



Detección del virus Y de la papa variante ntn (PVY^{ntn}) mediante RT-PCR en plantaciones del estado de Nuevo León, México

CÉSAR ENRIQUE GUERRERO GÁMEZ*, HAZAEL GUTIÉRREZ MAULEÓN*, OMAR GUADALUPE ALVARADO GÓMEZ*, JOSUÉ LEOS MARTÍNEZ*, AURORA GARZA ZÚÑIGA*, LUIS ÁNGEL VILLARREAL GARCÍA*

En el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), uno de los más importantes de la república mexicana, la Confederación de Productores de Papa de México (CONAPAPA) reportó, en 2001, una superficie de 65,000 ha sembradas. De la inversión total, aproximadamente 17% (cerca de 85 millones de dólares americanos) se destina a la adquisición de tubérculo que se usará para semilla; por tal motivo, los daños o pérdidas que inciden directamente en la semilla son realmente desastrosos.¹

En Nuevo León se siembran alrededor de 3,867 ha de papa que representan una importante fuente de ingreso. El rendimiento promedio de la región es de 30 a 35 toneladas por hectárea, lo cual supera la media nacional, que es de 20 a 22 toneladas.²

Un factor importante que limita el rendimiento del cultivo es la ocurrencia de enfermedades: las de naturaleza viral limitan la introducción de semilla al país y producción de la papa, ya que disminuyen la calidad y el rendimiento del tubérculo que se utiliza para semilla y para consumo fresco o industria. Entre las enfermedades virales, el virus Y de la papa (PVY) es uno de los más frecuentes y problemáticos, ya que causa mosaicos severos en la planta, flacidez de las hojas y

grandes lesiones necróticas en las nervaduras, con pérdidas consecuentes que van de 10 a 80% del rendimiento.³⁻⁷

El ensayo de inmunoadsorción de enzimas ligadas (ELISA) es el método rutinario de diagnóstico de PVY. Además, con la utilización de anticuerpos monoclonales se pueden diferenciar algunas de las variantes de este virus. Sin embargo, la variante NTN, que recientemente se ha detectado en algunos países de Europa, no se ha podido diferenciar de la raza necrótica debido a la similitud de la cubierta proteica en ambas, por lo tanto, con la utilización de técnicas moleculares, como la RT-PCR, se ha distinguido la variante NTN de los otros miembros del grupo PVY-n.⁸⁻¹⁰

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue implementar la técnica RT-PCR para la detección de la variante NTN y determinar su ocurrencia en plantaciones comerciales de papa en Nuevo León.

Materiales y métodos

Se llevaron a cabo colectas de plantas de papa en tres lotes comerciales localizados en el ejido San Joaquín, Galeana, N.L., durante verano-otoño de 2004 y primavera-verano de 2005. En cada muestreo se tomaron, al zar, diez muestras de plantas

* Facultad de Agronomía de la UANL.

en desarrollo vegetativo. Todas las plantas colectadas pertenecían a la variedad Mondial. Al finalizar el ciclo de 2004 se colectaron tubérculos en la cosecha y se tomó una muestra al azar de 400. Los tejidos utilizados para la extracción de ácidos nucleicos fueron: foliolos, brotes y estolones de tubérculos. La obtención de RNA fue mediante el método comercial Trizol Reagent^{MR}, de la compañía Molecular Research Center, además del Chomczynski y Sacchi.¹¹ El método Trizol Reagent^{MR} consiste en lo siguiente: se pesaron de 100 a 200 mg de muestra y se adicionó 1ml del reactivo Tri Reagent^{MR} en un mortero y se homogenizó con el pistilo; ya homogenizada la muestra se transfirió a un tubo de centrifuga de 1.5 ml, y se incubó a 5 min a temperatura ambiente; después se centrifugó a 12,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.

Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezclaron en vórtex 15 seg y se incubaron de 2 a 3 min; luego se centrifugaron nuevamente a 12,000 rpm, durante 15 min, y se transfirieron de la fase acuosa a otro tubo nuevo.

Se precipitaron los ácidos nucleicos, con 500 µl de isopropanol frío, y se incubaron por 10 min a -20°C, se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min, se decantó y se agregó 1 ml de etanol frío a 70% para lavar el ácido nucleico, se mezcló con vórtex y centrifugándolo a 7,500 rpm durante 5 min, posteriormente se eliminó la fase acuosa.

