lo hacen en la misma magnitud.

Evidentemente, la combinación de dos o más virus en el cultivo da lugar a efectos más graves que cuando uno de ellos lo afecta individualmente.

El efecto de los virus en el rendimiento es diferente cuando las observaciones son hechas sobre plantas individuales que cuando se hacen en un cultivo. Raramente se encuentran cultivos en los cuales todas las plantas muestren la misma infección o el mismo grado de ella. Por lo tanto, una medida más precisa es expresar la merma en el rendimiento en términos del número (o porcentaje) de plantas infectadas (Figura 11)*. En condiciones de cultivo, el efecto detrimental de un virus cualquiera en una planta es compensado por un mayor rendimiento de plantas sanas adyacentes (efecto compensatorio).

En forma general se considera que los virus que producen síntomas más severos dan lugar a pérdidas mayores.

8.2 MEDIDAS DE CONTROL

Las medidas de control son muy amplias y no pueden aplicarse aisladamente.

8.2.1 Protección.

.1 Higiene. Con virus diseminados principalmente por contacto, como el PVX y el PSTV, y en menor consideración el PVY, PVS, PVM y otros, debe evitarse aun el más mínimo contacto entre las plantas y las herramientas, manos, ropas, etc. La efectividad de inhibidores o inactivadores de virus debe ser previamente determinada. En el caso de semilleros básicos o núcleos de semilla, la inversión en inhibidores como ortofosfato trisódico resulta valiosa.

.2 Aislamiento. Es obvio que el mejor modo de prevenir la dispersión de virus de un cultivo a otro es el aislamiento. El aislamiento puede ser obtenido de dos maneras: a) aumentando la distancia entre cultivos, y b) por medio de cultivos de barrera o protección. En ambos casos la

* Ver BEUKEMA, H.P. and D.E. Vander Zaag. 1979. Potato Improvement. Int. Agric. Centre, Wageningen, The Netherlands. 224 pp.

efectividad es relativa cuando se trata de virus con vectores aéreos de alta movilidad o cuando en la zona prevalecen vientos fuertes que ayudan a su diseminación. El primer caso resulta muchas veces difícil de aplicar, especialmente cuando solamente existen períodos definidos para el cultivo. Este es el caso de la sierra peruana, donde la tierra resulta escasa. Los cultivos de barrera o protección pueden ser una alternativa, especialmente cuando ellos son inmunes al virus y adecuados huéspedes del vector.

.3 Tamaño del campo y distancia entre plantas. En virus transmitido por vectores aéreos, como el PLRV y el PVY, existe evidencia experimental de que, durante la diseminación desde fuera del campo, la mayor colonización de las plantas por los insectos ocurre hacia los bordes del campo. De esta manera, mientras más grande sea el campo, existirá menor porcentaje de infección, siempre y cuando la diseminación dentro del mismo no sea muy activa. El espaciamiento entre plantas afecta también grandemente la incidencia de la enfermedad. Mientras mayor sea el número de plantas en el campo, menor será la proporción de plantas infectadas. En este caso, como en el anterior, el espaciamiento se aplica eficientemente, cuando no existe posterior diseminación (diseminación secundaria).

.4 Eliminación de fuentes externas de virus y vector. La destrucción de malezas cercanas al campo ayuda a disminuir la incidencia de algunos virus en el cultivo, especialmente de aquellos que no dependen del cultivo para su supervivencia, como el caso del TRV y el TRSV. Lo mismo puede aplicarse a la enfermedad conocida como Punta morada, causada por un micoplasma transmitido por una cigarrita (Macrosteles fascifrons Stål) a partir de malezas infectadas. En el caso del PVY, que tiene una dependencia casi total del cultivo, la efectividad de esta práctica es baja. Muchas malezas sirven de huésped alternante o de invernación de algunos insectos. Tal es el caso observado en condiciones de la sierra peruana, donde Brassica campestris parece ser uno de los huéspedes sobre

Reducción del rendimiento

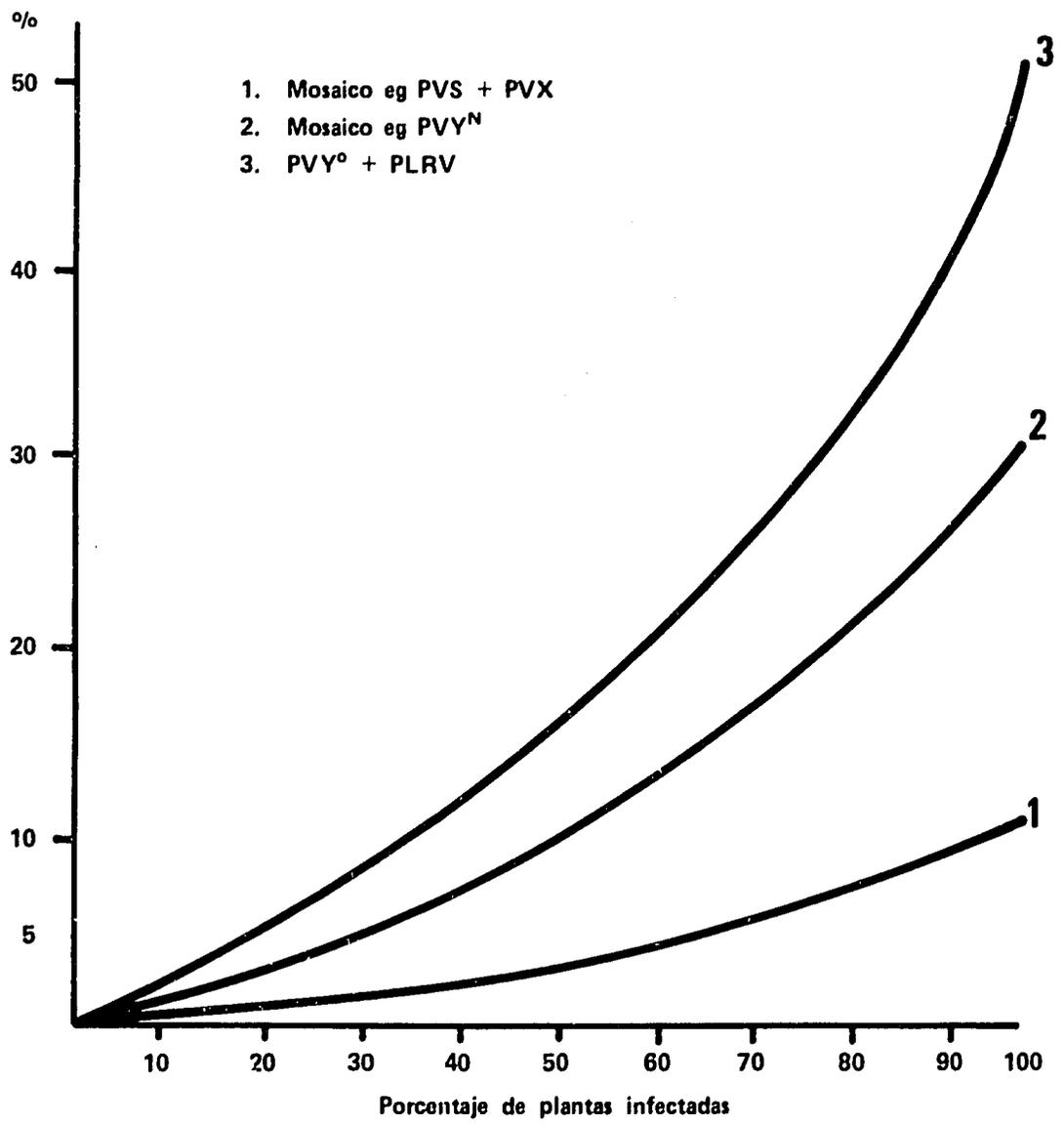


FIGURA 11. Reducción del rendimiento en relación con el porcentaje de plantas infectadas con virus en un cultivo con infección secundaria. (De: Beukema, H.P. and D.E. Vander Zaag. 1979.)

el cual Myzus persicae resiste el invierno. La erradicación de estas fuentes de virus y vector puede ser intentada con herbicidas.

