

PN-ABN-104

80590

INSTITUTO VENEZOLANO
DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS

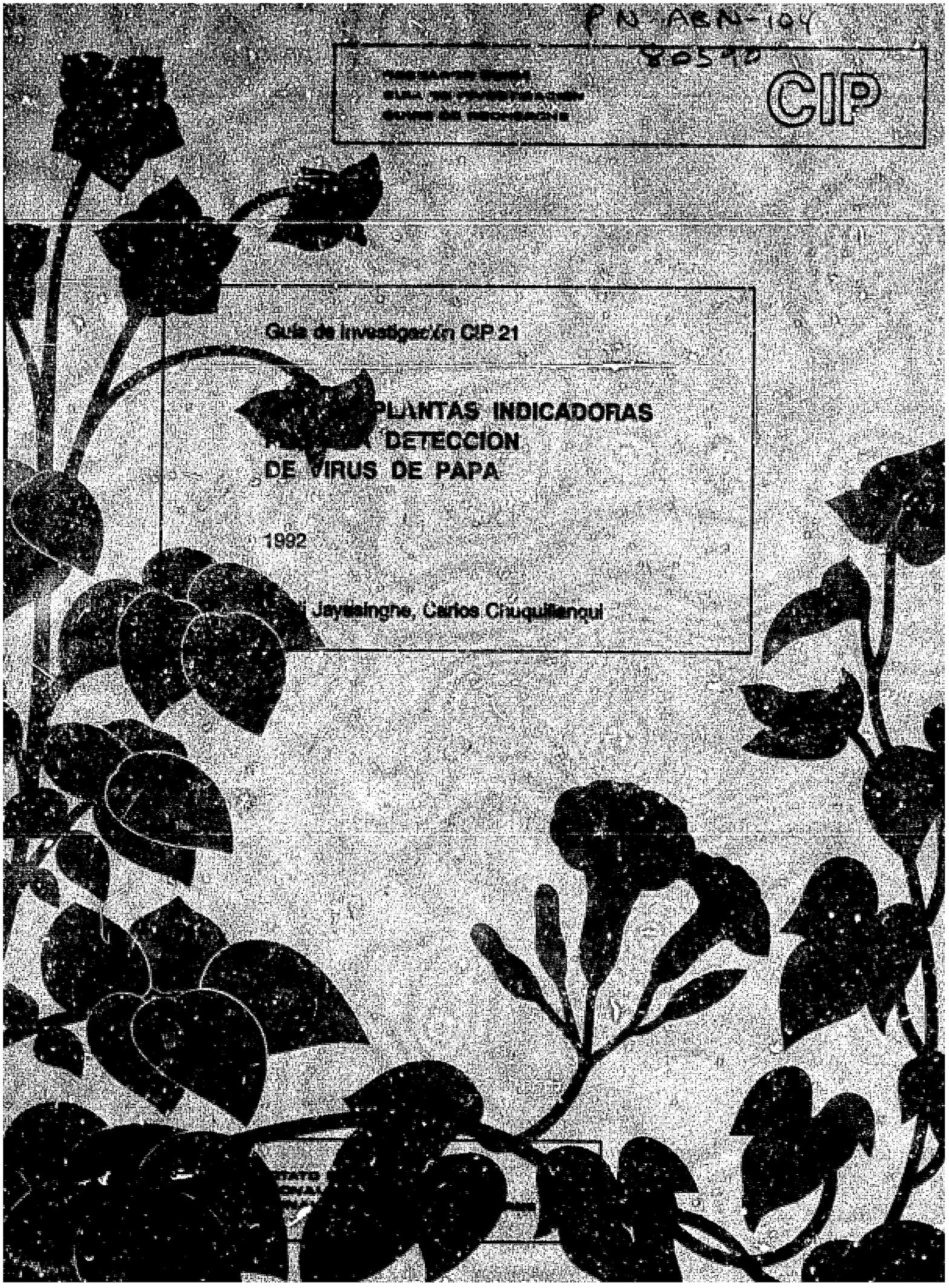
CIP

Guía de Investigación CIP 21

PLANTAS INDICADORAS
PARA LA DETECCIÓN
DE VIRUS DE PAPA

1982

Jayasinghe, Carlos Chuquillanqui



Guía de Investigación CIP 21

**USO DE PLANTAS INDICADORAS
PARA LA DETECCION
DE VIRUS DE PAPA**

1992

Upali Jayasinghe, Carlos Chuquillanqui

CIP
Apartado 5969
Lima, Perú

Ubicación
Av. La Universidad s/n
La Molina, Lima

Fax 351570
Tel. 366920
Télex 25672 PE

Guías de Investigación CIP (CRGs)

Describen tecnologías que han sido desarrolladas y utilizadas por el CIP y los Programas Nacionales a fin de promover la investigación y el intercambio de información entre científicos. Estas son actualizadas regularmente de acuerdo al avance científico.

