



INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS



INIA
El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, es un instituto autónomo, adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras, dedicado a la investigación agrícola, desarrollo tecnológico, asesoramiento y prestación de servicios especializados. Dirección: Sede Administrativa: Av. Universidad, vía El Limón, Maracay, Estado Aragua. Teléfono: 0243.2404770. www.inia.gob.ve.

MANEJO Y PROCESAMIENTO DE
MUESTRAS FOLIARES DE PAPA
CON SÍNTOMAS DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO
DE VENAS, PARA DIAGNÓSTICO POR RT-PCR.

MARTHA OSORIO
ALEXIS MARQUES

Virus del amarillamiento de venas

El virus del amarillamiento de las venas de papa o Potato yellow vein virus (PYVV) pertenece al género Crinivirus, familia Closteroviridae y es específico de países andinos como Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela. Es un problema importante debido a que ocasiona pérdidas en la producción de papa al causar reducción en el número y tamaño de los tubérculos. El diagnóstico del virus se ha basado en la expresión de síntomas, sin embargo, éste puede ser impreciso debido a que en algunos casos el virus puede infectar en forma latente y asintomática a las plantas y el serológico se ha dificultado por la inexistencia de estuches comerciales disponibles. El diagnóstico molecular a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa o RT-PCR, por sus siglas en inglés, es el más sensible y preciso para determinar infección con PYVV en el cultivo de papa, por lo que se convierte en una herramienta de suma importancia para el monitoreo epidemiológico y para evitar la dispersión del virus (Salazar, 1998; Salazar et al., 2000; Livieratos et al., 2004; Dolja et al., 2006; Cubillos, 2011; Guzmán-Barney et al, 2013).



Selección y colecta de muestras para el diagnóstico del PYVV

La selección de las muestras para el diagnóstico del PYVV se apoya en la observación de los síntomas, éstos se manifiestan durante la etapa inicial de la enfermedad como pequeños puntos amarillos que aparecen en los bordes de la lámina foliar, posteriormente aumentan en número y tamaño hasta juntarse dejando las venas de color amarillento y los espacios intervenales de color verde. (Figura 1).



Figura 1. Síntomas ocasionados por PYVV. a.- pequeños puntos amarillos en los bordes de las hojas. b.- venas amarillas y espacios intervenales verdes. c.- clorosis de las hojas. Fuente: Osorio, M. 2014; Franco-Lara et al. 2009.

Cuando el ataque es muy severo y la variedad susceptible, el amarillamiento invade la totalidad de la hoja. La decoloración va desde amarillo intenso al principio, hasta claro y opaco al final del cultivo (Figura 2) (Zapata et al, 2004; Franco-Lara et al, 2009)



Figura 2. a.- el amarillamiento invade la totalidad de la hoja. b.- hojas de color amarillo opaco. Fuente: Osorio, M. 2014.

Para la colecta de muestras sintomáticas de PYVV, se deben utilizar guantes de látex o cubrir las manos con bolsas plásticas con el fin de que no haya contacto directo con la muestra, éstos deben desinfectarse cada vez que se vaya a colectar una nueva muestra para evitar la contaminación.

Registro de datos y traslado de muestras

En cada muestra que se colecte, con síntomas de PYVV o de otros virus, se debe adjuntar una etiqueta hecha preferiblemente con lápiz de grafito, con un registro de datos que comprende:

- Nombre del colector.
- Fecha de colecta.
- Cultivar.
- Edad de la planta.
- Tipo de plantación (campo, semillero, invernadero u otro).
- Tamaño de la plantación.
- Ubicación (localidad, municipio, estado, población más cercana al lugar de colecta).
- Número de plantas.
- Fuente de la semilla (artesanal o certificada).
- Distribución de las plantas afectadas y algún otro dato que se estime conveniente.