.5 Evitamiento de los vectores. El cultivo de la papa en países europeos depende grandemente del evitamiento de los vectores. Sin embargo, la práctica no puede ser empleada en lugares donde se desconoce el ciclo biológico de los principales vectores de virus. La mayoría de insectos tiene un período de dispersión dentro de su ciclo de vida. Si el cultivo puede ser plantado de tal manera que su período de alta susceptibilidad no coincida con la dispersión de los vectores, la disminución de la incidencia del virus será apreciable.

.6 Eliminación o reducción de la actividad de vectores.

.6.1 Vectores aéreos. Existen dos períodos en los cuales pueden ser eliminados: antes de su ingreso al campo (a fin de eliminar la diseminación primaria), y dentro del campo (para evitar la diseminación secundaria). Es difícil en la práctica separar estos dos aspectos de la diseminación de virus. La eliminación antes del ingreso al campo parece ser eficiente para evitar la incidencia de Punta morada, pero para el PVY y el PLRV la efectividad es relativamente baja. La eliminación de los vectores dentro del campo no ha dado resultados significativos en la reducción de la incidencia de PLRV y PVY. Esto se debe principalmente al tiempo que los insecticidas necesitan para inactivar al insecto, tiempo en el cual la diseminación puede ser realizada.

Sin embargo, la aplicación de insecticidas, además de evitar el daño causado por el insecto mismo, ayuda a reducir la incidencia de los virus cuando se han contemplado otras medidas de control. No se conocen hasta el momento ejemplos efectivos de control biológico de vectores en papa. Sin embargo, esta posibilidad debe ser ampliamente estudiada ya que existen evidencias en otros cultivos (zanahoria en California) donde el

vector es poco prevalente debido al parasitismo. Las relaciones entre el vector y sus enemigos son muy complejas y poco entendidas. Se sabe que los parásitos de áfidos vectores en condiciones naturales pueden determinar el tamaño de la población de estos insectos, así como su actividad, lo cual consecuentemente puede afectar la diseminación de los virus.

.6.2 Vectores en el suelo. Son dos básicamente: nematodos y hongos.

La eliminación de los nematodos que transmiten virus ha sido intentada con diversos productos químicos y los resultados han sido ambigüos. El mejor caso, el del control de Trichodorus sp., ha sido logrado en Escocia con aplicaciones de DD (dicloropropano-dicloropropeno) en dosis de 224 kg/ha. No es posible hasta el momento recomendar algún tipo de nematocida. Sin embargo, la eficiencia de ellos debe ser evaluada en condiciones de campo, donde la efectividad pueda ser beneficiosa económicamente.

Al igual que en el caso anterior, se ha obtenido poco éxito con aplicaciones de fungicidas para el control de hongos del suelo. Los experimentos al respecto deben contemplar el fungicida, la dosis, el efecto residual, en el hombre, etc. Algunos hongos prefieren para su desarrollo y supervivencia ciertas condiciones en el suelo. La alteración de éstas puede reducir su actividad y, consecuentemente, la infección por el virus que transmiten.

8.2.2 Erradicación.

.1 Descarte ("Roguing"). "Roguing" es un término en inglés que significa descarte o eliminación de tubérculos antes de la siembra y de plantas infectadas desde poco después de la siembra. Es un proceso de selección negativa. La eliminación de tubérculos, que muestren formas atípicas de la variedad para sembrar, o con síntomas evidentes de infección por virus u otros patógenos, ayuda grandemente en la obtención de núcleos libres de enfermedades virósas. En tubérculos, pueden ci-

citarse como síntomas causados por enfermedades virosas: brotes ahilados o faltos de vigor, brotes necróticos, rajaduras grandes y finas y deformaciones de los tubérculos. (Ver sintomatología, Sección 3.)

La eliminación, en el campo, de plantas con síntomas evidentes de virus conduce a la reducción del número de fuentes de inóculo. Pero, cuando se trata de virus transmitidos mecánicamente, el valor de esta práctica se reduce por las altas posibilidades de contaminación del material sano. Normalmente, la diseminación de virus transmitidos por áfidos se debe a las formas aladas de éstos. Sin embargo, en campos colonizados por áfidos, la eliminación de plantas infectadas puede favorecer la diseminación de estos virus por formas ápteras que caen de las plantas que se eliminan. Las plantas infectadas deben ser destruidas, para evitar que los insectos que puedan estar sobre ellas se mueven hacia las plantas sanas.

.2 Cultivo de meristemas. Este proceso está ampliamente difundido como un método para liberar de virus a cultivares valiosos. La escisión y el cultivo de tejido meristemático infectado con virus puede producir una proporción de las plántulas libres de infección. Sin embargo, se obtienen mejores resultados (mayor porcentaje de plantas sanas) cuando las plantas madres son tratadas con calor antes de extraer los meristemas. En la práctica, el cultivo de las plantas a 36 ó 37°C por una o dos semanas parece suficiente para obtener un alto porcentaje de erradicación. Casi todos los virus de papa pueden ser eliminados usando este sistema, el cual se basa en que los virus no invaden los tejidos meristemáticos o lo hacen lentamente.

El viroide PSTV, sin embargo, no puede ser eliminado de esta manera. Por el contrario, se puede demostrar una alta concentración del viroide en plantas tratadas con calor. Este requerimiento de alta temperatura para la multiplicación del viroide condujo al desarrollo del tratamiento en frío antes de la escisión de los meristemas. Cuando las plantas ma-

dres han germinado entre 6°C y 10°C por 2 a 4 meses, se obtiene un alto porcentaje de plántulas sanas. Este procedimiento, aunque lento, permite recuperar clones valiosos infectados por PSTV que de otra manera serían eliminados.

8.2.3 Resistencia genética.

El mejoramiento por resistencia ha sido usado, o al menos intentado en algunos casos con éxito, para la mayoría de los virus de importancia económica.

La resistencia genética puede ser definida como la característica de un genotipo para resistir y tolerar o no tolerar el proceso de infección. Han sido definidas varias formas de resistencia: a) resistencia extrema o inmunidad, b) resistencia a la infección, c) hipersensibilidad, d) tolerancia y e) resistencia al vector.

Las manifestaciones de resistencia mencionadas han sido bastante estudiadas en papa y en algunos casos se conocen los genes implicados aunque el mecanismo de expresión de los mismos no es bien conocido (Ver Tabla 7). La resistencia genética a muchos virus ha sido demostrada especialmente en especies silvestres. Su utilización, sin embargo, no siempre es fácil debido en la mayoría de los casos a que los genes de resistencia están ligados a otros que confieren características indeseables.