Traducido del inglés

Jayasinghe, Upali; Chuquillanqui, Carlos. 1992. Uso de plantas indicadoras para la detección de virus de papa. Guía de Investigación 21. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 28 pp.

USO DE PLANTAS INDICADORAS PARA LA DETECCION DE VIRUS DE PAPA

- 1 Producción de plantas indicadoras**
- 2 Manejo del invernadero**
- 3 Inoculación mecánica**
- 4 Injerto**
- 5 Transmisión por vectores**
- 6 Desarrollo de síntomas**
- 7 Bibliografía**

Los virus causan las enfermedades más serias de la papa que no son controlables por medios químicos. Para la erradicación de los virus de la papa se necesitan emplear procedimientos complejos que requieren métodos confiables de detección, uno de los cuales consiste en el empleo de plantas indicadoras.

Los virus de la papa también pueden causar enfermedades en plantas de otras familias (cultivos, plantas ornamentales y especies silvestres), con síntomas que pueden ser completamente diferentes a los que presentan las papas. Como los virus de papa pueden infectar otras plantas y producir síntomas claros, es posible aprovechar esta característica para su detección. En este documento se describe la manera de cultivar plantas indicadoras bajo condiciones óptimas, libres de insectos, enfermedades y deficiencias de nutrientes, así como los procedimientos de inoculación y evaluación.

1 PRODUCCION DE PLANTAS INDICADORAS

Preparación del almácigo. Preparar una mezcla de arena (preferiblemente cuarzo) y musgo (1:1 v/v) de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Cernir la arena y el musgo por separado con un cernidor de malla (malla 100).
- Lavar la arena varias veces para eliminar las sales.
- Mezclar la arena y el musgo.

Si no se cuenta con estos materiales, utilizar otro sustrato con una estructura similar.

- Esterilizar la mezcla de una de las siguientes maneras:
 - a) Al vapor a 100 °C durante 30 minutos. Este es el mejor procedimiento, pero no siempre se cuenta con las facilidades necesarias.
 - b) En las regiones cálidas, emplear calor solar:
 - Esparcir el sustrato uniformemente en una superficie metálica y exponerlo al sol durante dos semanas. Darle vuelta periódicamente y humedecerlo con agua.
 - También se puede empacar el sustrato de suelo en una bolsa plástica y exponerlo a la luz solar durante dos semanas. Dar vuelta a la bolsa periódicamente.
 - Cuando la mezcla esté fría (después de dos o tres horas), añadir 40 g de nitrato de amonio, 200 g de monofosfato y 50 g de sulfomac por cada 100 kg de mezcla.

Siembra de semillas. Las plantas indicadoras siempre se cultivan a partir de semillas, nunca de esquejes.

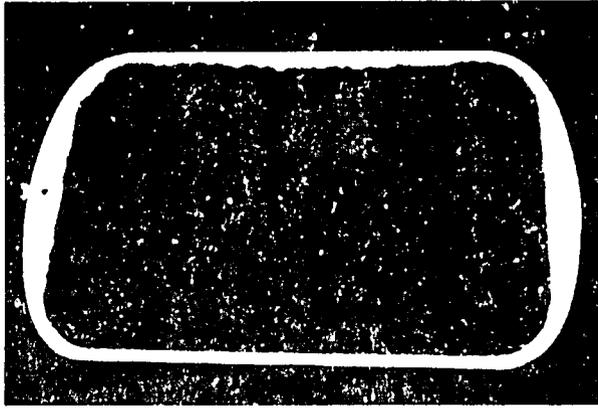
-
- Para mejorar la uniformidad de la germinación se pueden tratar las semillas, durante 48 horas, con 1500 ppm de ácido gibberélico. Secar las semillas al menos por 24 horas.
 - Colocar el sustrato en bandejas para semilla u otro recipiente adecuado de unos 40 x 30 x 5 cm.
 - Preparar surcos de 0.5 cm de profundidad a 3-4 cm de distancia (Figura 1).
 - Colocar en un surco semillas de un mismo tipo de planta indicadora (Figura 2). Se pueden plantar semillas de diferentes plantas hospedantes en una bandeja (Figura 3).
 - Cubrir con una capa delgada de tierra y regar con cuidado.

La temperatura óptima de germinación de la mayor parte de las semillas es 22-24 °C. En las regiones frías puede requerirse calefacción artificial. Como la germinación puede ser variable, conviene sembrar más semillas que el número necesario de plantas. Usar las plantas que emergen primero y descartar las demás.

El CIP cuenta con una cantidad limitada de semillas disponibles que usted puede solicitar, adjuntando un permiso de importación en caso de ser necesario en su país.

Trasplante. Cuando las plantas hayan llegado a cierta edad (Tabla 1.1), trasplantar cada plántula a una maceta con sustrato esterilizado (arena:tierra:musgo = 1:1:1). Preparar el sustrato como se ha descrito anteriormente utilizando una malla 36 para el cernido. Emplear macetas de 5 cm de diámetro, preferiblemente de arcilla en lugar de plástico.