Para el traslado de las muestras se debe considerar la distancia existente entre los sitios de colecta y el lugar donde se harán los análisis. Si las muestras van a ser trasladadas a corta distancia y pueden llegar el mismo día al laboratorio donde se ejecutaran las pruebas de diagnóstico, éstas deben ser envueltas, completamente extendidas, en papel absorbente humedecido e introducidas en bolsas plásticas y luego colocadas en cavas con hielo. Cuando van a ser transportadas a mayores distancias y su traslado va a durar más de un día, se realiza el tratamiento anterior pero se sustituye el hielo tradicional por gel refrigerante o hielo seco, colocando un aislante (papel periódico) entre el gel y las muestras para evitar dañarlas.

Extracción del ARN

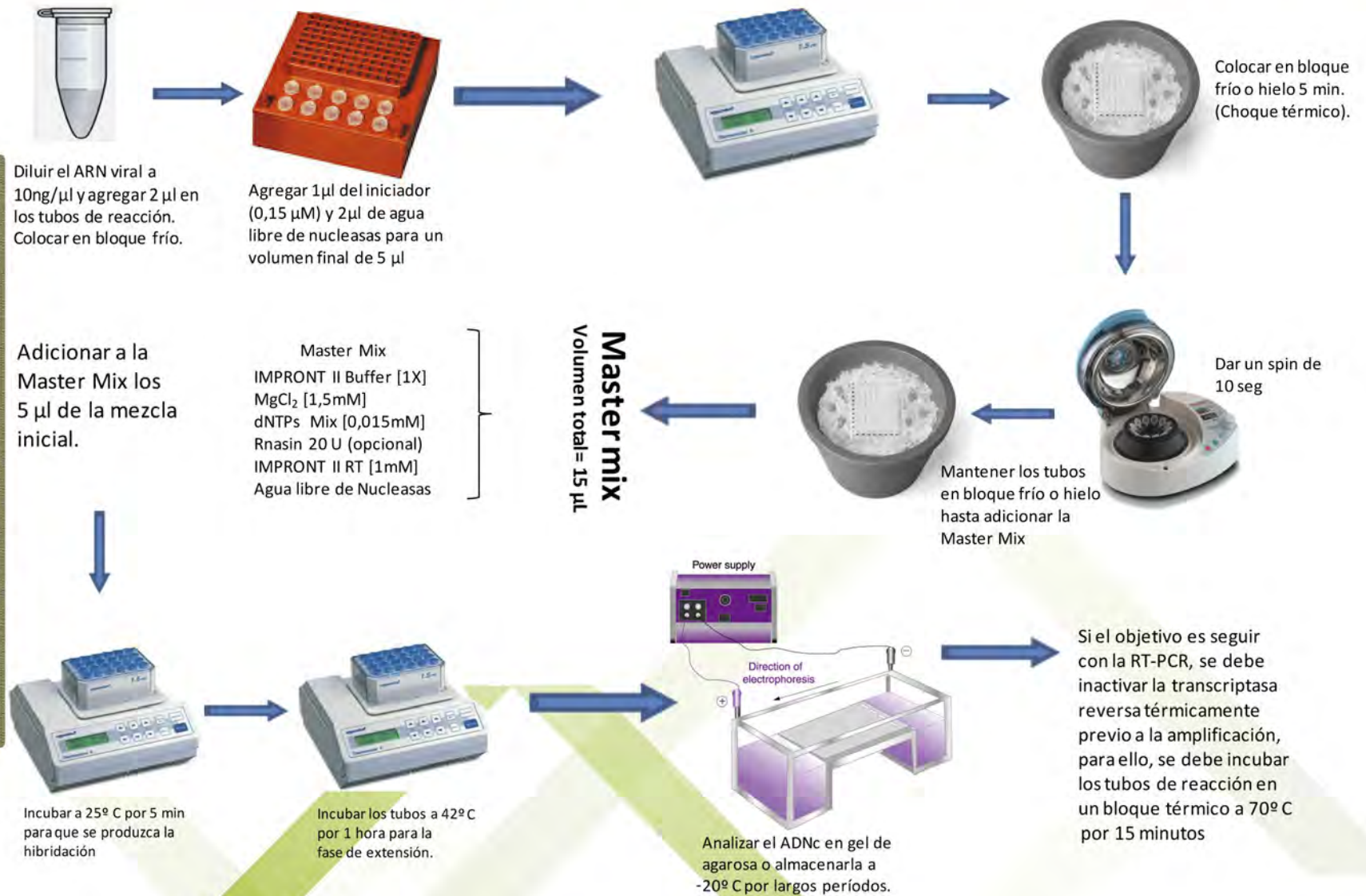
Existen numerosos estuches comerciales para la extracción del ARN viral de muestras de plantas sintomáticas, la selección dependerá de la disponibilidad en el mercado. Aquí se describe el protocolo de extracción del estuche RNeasy Plant Mini de QUIAGEN (Figura 3), con una modificación en la fase inicial del proceso de extracción, donde se incorporó la ultracongelación del tejido foliar a -60°C , previa a su pulverización con Nitrógeno líquido (NL2), y metabisulfito de sodio, a razón de $0,05\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido, durante el macerado de la muestra para evitar oxidación y mejorar la calidad del ARN.