.1 Inmunidad o resistencia extrema. Cuando una planta o un grupo de plantas no pueden ser infectadas por medios naturales de transmisión de los virus o por métodos artificiales se dice que las plantas son inmunes. La inmunidad es generalmente demostrada cuando la inoculación del virus es realizada por medio de injertos, un método que ha demostrado ser efectivo en la transmisión de la mayoría de los virus.

TABLA 7. Algunas fuentes de resistencia a virus de papa (De Hooker, W.J. 1977, en: CIP, "Report of Planning Conference on Control of Potato virus diseases").

Fuente	Gene	Virus	Tipo de Resistencia
<u>Solanum acaule</u>	Rx(ac1)	PVX	Extrema
<u>S. andigena</u>	Rx(adg)	PVX	Extrema; regulación de necrosis letal con variantes de X.
<u>S. andigena</u> (USDA 41956)	Rx(adg)	PVX	Extrema
<u>S. tuberosum</u> (y <u>S. andigena</u> ?)	Nx(tbr)	PVX	Hipersensibilidad a todas las variantes, no a B.
<u>S. sparsipilum</u>	Nx(spl)	PVX	Hipersensibilidad a todas las variantes, no a B.
<u>S. sparsipilum</u> (OCH 11926)	?	PVX	Extrema, hipersensibilidad a HB.
<u>S. tuberosum</u> (y <u>S. andigena</u> ?)	Nb(tbr)	PVX	Hipersensibilidad a B.
<u>S. chacoense</u> (y <u>S. microdontum</u> ?)	Nx(chc)	PVX	Resistencia a infección.
<u>S. stoloniferum</u>	Ry(sto)	PVY	Extrema
<u>S. chacoense</u>	R(chc)	PVY	Extrema
<u>S. stoloniferum</u>	Ryn	PVY-PVA	Extrema
<u>S. stoloniferum</u>	RY(sto) ^{rna}	PVY-PVA	Extrema a PVY Hipersensibilidad (no letal) a PVA.
<u>S. hougasii</u>	Ry(hou)	PVY	Extrema
<u>S. stoloniferum</u>	Ry(sto) ⁿ¹	PVY	Hipersensibilidad
	Ry(sto) ⁿ²		
<u>S. stoloniferum</u>	Ry(sto) ^{na}	PVY-PVS	Extrem. (PVY); hipersensibilidad (PVS)
<u>S. demissum</u>	Ny(dms)	PVY	
<u>S. tuberosum</u>	Nc(tbr)	PVY	Hipersensibilidad a PVY ^C .
<u>S. tuberosum</u>	Na(tbr)	PVA	Hipersensibilidad
<u>S. brevidens</u>	----	PLRV	Extrema?
<u>S. fernandezianum</u>	----	PLRV	Extrema?
<u>S. etuberosum</u>	----	PLRV	Extrema?
<u>S. tuberosum</u>	----	PLRV	Resistencia a infección, hipersensibilidad.
<u>S. berthaultii</u>	----	PLRV	Hipersensibilidad

.2 Resistencia a la infección. Es también conocida como resistencia estadística y se basa en la baja dispersión del virus a una población de plantas bajo las condiciones ecológicas de cultivo. Generalmente esta resistencia es determinada por comparación con variedades susceptibles bajo condiciones normales de cultivo (acceso a cierta presión de inóculo, vector, condiciones ambientales, etc.).

.3 Hipersensibilidad. La hipersensibilidad desde el punto de vista básico es la intolerancia del huésped al virus. Las células en el sitio de infección se necrosifican y mueren quedando el virus localizado en el punto de infección. Este es el caso preferido de hipersensibilidad. Sin embargo, es común hallar manifestaciones extremas en las cuales las plantas reaccionan produciendo necrosis descendente (acronecrosis). En condiciones de campo estas plantas mueren antes de producir tubérculos evitando así la perpetuación del virus.

.4 Tolerancia. La tolerancia es mejor definida como la capacidad de una planta susceptible para producir a pesar de estar infectada. No es una buena forma de resistencia y generalmente es dependiente de la variante de virus que la infecta.

.5 Resistencia al vector. Dos formas de resistencia al vector son conocidas: a) Mecánica, por la presencia de alguna estructura morfológica en la planta que evita la actividad y desarrollo del vector en ella. Ejemplo: la existencia de pelos glandulares que al contacto con el vector liberan sustancias mucilaginosas que lo inmovilizan. b) Fisiológica, en plantas con alto contenido de sustancias alcaloides que son repelentes o tóxicas para el vector.

8.2.4 Determinación de fuentes de resistencia y evaluación de poblaciones.

Mientras que en la búsqueda de fuentes de resistencia se trabaja con clones individuales o poblaciones pequeñas de plantas, en la evaluación

de poblaciones a las cuales por cruzamiento se han transferido los genes que confieren la resistencia, es inevitable el manejo de gran cantidad de plántulas. Los métodos en ambos casos, sin embargo, son muy similares y dependen grandemente del virus en prueba. Aunque cada investigador o grupo tiene sus preferencias y métodos estandarizados, muy a menudo encuentran fallas en sus experimentos donde los resultados hallados en estados iniciales no concuerdan con los hallados posteriormente. Algunas de estas fallas pueden evitarse teniendo en cuenta algunos conceptos básicos.

.1 Fuentes de inóculo. Esta es quizás la parte más importante de todo trabajo de resistencia. La fuente de inóculo que ha de ser empleada debe cumplir los siguientes requisitos:

.1.1 El aislamiento del virus debe provenir del campo y ser representativo de la situación natural.

.1.2 El virus debe estar completamente libre de otros virus y debe haberse completado su identificación y comparado con variantes previamente estudiadas.

.1.3 Debe mantenerse y confirmarse periódicamente su infectividad en papa, especialmente cuando su propagación se realiza en otra especie vegetal. Es conocido el fenómeno de "atenuación" de la infectividad en papa, que ocurre cuando un aislamiento es mantenido y propagado continuamente en huéspedes diferentes. Con virus transmitidos por insectos debe confirmarse periódicamente esta capacidad cuando son transferidos continuamente por inoculación mecánica.

.1.4 En los huéspedes de propagación debe determinarse cuidadosamente el tiempo después de la inoculación cuando el virus es más infectivo. De la misma manera, en virus transmitidos por insectos debe determinarse el tiempo de adquisición más adecuado para alcanzar un número máximo de insectos infectivos.

.2 Métodos de inoculación. El método de inoculación que ha de emplearse depende del virus y del tipo de resistencia que se busca. La resistencia a la infección solamente puede ser determinada por exposición natural en el campo, aunque en algunos casos la inoculación artificial puede dar una idea de este tipo de resistencia. La resistencia hasta ahora conocida en PLRV, por ejemplo, es resistencia a la infección. En poblaciones de plántulas esta resistencia puede ser determinada por comparación con una población susceptible si en cada una se coloca igual número de áfidos infectivos. Aquí resulta muy importante el mantenimiento de una colonia de áfidos sana (libre de parásitos o predadores) y cuyos individuos tengan capacidad uniforme para transmitir al virus. Desafortunadamente no hay estudios que indiquen el número de áfidos más adecuado (lo cual equivale a la cantidad de virus) que debe ser colocado en cada plántula para evaluar esta resistencia. Por ello, las plántulas no infectadas son transferidas al campo para posterior evaluación.