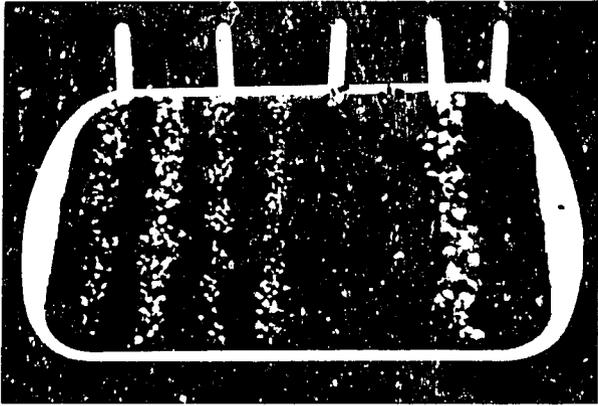
- Limpiar y esterilizar las macetas antes de usarlas.
 - Aflojar la tierra en las bandejas de semilla (Figura 6) y levantar las plántulas con cuidado.
 - Plantar las plántulas en huecos de 2 a 3 cm de profundidad.
 - Presionar ligeramente la tierra para mantener las plántulas en su sitio.
 - Regar inmediatamente.
-



1



2



3



4



5



6

6

Tabla 1.1. Número de días desde la siembra hasta el trasplante e inoculación (bajo condiciones imperantes en CIP, Lima)

		Trasplante	Inoculación
<i>Gomphrena globosa</i>	*	28	46
<i>Nicotiana rustica</i>		28	46
<i>Nicotiana glutinosa</i>	*	28	46
<i>Nicotiana tabacum</i> "White Burley"	*	28	46
<i>Nicotiana clevelandii</i>		28	46
<i>Nicotiana debneyii</i>	*	28	46
<i>Nicotiana benthamiana</i>		17	49
<i>Nicotiana occidentalis</i>		23	49
<i>Nicotiana tabacum</i> "Samsun"		28	46
<i>Nicandra physaloides</i>	*	28	46
<i>Physalis floridana</i>	*	17	31
<i>Datura metel</i>	*	17	31
<i>Datura stramonium</i>	*	17	31
<i>Chenopodium quinoa</i>	*	17	31
<i>Chenopodium murale</i>	*	17	31
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	*	28	46
<i>Lycopersicum esculentum</i> "Rutgers"	*	17	31

* Empleada en el CIP para trabajo de rutina.

2 MANEJO DEL INVERNADERO

El invernadero debe reunir las condiciones óptimas para un vigoroso crecimiento de las plantas.

Ventilación. En la estación calurosa, las mallas contra los áfidos pueden elevar excesivamente la temperatura haciendo necesario el empleo de ventilación forzada mediante un ventilador-extractor eléctrico de aire. Las entradas del ventilador deben ser a prueba de insectos.

Sombra. Para evitar el exceso de calor en el verano, dar sombra al invernadero en las horas de mayor temperatura.

Iluminación. En invierno puede ser necesario emplear iluminación suplementaria para alcanzar las 16 horas requeridas de iluminación. Para lograr un crecimiento adecuado de las plantas basta contar con tubos fluorescentes "luz de día" y algunos focos (bombillos) incandescentes de 25 w.

Limpieza. Para evitar la contaminación, aplicar las siguientes medidas de higiene.

- Eliminar los residuos de plantas.
- Eliminar las malas hierbas dentro y fuera del invernadero.
- No introducir plantas del campo al invernadero a menos que hayan sido tratadas con productos químicos para controlar los patógenos y plagas. Mantener las plantas de papa separadas de las plantas indicadoras.
- No ingresar al invernadero inmediatamente después de visitar el campo.
- Al ingresar al invernadero, usar un mandil limpio.
- Lavarse las manos antes de entrar al invernadero.
- No tocar las plantas indicadoras. Cuando se trabaje con las plantas indicadoras, usar toallas de papel para sostener las hojas.

Inocular las plantas indicadoras mediante inoculación mecánica o por savia, por injerto o con vectores. Ver las siguientes secciones.

3 INOCULACION MECANICA

Con excepción de algunos virus, como el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) y del virus del encrespamiento foliar apical de *Solanum* (SALCV), la mayor parte de los virus de la papa se pueden transmitir por inoculación mecánica o por savia.

Materiales:

- Mortero y triturador esterilizados.
- Plantas indicadoras.
- Carborundum en polvo (malla 60)
- Hisopos esterilizados de algodón.
- Material vegetal para las pruebas (hojas tiernas, pétalos, tubérculos, raíces); aproximadamente 2-3 g.
- 0.01 M de solución de tampón de fosfato, pH 8.0.