Figura 3. Protocolo de extracción y purificación del ARN de plantas con síntomas de PYVV, utilizando el estuche RNeasy Plant Mini de QUIAGEN.

Proceso de la transcripción reversa (RT)

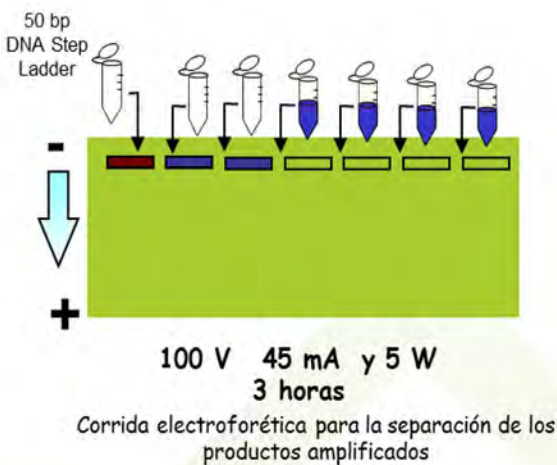
Después de la extracción del ARN de los aislados, se hace la transcripción reversa (RT) con el fin de obtener los ADN complementarios (ADNc) que se emplean en las reacciones de RT-PCR. Al igual que para el proceso de extracción del ARN, la selección del sistema para la transcripción reversa dependerá de la disponibilidad en el mercado, aquí se describe, de manera esquemática, el protocolo del estuche ImPron-II Reverse Transcription System de Promega® (Figura 4).



Proceso de la transcripción reversa (RT)

Figura 4. Proceso de la transcripción reversa del ARN de PYVV, utilizando el estuche ImPron-II Reverse Transcription System de Promega®.

Esquema del Proceso de la RT-PCR



Esquema del Proceso de la RT-PCR



PERFIL TÉRMICO PARA LOS GENES CP y CPm

PROGRAMA	TEMPERATURA Y TIEMPO	Nº DE CICLOS
Desnaturalización inicial	94° C por cinco minutos	
Desnaturalización	94° C por un minuto	35 Ciclos
Acoplamiento o hibridación	52° C por un minuto	
Extensión	72° C por un minuto	
Extensión Final	72° C por 10 minutos	

Figura 5. Proceso de RT-PCR con los aislados del PYVV, utilizando iniciadores específicos para CP y CPm.