Cuando se busca resistencia extrema o inmunidad y el virus puede ser transmitido mecánicamente, la inoculación en grandes poblaciones de plántulas es mejor realizada con equipos de inoculación masiva. Por ejemplo, el método empleado en el CIP para inocular PVX o PVY se basa en el uso de un aspersor de alta presión (30 psi) (Figura 12). El inóculo convenientemente diluido y mezclado con un abrasivo fino (Carborundum 600 mesh) es asperjado sobre las plántulas. La prueba final para inmunidad se hace por medio de inoculación con injertos.

.3 Métodos de evaluación. La evaluación de las plántulas inoculadas es generalmente realizada por una combinación de métodos. La sintomatología, cuando es evidente, es de gran ayuda pero en la actualidad los métodos serológicos, especialmente ELISA, están siendo más empleados.

Con el incremento de la sensibilidad en esos métodos de detección es necesario tener cuidado en la interpretación de los resultados. Por ejemplo, en algunas plantas inmunes e inoculadas por medio de injertos



FIGURA 12. Inoculación masiva de plántulas de papa con pistola de presión ("spray gun") para evaluar resistencia a PVX y PVY.

ha sido posible detectar la presencia de virus en bajas concentraciones. Esto parece que es debido al movimiento pasivo a través del tejido conductor de virus desde el injerto infectado. En estos casos, para demostrar la inhabilidad del virus para infectar un huésped o establecerse en él, es preciso eliminar el injerto o pluma infectado y verificar después de un tiempo la presencia de virus.

8.2.5 Producción de semilla libre de virus.

El proceso de producción de semilla libre de virus representa la combinación de prácticas agronómicas deseables y el conocimiento de los virus del cultivo. Varios métodos o sistemas de producción de semilla asexual han sido descritos en la literatura, sin embargo, todos se basan en el mismo principio: la obtención o producción de material libre y su subsecuente multiplicación bajo condiciones de mínima reinfección. Por este proceso se trata de eliminar no sólo los virus sino también las plantas atípicas o con otros patógenos transmitidos a través de la semilla. La semilla básica o élite representa un grupo pequeño de plantas, completa o parcialmente libre de virus. Las multiplicaciones de la semilla básica dan origen a la semilla de fundación la que, posteriormente en un programa establecido de semillas, dará origen a la semilla certificada. Esta última es la que idealmente debe sembrar el agricultor para producir papa de consumo. Cada una de las etapas puede ser dividida en grados de acuerdo con el número de multiplicaciones que represente desde el inicio.

No se tratará aquí de los procedimientos o sistemas para producir la semilla, sino más bien de la aplicación de algunos conceptos virológicos que debe tenerse en cuenta al iniciar un proceso de esta naturaleza.

.1 La semilla básica o élite: grado de sanidad. Es lógico que del grado de limpieza o sanidad de la semilla básica depende la calidad de la última etapa de multiplicación o semilla certificada. Se puede obtener rápidamente semilla básica de muy alto grado de sanidad (a partir de

pocas plantas que pudieran haberse obtenido por cultivo de meristemas) gracias a la disponibilidad de métodos de multiplicación rápida. Sin embargo, debe tenerse en cuenta si el costo de producirla está respaldado por los recursos o las condiciones necesarias para mantenerla libre.

En un programa inicial en una zona o país donde este proceso no haya sido empleado con anterioridad se puede empezar con la eliminación de los virus que estén causando las pérdidas mayores. A modo de sugerencia y teniendo en cuenta la importancia relativa de los principales virus, se debería tratar de obtener la semilla básica libre de los virus que se mencionan en el siguiente plan:

- 1 - 3 años: Libre de PLRV y PVY (en la zona andina podría incluirse APMV u otro virus importante en la región. Por ejemplo, PDMV en Argentina).
- 3 - 5 años: Libre además de PVX (y APLV para la zona andina).
- 5 - 7 años: Incluir eliminación de PVS y PVM.
- < 7 años: Otros virus.

El fracaso y abandono de algunos programas de semilla ha sido debido a tratar de iniciarlos y mantenerlos completamente libres de virus. Debe tenerse en cuenta que la eliminación de un solo virus requiere mantener un sistema apropiado de chequeos rutinarios los cuales incrementan los costos. Además, cuando se trata de eliminar virus de baja incidencia o poco efecto en el rendimiento, la semilla podría ser de mejor calidad pero el ingreso neto no sería altamente significativo al compararlo con el generado por la semilla tradicional del agricultor.

Debido a su alto costo la semilla básica es generalmente producida por entidades oficiales. Sin embargo, los agricultores avanzados pueden intentarlo individualmente, en grupos, o en asociación con organismos oficiales.

8.2.6 Principios de la detección de virus en un programa de semillas.

La razón de la aplicación de técnicas de detección es identificar al virus causante de las infecciones tan pronto como sea posible después de ocurrida la infección, y antes de que la planta infectada llegue a ser un reservorio para posterior diseminación.

Como se ha visto en capítulos anteriores las diferentes técnicas de diagnóstico varían en sensibilidad y complejidad. Su eficiencia, además de los factores inherentes a la técnica misma, dependen de la habilidad y del entrenamiento del operador.

La técnica más adecuada debe combinar alta sensibilidad con simplicidad de aplicación y bajo costo. Como ninguna de las técnicas es ideal para todas las situaciones, la selección debe basarse en los aspectos siguientes:

grado deseado de reducción de virus,
etapa de multiplicación de la semilla,
virus involucrados,
recursos disponibles.

.1 Grado deseado de reducción de virus. Los límites de sanidad respecto a virus dependen de las necesidades de un programa de producción de semilla. Algunos virus sólo causan pérdidas insignificantes o no prevalecen en la región. La producción indiscriminada de semilla completamente libre de virus puede ser indeseable y costosa; por ello un programa de producción de semilla debe ser restringido a los virus que son más prevalentes y severos.

.2 Etapa de multiplicación de la semilla. Como se ha mencionado anteriormente, la multiplicación de la semilla se hace en varias etapas crecientes en volumen. En la multiplicación final (semilla certificada) los métodos adoptados deben ser aquellos que permitan un estimado rápido del porcentaje de infección ya que de esto dependerá su aceptación o rechazo. Evidentemente, la observación sintomatológica es la más adecuada, pero las estimaciones basadas en pruebas serológicas en muestras al azar son también de gran valor. Por el contrario, en la producción de plantas madres se requieren métodos más sensitivos ya que estas plantas son la base del programa.

.3 Virus involucrados. Al iniciar un programa y previo diagnóstico de la ocurrencia de enfermedades virales en la región, se determinan los virus que justifican su eliminación del cultivo. Luego, los métodos que se han de emplear deben tener una alta sensibilidad para detectar esos virus. Algunos métodos son efectivos para detectar un virus pero no otros, por lo tanto es necesaria y justificable la aplicación de varios métodos. Por ejemplo, la prueba de látex es muy útil para detectar la mayoría de virus con excepción del PLRV, el cual sólo puede ser detectado eficientemente con ELISA.