Preparar las siguientes soluciones con agua destilada:

Solución A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 27.6 g/dm³

Solución B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 53.65 g/dm³, ó

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 71.64 g/dm³

Mezclar 2.65 cm³ de solución A y 47.35 cm³ de solución B, y completar hasta 100 cm³ con agua destilada.

Procedimiento:

- Lavarse las manos con jabón.
- Poner etiquetas con fecha, origen de muestra, etc. en las plantas indicadoras.
- Espolvorear carborundum en las hojas de las plantas indicadoras (Figuras 7 y 8).
- Añadir aproximadamente 2 cm³ de solución tampón al mortero y triturar el material vegetal para la prueba (Figura 9).
- Empapar un hisopo de algodón o la yema del dedo en la savia y mojar todas las hojas de la planta indicadora (Figuras 10 y 11). Comenzar cada pasada desde el peciolo y terminar en el ápice de la hoja. Sostener la hoja con una toalla de papel. Evitar ejercer una presión excesiva.
- Inocular un "juego testigo" de plantas indicadoras con solución tampón pura.
- Inmediatamente después de la inoculación, lavar la savia en las hojas inoculadas rociándolas cuidadosamente con agua (Figura 12).
- Colocar las plantas inoculadas en el invernadero.
- Retirar todo el material empleado, limpiar la mesa y lavarse las manos antes de la siguiente prueba.



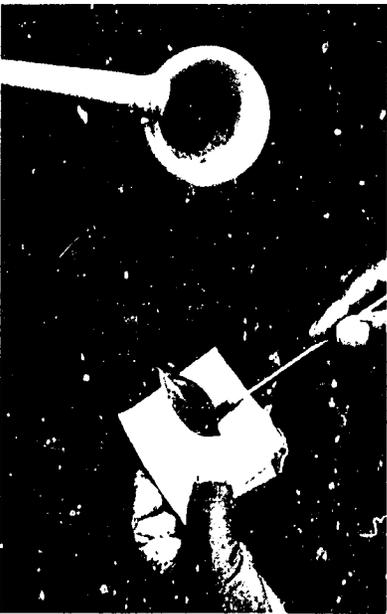
7



8



9



10



11



12

4 INJERTO

Todos los virus de papa, incluyendo los que no pueden transmitirse por inoculación mecánica o de savia, pueden ser fácilmente inoculados por injerto a las plantas indicadoras. Sin embargo,

- el donante y el recipiente deben ser compatibles;
- el virus debe ser sistémico en la planta indicadora.

Materiales:

- Cuchillo afilado de hoja delgada, hoja de afeitar nueva o bisturí.
- Líber (estera o rafia, ablandada con agua) o tiras de parafilm (1 x 3 cm).
- Palillos para apoyar las plantas.
- Bolsas plásticas (ligeramente más grandes que las plantas por injertar).
- Plantas indicadoras (recipiente, "stock"). Las plantas indicadoras empleadas para los injertos deben estar más maduras que las plantas usadas para la inoculación mecánica o por savia. El tallo de las plantas debe ser suficientemente fuerte y grueso para soportar el injerto.
- Material vegetal para la prueba (donante, "injerto").

Existen varios procedimientos para realizar el injerto. Para la detección de virus de papa, los procedimientos más comunes son:

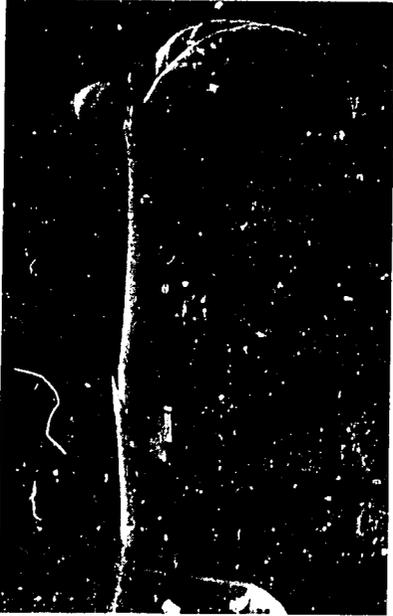
- injerto lateral, e
- injerto por aproximación.

Injerto lateral. Este tipo de injerto requiere que los hospedantes donante y recipiente sean muy compatibles.

Procedimiento:

- Retirar de la planta indicadora (recipiente o stock) la mayor parte de las hojas grandes. De ser necesario, apoyar la planta en un palillo.
- Hacer una incisión oblicua de 0.5 a 1 cm de profundidad hacia abajo en el tallo (Figuras 13 y 14).
- Escoger un brote tierno con una o dos hojas en el donante (injerto).
- Recortar el tallo del injerto y hacer una cuña de 0.5 a 1 cm de longitud (Figura 15).
- Insertar el injerto en la incisión y fijarlo con líber o parafilm (Figuras 16 y 17).
- Cubrir la planta injertada con una bolsa plástica húmeda (Figura 18).
- Colocar la planta en una zona fresca, a la sombra.
- Observar la planta todos los días, asegurándose de que la bolsa se mantenga húmeda.
- Después de tres o cuatro días, retirar la bolsa y colocar la planta en el invernadero.