Proceso de la RT-PCR

La reacción de amplificación para la RT-PCR consiste en: 1X de Buffer (Promega®), 1mM de MgCl₂ (Promega®), 0,2mM de dNTPs (Promega®), 0,2 μM de iniciadores específicos para los genes de las proteínas mayor (CP) (Forward 5'ATGGAAATCCGATCGTGGAAACCT 3' Reverse 3'CTACTCAATAGATCCTGCTA 5') y menor de la capsida (CPm) (CPm Forward 5'GACCGCCGACTTGTTGAATT 3' Reverse 3'TTGCTGCATTCTTGAACAGGTAA 5'), (Eurogentec®), 0,4U de Taq Polimerasa GoTaq flexi (Promega®) y 20 ng de ADNc. La mezcla de amplificación se coloca en un termociclador para cumplir un perfil de temperatura que inicia con un paso de desnaturalización a 94° C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de reacción (94° C de desnaturalización por un min, 52° C de anillamiento de los cebadores por un min y 72° C de extensión por un min), para luego cumplir una fase final de extensión de 72° C por 10 min (Figura 5). La amplificación de cada gen se realiza en reacciones separadas para cada aislamiento (Osorio, M. 2014).

Los productos obtenidos de la RT-PCR, se analizan en gel de agarosa 2,5% en buffer TBE 0,5X, teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen) y se utiliza como patrón de peso molecular marcadores de 50 y 100 pb (Promega®). La corrida electroforética se realiza a 100 voltios y 40 mA durante dos horas.

Finalmente se realiza la fotodocumentación del gel en un digitalizador de imágenes, para la identificación o diagnóstico del PYVV (Figura 6).



Figura 6. RT-PCR de seis aislados PYVV venezolanos. Izquierda: Marcador de 50 pb (Promega®) y los aislados amplificados con el Gen CP, Derecha: aislados amplificados con el Gen CPm y el marcador 100 pb (Promega®).

Referencias bibliográficas

Cubillos, K. (2011). Determinación de variantes del virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de papa (PYVV) por análisis molecular de tres genes en aislados colombianos de *Solanum* spp. Trabajo de grado para optar al título de maestría en ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

Dolja, V.V., Kreuzer, J., Valkonen, J. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research*, 117, 38-51.

Franco-Lara, L., Rodríguez, D., Guzmán, M. (2009). Determination of the prevalence of Potato yellow vein virus in crops of *Solanum phureja* by symptom detection and molecular methods. Ponencia en la APS Annual Meeting, Portland, Oregon. *Phytopathology* 99:S36.

Guzmán-Barney, M., Hernández, A., Franco-Lara, L. (2013). Tracking Foliar Symptoms Caused by Tuber-Borne Potato Yellow Vein Virus (PYVV) in *Solanum Phureja* (Juz et Buk) Cultivar "Criolla Colombia". *American Journal of Potato Research*, 90, 284-293.

Livieratos, I.C., Eliasco, E., Muller, G., Olsthoorn, R.C.L., Salazar, L.F., Pleij, C.W.A., Coutts, R.H.A. (2004). Analysis of the RNA of Potato yellow vein virus: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus *Crinivirus*. *J. Gen. Virol*, 85, 2065-2075.

Osorio, M. (2014). Diagnóstico y variabilidad de aislados del virus PYVV como apoyo al programa de certificación de semilla de papa en Venezuela. Trabajo de grado para optar al título de Doctora en Biotecnología Agrícola, mención vegetal. Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT), Maracay, Venezuela.

Salazar, L.F. (1998). Technology Development for Control of Yellow Vein Disease in Colombia. Final Technical Report. International Potato Center. 35p

Salazar, L.F., Muller, G., Querci, M., Zapata, J.L., Owens, R.A. (2000). Potato yellow vein virus: its host range, distribution in South America and identification as a crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*, 137(1), 7-19.

Zapata, J.L. (2004). Algunos aspectos sobre los virus de la papa en Colombia. Trabajo presentado en el "I Taller Nacional sobre patógenos del suelo, virus e insectos plaga diferentes a *Tecia solanivora*", realizado en Bogotá, Colombia del 29 al 30 Noviembre de 2004. Centro virtual de investigación de la cadena agroalimentaria de la papa CEVIP AP A.