.4 Recursos disponibles. Algunos métodos de detección requieren un mínimo de condiciones para su aplicación. Por ejemplo, la observación de síntomas sólo requiere inspectores experimentados. El uso de otras técnicas requiere la disponibilidad de invernaderos, laboratorio, equipo o materiales. La selección depende del grado de complejidad y de los recursos disponibles en el programa.

8.2.7 Límites de tolerancia de infección viral.

Es muy común hablar de tolerancia máxima para determinados virus en programas de semilla. En países con alta experiencia y tecnología en producción de semilla estos límites son bastante bajos (por ejemplo, la

máxima tolerancia para el PLRV es 3%). La aplicación de tales niveles en países que se inician en esta actividad es por cierto una utopía.

Sin embargo, la determinación de estos límites no es fácil. La mejor manera de determinarlos es por medio de experimentos de degeneración a través de varias campañas. La determinación del grado de reinfección podría ser una forma adecuada de fijar estos límites. Al principio, sin embargo, es necesario mantener una gran flexibilidad y fijar los límites en porcentajes amplios. Para un programa que empieza, un ejemplo real podría ser la Tabla 8.

TABLA 8. Tolerancia máxima de virus en semilla básica (última multiplicación).

Enfermedad	Edad del programa en años			
	1 - 3	3 - 5	5 - 7	7
Enrollamiento	< 10 %	< 3 %	> 0,5 %	0
Mosaico suave (X, S, M, APLV)	< 15 %	< 8 %	< 3 %	> 0,5 %
Mosaico severo (X, Y, APMV)	< 5 %	< 2 %	> 0,5 %	0
Necrosis virales (Y)	< 5 %	< 2 %	0	0
Otros (cálico, amarillamientos)	< 3 %	< 1 %	0	0

La Tabla 8 es aplicable a programas donde la multiplicación de la semilla básica es realizada en condiciones de campo. En esa Tabla se asume que la edad del programa va a permitir un ajuste de los métodos de detección. Los niveles de virus para cada caso se van reduciendo gradualmente. Algunos se reducen más rápidamente debido a la facilidad de detección y control de la reinfección. Evidentemente, este ejemplo puede ser modificado de acuerdo con el desarrollo real del programa. Con los métodos de multiplicación de semilla y de detección disponibles

actualmente, estos niveles son fácilmente alcanzables. Es mucho más difícil predecir en semilla de fundación o certificada cuáles serían los niveles aceptables. Sin embargo, estos deben ser ajustados de acuerdo con la sanidad del material inicial (básico).

En la primera etapa (1-3 años) podría ocurrir que la única diferencia en rendimiento real de la semilla certificada se deba a que mejora la calidad de la semilla sin que ello tenga que ver con virus, por ejemplo, uniformidad varietal, o mejores características fisiológicas de la semilla. Pero el mantenimiento de esos niveles va a permitir un mejoramiento de la semilla en las etapas siguientes.

9. REFERENCIAS SELECTAS

(En adición a aquéllas mencionadas en el texto.)

9.1 PRINCIPIOS Y TECNICAS GENERALES

- Ball, E.M. 1974. Serological Tests for the Identification of Plant Viruses. The Amer. Phytopath. Society, Ithaca, N.Y. 31 pp.
- Bokx de, J.A. (ed.). 1972. Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production. Centre for Agric. Publ & Documentation, Wageningen. 233 pp.
- Bos, L. 1978. Symptoms of Virus Diseases in Plants. Centre for Agric. Publ. & Documentation, Wageningen. 225 pp.
- Corbett, M.K. and M.D. Sisler (eds.). 1964. Plant Virology. Univ. of Fla. Press, Gainesville. 557 pp.
- CMI/AAB. 1972-1982. Descriptions of Plant Viruses. Edited by A.J. Gibbs, B.D. Harrison and A.F. Murant. United Kingdom.
- Diener, T.O. 1979. Viroids and Viroid Diseases. John Wiley & sons, New York. 252 pp.
- Fernandez, V., M.V. 1969. Introducción a la Fitopatología. Vol I Virus. 3a. edición. I.N.T.A. 1011 pp.
- Gibbs, A.I. and B.D. Harrison. 1976. Plant Virology. The Principles. London. E. Arnold. 292 pp.
- Kado, C.I. and H.O. Agrawal (eds). 1972. Principles and Techniques in Plant Virology. Van Nostrand Reinhold Co. New York & London. 688 pp.
- Kennedy, I.S., M.F. Day and V.F. Eastop. 1972. A conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. London. Commonwealth Institute of Entomology. 114 pp.
- Maramorosch, K. 1969. Viruses, Vectors and Vegetation, Wiley Interscience. 666 pp.
- Maramorosch, D. and H. Koprowski (eds). 1967-1971. Methods in Virology. Vol. I, II, III, IV, V and VI. Academic Press, New York and London.
- Matthews, R.E.F. 1970. Plant Virology. Academic Press, New York and London. 778 pp.

- Matthews, R.E.F. 1957. Plant Virus Serology. Cambridge Univ. Press. 128 pp.
- Ouchterlony, O. 1968. Handbook of Immuno-diffusion and Immuno-electrophoresis. Ann. Arbor Humprey Sci. Pub. 215 pp.
- Hooker, W.J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa, Lima. Perú. 166 pp.
- Smith, K.M. 1957. A textbook of Plant Virus Diseases. Churchill Ltd., London. 652 pp.

9.2 VIRUS DE PAPA

.1 Temas sobre virus específicos

- PVX Ladeburg, R.C., R.H. Larson and J.C. Walker. 1949. Amer. Pot. J. 26 (12) 432-435.
- PVX Matthews, R.E.F. 1949. Ann. Appl. Biol. 36:460.
- PVX Cockerham, G. and T.M.W. Davidson. 1963. Rep. Scott. Pl. Breed Stn. 1963:26.
- PMTV Harrison, B.D. and R.A.C. Jones. 1970. Ann. Appl. Biol. 65 (3):393.
- PMTV Cooper, J.I. and B.D. Harrison. 1973. Pl. Path. 22 (2):-73-78.
- PMTV Jones, R.A.C. 1973. Ann. Appl. Biol. 74(3):349-358.
- PMTV Calvert, E.L. and B.D. Harrison. 1966. Pl. Path. 15:134-139.
- PVA Mac Lachlan, D.S., R.H. Larson and J.C. Walker. 1953. Res. Bull. Agric. Exp. Stn. Univ. Wis. 180. 36 pp.
- PVA Calvert, E.L. 1960. Pl. Path. 9:14.
- PVY Darby, J.F., R.H. Larson and J.C. Walker. 1957. Res. Bull. Agric. Exp. Stn Univ. Wis. 177. 32 pp.
- PVY Kahn, R.F. and R.L. Monroe. 1963. Phytopathology 53: 1356.
- PVY Nobrega, N.R. and K. Silberschmidt. 1944. Arquiv. Inst. Biol. S. Paulo 15:307.
- PVY Bawden, F.C. 1936. Ann. Appl. Biol. 23:487.
- PVY Bradley, R.H.E. 1953. Nature 171:755.
- PVY Bawden, F.C. and B. Kassanis. 1951. Agr. Appl. Biol. 38:402.
- PVY Horvath, J. 1967. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung. 2:319.