Para el injerto lateral, se puede usar como injerto extremos apicales de tallos, hojas simples o pedazos de tubérculo.



13



14



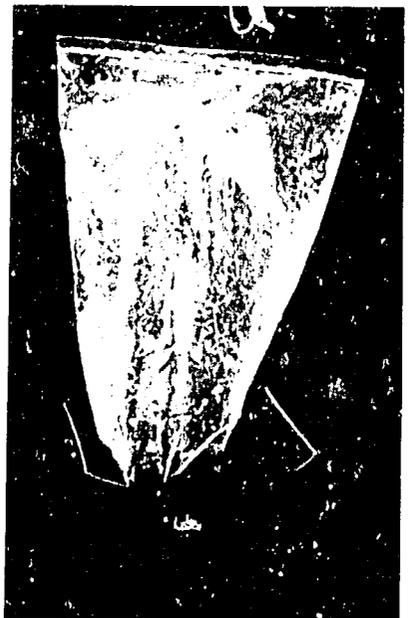
15



16



17



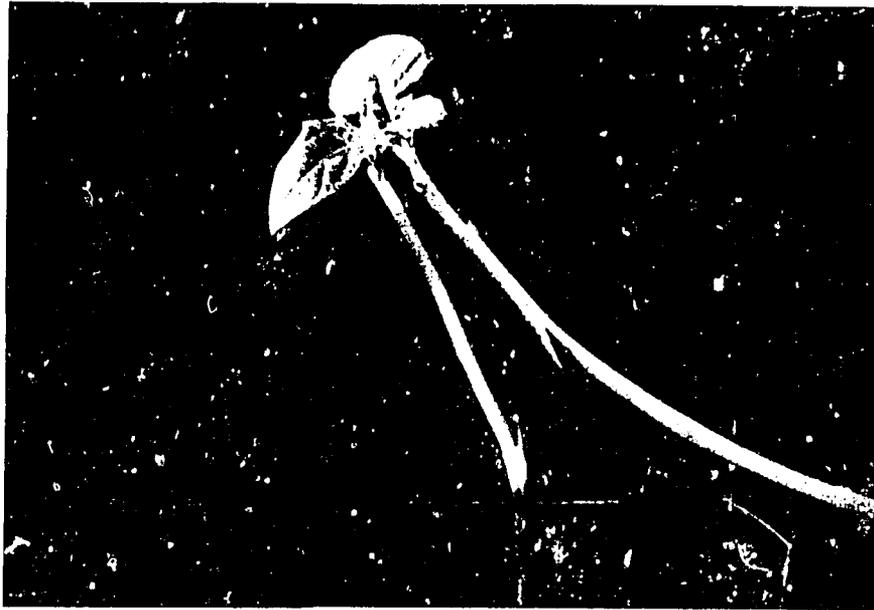
18

15

Injerto por aproximación. Se mantiene tanto el donante como el recipiente en sus propios sistemas de raíz. El injerto por aproximación es útil cuando las plantas no son compatibles para el injerto lateral.

Procedimiento:

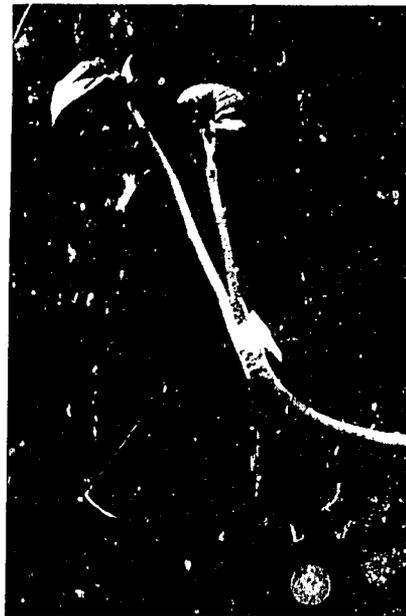
- En el tallo de la planta donante hacer una incisión oblicua descendente de 1 cm de profundidad a unos 4 ó 5 cm del suelo.
- A la misma altura, hacer una incisión descendente en el tallo de la planta indicadora (recipiente). Los tallos de ambas plantas deben tener el mismo grosor (Figura 19).
- Insertar el injerto en el recipiente y fijarlo con líber o parafilm (Figuras 20 y 21).
- Apoyar las plantas en estacas.



19



20



21

5 TRANSMISION POR VECTORES

Los áfidos son los vectores más importantes para la transmisión de virus a la papa. Los virus de la papa transmitidos por áfidos se pueden clasificar en dos grupos:

- no persistentes,
- persistentes.

Los virus no persistentes son adquiridos por el áfido después de unos pocos segundos de alimentación en una planta infectada. Pueden transmitirse a una planta sana en unos pocos segundos, un ejemplo es el PVY.

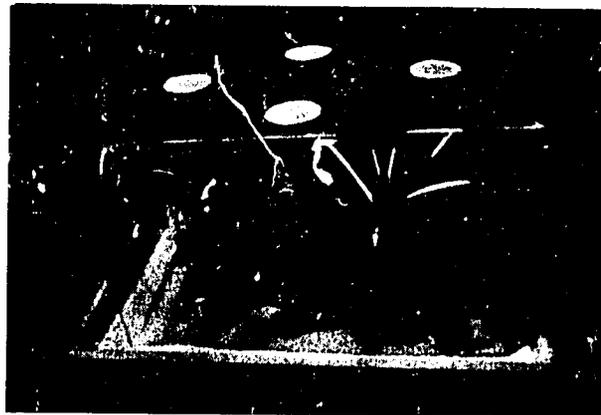
Los virus persistentes son adquiridos por el áfido después de alimentarse durante 20 a 30 minutos. Por lo general, el virus persistente tiene un periodo de latencia de horas a días en el áfido antes de que pueda ser transmitido a la planta sana. Para la transmisión se requiere nuevamente un periodo largo de alimentación. Un ejemplo es el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV).

Si se necesitan áfidos vectores con regularidad, se deben mantener colonias puras. Para su mantenimiento se pueden usar jaulas de 40 x 40 x 60 cm con marcos de madera cubiertos con una malla a prueba de áfidos (malla <0.3 mm; Figura 22).

Las jaulas también pueden hacerse con perspex transparente (40 x 25 x 25). Hacer huecos grandes en las paredes y el techo y cubrirlos con malla de nilón. Las jaulas de perspex no suelen tener piso. Colocarlas en bandejas de plástico o aluminio con arena. Humedecer la arena para regar las plantas de las jaulas.



22



23

El áfido vector de virus de papa más importante es *Myzus persicae*. Usar una lupa (10x) para identificar los áfidos.

- *Myzus persicae* normalmente coloniza las hojas maduras inferiores de la planta de papa.
- El color de los áfidos varía entre verde y melón; ocasionalmente los áfidos son translúcidos.
- El abdomen es ovalado (ovoide) y mide aproximadamente igual que la distancia del tórax a la base del cuernecillo.
- La cabeza tiene antenas con prominentes protuberancias orientadas hacia adentro.
- Las variedades aladas se distinguen por una mancha negra en el abdomen.

Crianza de áfidos libres de virus. Es fácil crear colonias de áfidos libres de virus gracias a que los adultos virulíferos no transmiten virus de papa a las ninfas.

- Tomar una hoja pequeña de col china (*Brassica pekinensis*) tierna y cubrir el extremo del peciolo con hilillos de algodón humedecido. Fijar el algodón con parafilm.
- Colocar la hoja en un plato petri plástico (14 cm de diámetro). De preferencia, abrir un hueco en la tapa y cubrirlo con un malla a prueba de áfidos. Observar la hoja diariamente y humedecer el algodón con agua destilada empleando una jeringa.
- Seleccionar en el campo una hoja de papa con áfidos alados. Si no se dispone de áfidos alados, usar adultos sin alas.
- Remover los áfidos tocando el abdomen con un pincel húmedo No. 0, de pelo de camello.
- Cuando los áfidos retraen sus estiletes y empiezan a moverse, transferirlos a la hoja de col. Tapar el plato petri.

-
- Con una lupa observar diariamente la hoja hasta que aparezcan los áfidos recién nacidos.
 - Transferir las ninfas a una hoja de col sana y colocar la planta en la jaula.

Después de tres a cuatro semanas y dependiendo de la temperatura, la planta de col china estará llena de áfidos avirulíferos.

La iluminación continua impide la formación de áfidos alados así como el buen crecimiento de la planta. Una iluminación de 16 horas permite un buen crecimiento de la planta y reduce la aparición de áfidos alados.

Problemas. La crianza de áfidos libres de virus puede dar lugar a diversos problemas.

Los insectos parásitos de los áfidos pueden controlarse empleando insecticidas específicos. Sin embargo, los insecticidas afectan el vigor de los áfidos por lo que es mejor tomar medidas preventivas. Observar las colonias con regularidad en busca de parásitos. Si es posible usar una malla doble en las jaulas y criar dos colonias paralelamente. Si una se llena de parásitos, todavía se puede salvar la otra (Figura 24).

Los hongos parásitos pueden volverse un problema cuando la humedad dentro de la jaula es muy alta. Regar las plantas cuidadosamente (Figura 25).

La melaza producida por los áfidos promueve el crecimiento de hongos saprofitos. El ennegrecimiento de la superficie de las hojas indica que se debe cambiar la colonia.