- TRV-TNV Cadman, C.H. 1963. Ann. Rev. Phytopath. 1:143-172.
PMTV
PLRV Peters, D. 1967. H. Veenman & Zonen. N.Y. Wageningen. 100 pp.
- PLRV Webb, R.F., R.H. Larson and J.C. Walker. 1952. Res. Bull.
Agric. Exp. Stn. Univ. Wis. 178. 40 pp.
- PLRV Duffus, J.E. 1964. Phytopathology 54:736.
PLRV Duffus, J.E. 1981. Phytopathology 71:193.
- TRV Shmelzer, K. 1957. Phytopath. Z. 30:281.
- TRV Cadman, C.H. and B.D. Harrison. 1959. Ann. Appl. Biol.
47:542.
- TRV Frost, R.R. and B.D. Harrison. 1967. J. Gen. Virol.
1:455-464.
- TRV Takashi, M. and Y. Okada. 1970. Virology 42:993-998.
- IRV Lister, R.M. and C.E. Bracker. 1969. Virology 37:262.
- TRV Cadman, C.H. 1959. Eur. Potato J. Z.: 165-175.
- TNV Noordam, D. 1957. Tijdschr. Plziekt. 63:237.
- TNV Price, W.C. 1940. Am. J. Bot. 27:530.
- TBRV Harrison, B.D. 1958. J. Gen. Microbiol. 18:450.
- TBRV Bercks, R. 1962. Phytopath. Z. 46:97.
- TBRV Harrison, B.D. 1964. Virology 22:544.
- TSV Costa, A.S., A.M.B. Carvalho and J. Deslandes. 1964.
Bragantia 23:i.
- PVT Salazar, L.F. and B.D. Harrison. 1978. Ann. Appl. Biol 89:
223-235.
- PVT Salazar, L.F. et al. 1978. J. Gen. Virol. 39, 333-342.
- PBRV Salazar, L.F. and B.D. Harrison. 1978. Ann. Appl. Biol.
90:375-386.
- PBRV Salazar, L.F. and B.D. Harrison. 1978. Ann. Appl. Biol.
90:387-394.
- APMV Fribourg, C.E., R.A.C. Jones and R. Koenig. 1977.
Phytopathology 67:969-973.
- APMV Salazar, L.F. and B.D. Harrison. 1978. J. Gen. Virol. 39,
171-178.

9.3 TRANSMISION, DISEMINACION Y ECOLOGIA

- PVX Larson, R.H. 1950. Amer. Pot. J. 27:53.
PVX Walters, H.J. 1952. Phytopathology 42:355.

- PVX Nienhaus, F. and B. Stille. 1965. *Phytopath. Z.* 54:355.
- PVA Sylvester, E.S. 1954. *Hilgardia* 23:53.
- PLRV Stegwee, D. and M. Ponsen. 1958. *Entomol. Exptl. Appl.* 1:291.
- PLRV Harrison, B.D. 1958. *Virology* 6:265.
- PSTV Bonde, R. and D. Merriam. 1951. *Am. Potato J.* 28:558.
- PSTV Manzer, F.A. and D. Merriam. 1961. *Am. Potato J.* 38:346.
- PSTV Singh, G.P. 1970. *Am. potato J.* 47:225.
- PSTV Hunter, D.E., H. Darling and W.L. Beale. 1969. *Am. Potato J.* 46:247.
- PSTV Fernow, K.H., L.C. Peterson and R. Plaisted. 1970. *Am. Potato J.* 47:75.
- PSTV Fernow, K.H. 1967. *Phytopathology* 57:1347.
- PVM Wetter, C. and P. Volk. 1960. *Eur. Potato J.* 3:158.
- PVM Bode, O. and R. Weidemann. 1970. *Proc. 4th Trienn. Conf. Eur. Ass. Potato Res. Brest 1969:224.*
- PMTV Jones, R.A.C. and B.D. Harrison. 1969. *Ann. Appl. Bio.* 63:1-A.
- PAMV Kassanis, B. and D.A. Govier. 1971. *J. Gen. Virol.* 10:99.
- PAMV Kassanis, B. and D.A. Govier. 1971. *J. Gen. Virol.* 12:221.
- AMV Porter, D.R. 1936. *Hilgardia* 9 (8):383.
- TRV Van Hoof, H.A. 1968. *Nematológica* 14:20.
- TRV Ayala, and M.W. Allen. 1968. *J. Agric. Univ. P. Rico* 52:101.
- TNV Teakle, D.S. 1962. *Virology* 18:224.
- TNV Teakle, D.s. and A.H. Gold. 1963. *Virology* 19:310.
- TNV Kassanis, P. and I. Macfarlane. 1965. *Virology* 26:603.
- TRSV McGuire J.M. 1964. *Phytopathology* 54:799.
- TBRV Lister, R.M. and A.F. Murant. 1967. *Ann. Appl. Biol.* 59:49.
- G* Hagen, K.S. and R. Van Der Bosch. 1968. *A. Rev. Ent.* 13:325.
- G Swenson, K.S. 1968. *A. Rev. Phytopath.* 6:351-374.
- PLRV Mac Carthy, H.R. 1954. *Phytopathology* 44 (4):167-179.

- Ecology Bennett, C.W. 1952. Plant. Dis. Rptr. Supplement 211.
PAMV Clinch, P.E., F.B. Loughnane and P.A. Murphy. 1936. Scient.
PVA Proc. R. Dub. Soc. 21:431.

9.4 DETECCION DE VIRUS

- PVX Shepard, J.F. and G.A. Secor. 1969. Phytopathology 59:1878:-
1844.
PVX-PVY Horvath, J. 1972. Acta Phytopathol. Acad. Se. Hungaricae 7
(4):343-351.
PAMV id.
CMV id.
PVA Kohler, E. 1953. Zuchter 23:173.
PVA Bartels, R. 1970. Potato Res. 13:119.
PVM Hiruki, C. 1970. Phytopathology 60:739.
G Bercks, R. 1967. Phytopath. Z. 58:1-7.
PVM Shepard, J.F. et al. 1971. Phytopathology 61:873.
PVS Bokx, J.A. de. 1970. Neth. J. Pl. Path. 76:70-78.
PLRV Koenig, R. and W.C. Mueller. 1963. Phytopathology 53:880
(Abs).
PVY-TEV Purcifull, E.E. and G.V. Gooding, Jr. 1970. Phytopathology
60:1036-1039.
PLRV Gaumann, E. 1950. Phytopath. Z. 16 (4):479.
PLRV Hovey, Ch. and R. Bonde. 1948. Phytopathology 38:505.
PVX Francky, R.I.B. 1967. Phytopathology 57:329.
G Kahn, R.P. and R.L. Monroe. 1970. Phytopathology 60:1183.
PVS, X,Y Sampson, P.J. and R.H. Taylor. 1968. Phytopathology 58:489.
PVX Singh, R.P. 1969. Am. Potato J. 46:355-357.
ELISA Engvall, E. and P. Perlman. 1971. Immunochemistry 8:871.
ELISA Engvall, E. and P. Perlman. 1972. Journal of Immunology
109:129.
ELISA Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. J. Gen. Virol. 34:475.
ELISA Casper, R. 1977. Phytopath. Z. 90:364.
ELISA Gugerli, P. 1978. Phytopath. Z. (in press).
ELISA Salazar, L.F. 1978. Abstracts 3rd Int. Congress Pl. Path.
Munich (1978).