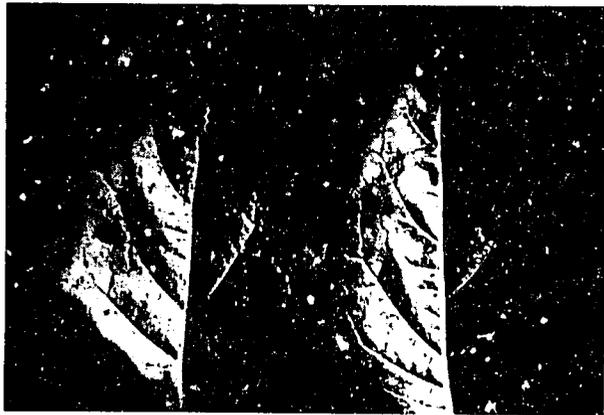
Los ácaros son de más difícil control. Aunque no atacan a los áfidos, la población de éstos tiende a disminuir. Empezar una nueva colonia después de desinfectar las jaulas y mesas con un acaricida apropiado (Figura 26).



24



25



26

Inoculación de plantas indicadoras. Para transmitir virus no persistentes o persistentes se pueden emplear los mismos materiales y procedimientos, con algunas pequeñas variaciones.

Materiales:

- Afidos ápteros avirulíferos (una hoja de la colonia de áfidos).
- Plato petri (14 cm de diámetro).
- Plantas indicadoras (plantas tiernas).
- Pincel de pelo de camello (No. 0), o cualquier pincel de pelo suave.
- Matraz con agua destilada.
- Papel de filtro en pedazos pequeños.
- Hoja del hospedante para la prueba.
- Matraces de plástico (250-500 cm³) con un hueco al fondo que se cubre con una malla a prueba de áfidos.

Procedimiento:

- Remover a los áfidos en la hoja de col con el pincel humedecido o soplándoles.
- Transferir los áfidos a un papel de filtro húmedo en el plato petri.
- Tapar el plato petri y mantenerlo durante una hora en un lugar fresco y sombreado para provocar el apetito de los áfidos.
- Colocar una hoja de la planta de prueba en otro plato petri y transferir los áfidos. Asegurarse de que los áfidos se alimenten de la planta.
- Si se trata de virus no persistentes, dejar que los áfidos se alimenten entre 2 y 10 minutos. Si se trata de virus persistentes, dejar que se alimenten entre 24 y 48 horas. La hoja se seca en 24 horas por lo que se debe usar hilillos húmedos de algodón para evitar el resecamiento.

-
- Transferir por lo menos 5 áfidos a cada planta indicadora.
 - Cubrir la planta indicadora con un matraz de plástico puesto boca abajo.
 - Si los virus no son persistentes, dejar que se alimenten durante 15 minutos. Los virus persistentes se alimentarán por 24 a 48 horas.
 - Eliminar los áfidos con un insecticida.
 - Colocar las plantas indicadoras inoculadas en el invernadero para el desarrollo de síntomas y su observación.

En todos los experimentos de transmisión de áfidos se debe emplear un control apropiado para distinguir los síntomas virales de los causados por otros factores. Alimentar un grupo de áfidos con plantas sanas y transferirlos a plantas indicadoras.

6 DESARROLLO DE SINTOMAS

Se debe observar diariamente el desarrollo de síntomas en las plantas inoculadas. La mayoría de los virus de papa producen síntomas inequívocos bajo condiciones de temperatura no demasiado elevada. La velocidad de aparición de los síntomas depende de la temperatura, luz y tipo de virus. Los síntomas se clasifican en dos categorías:

- Síntomas locales que se restringen al lugar de la inoculación (Figura 27).
- Síntomas sistémicos que aparecen también en hojas no inoculadas (Figura 28).

Algunos virus de papa producen sólo síntomas locales en ciertos hospedantes indicadores mientras que otros producen síntomas tanto locales como sistémicos (ver tabla).

Recomendamos mantener un aislamiento puro local de un virus para mayores estudios y para la serología como control positivo. Las plantas cultivadas en el campo normalmente se encuentran infectadas por más de un virus. Seguir las indicaciones que aparecen en las Figuras 29 a 31 para separar los virus y producir cultivos puros.



27



28

26

Figura 29. Separación de PVX y PLRV de una planta con infección combinada.

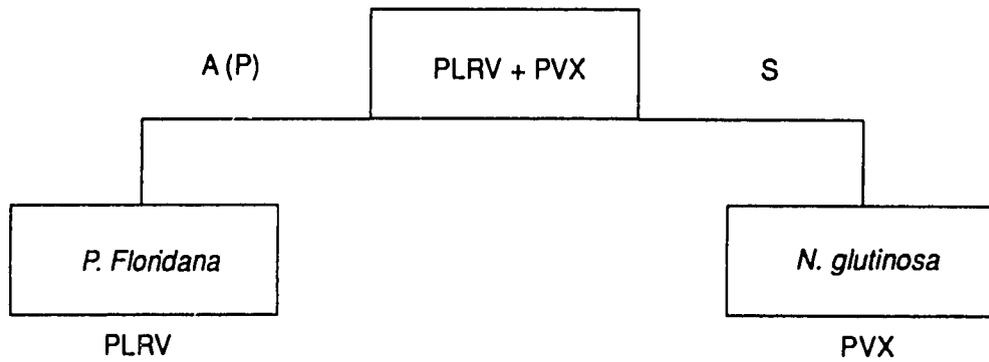


Figura 30. Separación de PVY y PLRV de una planta con infección combinada con PVY y PLRV.

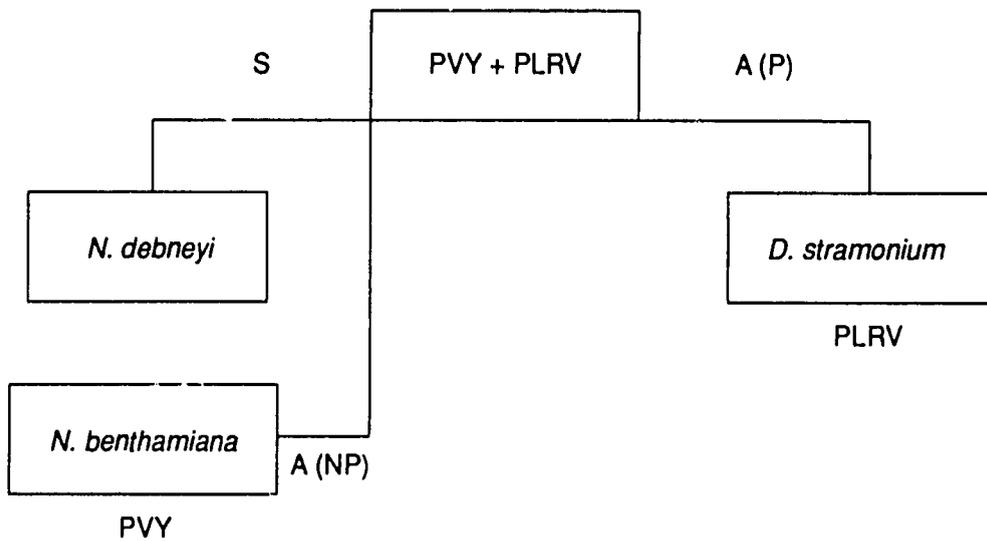
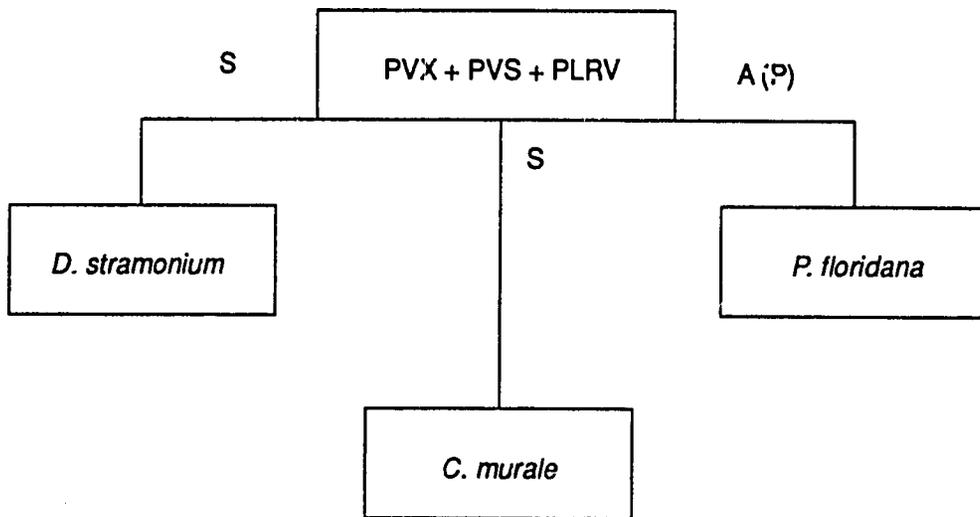


Figura 31. Separación de PVX, PVS y PLRV de una planta con infección combinada de PVX, PVS y PLRV.



Usar hojas con infección sistémica de PVS

- A (P) = Afdos persistentes *M. persicae*
- A (NP) = Afdos no-persistentes
- S = Transmisión de savia

7 BIBLIOGRAFIA

- HOOKER, W. J. 1982. Virus diseases of potato. Technical Information Bulletin 19. International Potato Center, Lima, Peru. 17 pp.
- RAMAN, K. V. 1985. Transmission of potato viruses by aphids. Technical Information Bulletin 2. International Potato Center, Lima, Peru. 23 pp.
- SALAZAR, L. F. 1982. Virus detection in potato seed production. Technical Information Bulletin 18. International Potato Center, Lima, Peru. 14 pp.
- NORDHAM, D. 1973. Identification of plant viruses. Methods and experiments. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. 204 p.