- ELISA Tamada, T. and B.D. Harrison. 1980. *Ann. Appl. Biol.* 95:209.
PSTV Schumann, G.L. et al. 1978. *Phytopathology* 68:1256.
PSTV Pfannenstiel, M.A., S.A. Slack and L.C. Lane. 1980. *Phytopathology* 70:1015.
PSTV Morris, T.J. and E.M. Smith. 1977. *Phytopathology* 67:145.
PSTV Morris, T.J. and N.S. Wright. 1975. *Am. Potato J.* 52:57-63.
ELISA Voller, A., D.F. Bidwell and A. Barlett. 1976. *Bull. World Health Organ.* 53:55.
ELISA Salazar, L.F. 1979. *Fitopatología* 14:1-9.
LATEX Koenig, R. and O. Bode. 1978. *Phytopath. Z.* 92:275-280.

9.5. RESISTENCIA A VIRUS

- PVX Schultz, E.S. et al. 1943. *Amer. Pot. J.* 41(4):124-127.
PLRV Davidson, T.M.N. 1973. *Potato Res.* 16 (2):99-108.
PVX-PVY Cockerham, G. 1970. *Heredity* 25 (3):309-348.
PVX-PVS Bagnall, R.H. 1972. *Am. Potato J.* 49:342.
PVY Easton, G.D., R.H. Larson and R.W. Hougas. 1958. *Res. Bull. Agric. Exp. Stn. Univ. Wis.*
G Ross, H. 1958. *Eur. Potato J.* 1:1-19.
G Ross, H. 1966. *Am. Potato J.* 43:63-80.
PLRV Clark, R.L. 1963. *Am. Potato J.* 40:115-120.
PSTV Manzer, F.E., R.V. Akeley and D. Merriam. 1964. *Am. Potato J.* 41:411-416.
PVY Bagnall, R.H. and R.H. E. Bradley. 1958. *Phytopathology* 48:121.
PVA Bagnall, R.H. and J.P. Mackinon. 1960. *Eur. Potato J.* 3:331.
PLRV Cadman, C.H. and J. Chambers. 1960. *Ann. Appl. Biol.* 48:729.

9.6 EFECTO DE LOS VIRUS

- PVX Dowley, L.J. 1973. *Potato Res.* 16 (1):3-9.
G Reestman, A.J. 1970. *Potato Res.* 13:248-268.
G Reestman, A.J. 1962. *Eur. Potato J.* 5:166-172.
PLR, PVX Murphy, H.J., M.J. Goven and D.C. Merriam. 1966. *Am. Potato J.* 43:393-396.
PSTV

- PVX, PVY Jaros, H. 1963. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 6 (1):75-86.
TRV Harrison, B.D. 1968. Eur. Potato J. 11:165-176.
TBRV Harrison, B.D. 1959. Ann. Appl. Biol. 47 (3):557.
PLRV Webb, R.E. 1956. Pl. Dis. Rep. 40 (1):15-18.
PVX Scott, R.J. 1941. Scot. J. Agr. 23:258.
PVA Bonde, R. et al. 1943. Maine Agr. Exp. Sta. Bull. 421.
128 pp.

9.7 ERRADICACION DE VIRUS

- Hollings, M. and O.M. Stone. 1968. Scient. Hort. 20:57.
Oshima, N. and C.H. Livingston. 1963. Am. Potato J. 40:9-16.
Kassanis, B. 1957. Ann. Applied Biol. 45 (3):422-427.
Mellor, F.C. and R. Stace-Smith. 1967. Phytopathology 57(7):674-678.
Stace-Smith, R. and F.C. Mellor. 1967. Phytopathology 57:1009 (Abst.)
Stace-Smith, R. and F.C. Mellor. 1968. Phytopathology 58:199-203.
Mellor, F.C. and R. Stace-Smith. 1970. Phytopathology 60:1587-1590.
Morel, G., C. Martin and J.F. Muller. 1968. Ann. Physiol. Reg.
10(2):113-139.
Stace-Smith, R. and F.C. Mellor. 1970. Phytopathology 60:1857.
Pennazio, S. and P. Redolfi. 1973. Potato Res. 16:20-29.
Kassanis, B. and A. Varma. 1967. Ann. Appl. Biol. 59:447-450.
Hamid, A. and S.B. Locke. 1961. Am. Potato J. 38:304-310.
Hawkins, R. and T. Murashige. 1970. Am. J. Botany 57(5): 562.
Houten, S.G., F. Quak and F.A. van der Meer. 1968. Neth. J. Pl. Path.
74:17-24.
Thomson, A.D. 1957. N.A. J. Sci. Tech. 38:482.
Bagnall, R.H. 1953. Can. J. Agr. Sci. 33:509.
Lizárraga, R.E. et al. 1980. Phytopathology 70:754.

APENDICES

APENDICE 1

METODO PARA PURIFICAR γ -GLOBULINA. (Se puede emplear cualquier otro método eficiente.)

1. A 1 ml de antisuero añadir 9 ml de agua destilada.
2. Añadir 10 ml de una solución saturada de sulfato de amonio.
3. Dejar durante 30-60 minutos a temperatura ambiental.
4. Centrifugar a 6 000 rpm por 15 minutos.
5. Disolver el precipitado en 2 ml PBS diluido $\frac{1}{2}$.
6. Dializar 3 veces con 500 ml de PBS diluido $\frac{1}{2}$. (Puede realizarse una mayor purificación en este estado, filtrando la solución a través de una columna de celulosa preequilibrada con PBS diluido $\frac{1}{2}$ y colectando la primera fracción de proteína que aparezca.)
7. Medir la absorbancia de OD₂₈₀ y ajustar la concentración de γ -globulina para tener aproximadamente 1,4 OD (aprox. 1 mg/ml).
8. Almacenar en tubos de vidrio tratados con silicona a 4°C con 0,2% de N₃Na.

Previous Page Blank

APENDICE 2

METODO PARA CONJUGAR LA ENZIMA CON LA γ -GLOBULINA. (De: Clark, M.F. and Adams, A.N. 1977. J. Gen Virol. 34: 475.)

1. Centrifugar 1 ml (= 5 mg) de la enzima (la cual se halla en una solución saturada de sulfato de amonio). Eliminar el sobrenadante líquido.
2. Disolver el precipitado directamente en 2 ml (= 2 mg) de γ -globulina purificada.
3. Dializar tres veces contra 500 ml PBS.
4. Añadir glutaraldehído para tener una concentración final de 0,06%. Mezclar bien.

NOTA: El glutaraldehído también puede ser incorporado durante la última diálisis; para ésto sólo es necesario agregarlo a la concentración final de 0,06% en PBS.

5. Dejar durante cuatro horas a temperatura ambiental. Debe desarrollarse un color ligeramente marrón.
6. Dializar tres veces contra 500 ml PBS para eliminar el exceso de glutaraldehído.
7. Añadir albúmina de suero bovino para tener una concentración final de 5 mg/ml y almacenar a 4°C.

APENDICE 3

REACTIVOS Y "BUFFER" NECESARIOS EN ELISA.

PBS (pH 7,4)

8,0 g NaCl	}	Llevar a un litro
0,2 g KH ₂ PO ₄		
2,9 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O		
0,2 g KCl		
0,2 g NaN ₃ *		

PBS-Tween = + 0,5 ml Tween - 20 por litro.

PBS-Tween-PVP = PBS-Tween + 2% Polivinilpirrolidone MW 40 000.

"Coating buffer" (pH 9,6)

1,59 g Na ₂ CO ₃	}	En un litro de agua destilada
2,93 g NaHCO ₃		
0,2 g NaN ₃ *		

"Substrate buffer"

97 ml Dietanolamina	}	Llevar a un litro
800 ml H ₂ O		
0,2 g NaN ₃ *		
Añadir HCL hasta pH 9,8.		

* En el CIP este compuesto ha sido eliminado de todos los "buffer" debido a su alta toxicidad. Esto es posible solamente debido a que dichos "buffer" no son almacenados por tiempo prolongado.

APENDICE 4

PROCEDIMIENTO PARA SENSIBILIZAR LATEX. (De: Fribourg, C.E. 1981. "Procedure for Latex Sensitisation. Laboratory practical guide", CIP.)

Introducción

Para el recubrimiento de las partículas de látex es más recomendable utilizar la γ -globulina del antisuero diluida cerca a su punto final de dilución (título). Sin embargo, como hay una gran variación de un antisuero a otro, es mejor determinar la dilución óptima con cada lote de antisuero. El siguiente procedimiento es el que normalmente se usa en el CIP.

Materiales necesarios

- solución saturada de sulfato de amonio,
- centrifuga de baja velocidad,
- solución salina (0,85% (0,14 M) de cloruro de sodio),
- 0,05 M Tris-HCl pH 7,2
- 0,05 M Tris-HCl pH 7,2 + 0,02% polivinilpirrolidona + 0,05% de (N₃Na),
- tubos de diálisis,
- tubos de ensayo,
- Difco Bacto látex 0,81,
- placas Petri de plástico,
- lápiz de cera,
- jeringas hipodérmicas (1 cc),
- agujas de inyección (21G 1 1/2),
- existencias de antisuero,
- agitador mecánico con acción rotatoria.

Procedimiento

1. Diluir el antisuero con solución salina para tener una dilución $\frac{1}{4}$. Precipitar la fracción de globulinas con sulfato de amonio al 40% (4 ml de antisuero $\frac{1}{4}$ + 2,7 ml de solución saturada de $SO_4(NH_4)_2$).

Dejar reposar durante 30 minutos a una hora y centrifugar a 7 000 g por 20 minutos.

2. Resuspender el pélet en 4 ml de solución salina.
3. Dializar contra varios cambios de solución salina.
4. Centrifugar el dializado a 10 000 g por 30 minutos. Si el sobrenadante no está claro, filtrar a través de papel de filtro.
5. Colocar 1 ml de 0,05 M Tris "buffer", pH 7,2 en cada uno de 10 tubos de ensayo.
Añadir 1 ml del dializado al primer tubo, mezclar y transferir 1 ml de la mezcla al tubo siguiente y así sucesivamente (diluciones dobles del antisuero original desde 1/4 hasta 1/2048).
6. Preparar una dilución 1/15 de látex en solución salina.
7. Añadir 1 ml del látex diluido a cada uno de los 10 tubos y dejar a temperatura ambiental durante 30 minutos. Agitar los tubos dos a tres veces durante este período.
8. Centrifugar cada mezcla a 6 000 g por 20 minutos.
9. Resuspender el pélet en 2 ml 0,05 M Tris-HCl pH 7,2 + 0,02% polivinilpirrolidona + 0,5% NaN₃.
10. Repetir pasos 8 y 9. Resuspender cada pélet en 1 ml del mismo "buffer".
11. Extraer jugo de hojas infectadas con el virus que se quiere detectar y hacer diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 5x10⁻⁴, 10⁻⁵, 5x10⁻⁵, y 10⁻⁶, usando 0,05 M Tris-HCl pH 8 + 0,01 M bisulfato de sodio y 0,05% Tween-20.

12. Verificar cada dilución de látex sensibilizado contra cada dilución del jugo.
13. Agitar durante una hora a 130 revoluciones por minuto.
14. Determinar cuál suspensión del látex sensibilizado produce la reacción más clara y detecta al virus en la dilución más alta del jugo. Esta corresponde a la mejor dilución de globulina utilizable para sensibilizar grandes cantidades de látex. La sensibilización de grandes volúmenes de látex a menudo produce suspensiones que no son tan sensitivas como aquellas preparadas en pequeños volúmenes. Por esta razón es recomendable dividir la globulina diluida en lotes pequeños (1-2 ml) y añadir el volumen correspondiente de látex diluido.

Las suspensiones de látex pueden almacenarse a 4°C donde permanecen activas por varios meses. Las esferas de látex tienden a sedimentarse; por ello es necesario agitar los frascos antes de usar su contenido.

REFERENCIAS SOBRE EL APENDICE 4

- Ball, E.M. 1974. Serological tests for the identification of plant viruses. The American Phytopathological Society. 31 pp.
- Bercks, C. 1967. Methodische Untersuchungen über den serologischen Nachweis pflanzenpathogener Viren mit dem Bentonit-Flockungs Test, dem Latex-test und dem Barium-sulfat test. Phytopathol Z. 58: 1-7.
- Fribourg, C.E. 1978. Antiserum production and present status of test for viruses in the CIP seed program. Planning Conference on Developments in the control of potato virus disease. International Potato Center, Lima, Peru.
- Koenig, R. and O. Bode, 1977. Detection of Andean potato latent and Andean potato mottle viruses in potato tubers with the latex test. Phytopathol. Z. (in press).

APENDICE 5

PROCEDIMIENTOS PARA PREPARACION DE GELES DE ACRILAMIDA PARA SEPARACION ELECTROFORETICA DE ACIDOS NUCLEICOS.

Reactivos necesarios

- A. Tampón básico (5X) 0,18 M Tris (hidroximetil) aminometano,
0,15 M ortofosfato dihidrogenado de sodio
($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$),
0,005 M tetracetato etilendiamino de sodio
(EDTA).
- B. Solución de acrilamida:
15% acrilamida,
0,75% NN^1 - metilenebisacrilamida.
- C. Persulfato de amonio (10%). Solución recién preparada.
- D. TEMED (N, N, N^1 , N tetrametiletilediamina).
- E. Tampón para correr: Tampón básico diluido 1/5.

Procedimiento: (Gel de 5%)

- Mezclar solución A: B: agua destilada, en proporción de 1,66: 1: 2,23
- Agregar rápidamente 0,005 ml de TEMED y 0,05 ml de 10% solución C por cada 1 ml de solución de acrilamida empleada en la mezcla.
- Verter inmediatamente en caja de electroforesis para láminas ("slabs") o llenar con pipeta los tubos de vidrio o Perspex (para geles cilíndricos).

Cuando se usan geles cilíndricos es necesario colocar una base (0,5 cm) de un gel de 10% en el fondo del tubo y dejarlo solidificar antes de añadir la solución del gel de corrida. Además, una vez llenos los tubos se debe colocar cuidadosamente una capa de agua destilada encima de la solución para permitir la gelificación y la formación de un menisco plano.

En láminas de acrilamida ("slabs"), los peines para formar los hoyos o recipientes para las muestras se deben colocar inmediatamente después de vertir la solución del gel.

- En aproximadamente 30 minutos el gel solidifica y queda listo para usar.
- Conectar los electrodos y colocar el tampón E.