Se dejó secar la pastilla por inversión y se resuspendió el ácido nucleico en 20-30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) incubando después a 55-60°C durante 10 min. Cuando el RNA no se utilizó inmediatamente, se almacenó a -20°C hasta su uso.¹²

Se evaluaron los iniciadores específicos para PVY^{NTN} descritos por Weilguny y Singh: antisentido 1, antisentido 3 y sentido 4, y los reportados por Moravec *et al.*: Mor 1, Mor 2 y Mor 3; además se utilizaron los iniciadores S4 y antisentido propuestos por Nie y Singh para diferenciar PVYN de las otras variantes (PVYC, PVY⁰).¹³⁻¹⁶

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en forma discontinua, en un volumen de 20 µl con los siguientes componentes: 8 µl de RNA total y 2 µl del iniciador antisentido, 4 µl de buffer de reverso transcripción 5X Promega^{MR} (200 mM Tris HCl pH 7.5, 30 mM MgCl₂ 10 mM spermidine, 50 mM NaCl) 2 µl dNTP's 10 mM (Promega MR), 0.125 µl de RNAsin (40 U/µl Promega^{MR}), 0.5 µl de M-MLV reverso transcriptasa de 200 U/µl (Promega^{MR}), 6.375 µl de agua. Para la PCR se preparó una mezcla de reacción a 25 µl, la cual contenía: 2.5 µl de buffer 10X (NH₄), 1 µl MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl dNTP's 10 mM, 2.5 µl primer antisentido 3 (10 pmoles), 2.5 µl primer sentido 4 (10 pmoles), 0.25 µl Taq Polimerasa 5 U/µl y 12.75 µl de agua MiliQ estéril. Los programas térmicos utilizados fueron: 92-50-740C por 60-40-40 seg, por 34 ciclos para NTN y S4/Ant, además de 92-54-740C por 60-60-60 seg por 34 ciclos para los iniciadores Mor.¹⁷⁻¹⁸

Resultados y discusión

Al comparar los métodos se observó que ambos fueron eficientes para la extracción de ácido ribonucleico, aunque el método comercial a base de Trizol Reagent^{MR} mostró mayor concentración de RNA que el método de Chomczynski y Sacchi.¹¹ Se observó una mayor intensidad de las bandas, que corresponden a RNA obtenido de brote de tubérculo y foliolo (figura 1).

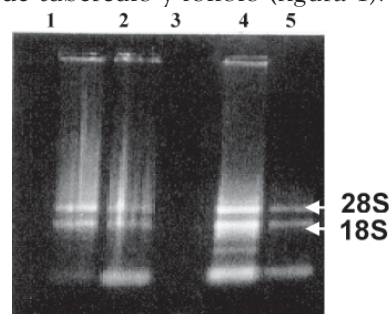


Fig. 1. Comparación de calidad de ácido ribonucleico en tejido vegetal mediante el método comercial Trizol Reagent^{MR}. RNA, obtenido a partir de brotes de tubérculo con el método de extracción comercial Trizol Reagent^{MR} carriles 1 y 4 hojas; 2 y 5 brotes de tubérculo. La flecha indica los ácidos ribonucleicos ribosomales 28S y 18S.

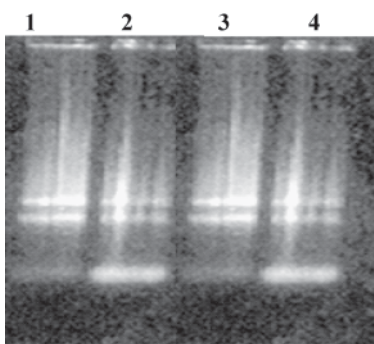


Fig. 2. Comparación de calidad de ácido ribonucleico en tejido vegetal mediante el método Chomczynski y Sacchi (1987). Carril 1-4 RNA Ribosomal.

En la figura 2, las bandas correspondientes al RNA ribosomal se observan con cierta degradación.

Con respecto a la calidad de RNA, al utilizar el método de Chomczynski y Sacchi,¹¹ se visualiza un barrido en el gel asociado con una degradación de ácidos nucleicos, a diferencia del método comercial (figura 1) donde las bandas de RNA presentan menos degradación.

Los juegos de iniciadores evaluados mostraron efectividad para la amplificación del cDNA del virus PVY, ^{NTN} las amplificaciones que muestran son nítidas y con muy buena intensidad, los resultados de los iniciadores fueron muy consistentes y reproducibles.

Con el juego de iniciadores Anti1/Sen3 y Anti1/Sen4 se obtienen bandas de 388 a 416 pb, respectivamente, con el programa térmico 92-50-74°C por 60-40-40 seg por 34 ciclos (figura 3), los fragmentos esperados con el programa térmico utilizado fueron los adecuados.¹³

Al amplificar el cDNA, con los iniciadores Mor1/Mor2/Mor3, se observan dos bandas de diferente peso molecular: una a 334 pb y otra de 569 pb, y en esta última se observa más tenue, con el programa 92-54-74°C por 60-60-60 seg durante 34 ciclos (figura 4). Sin embargo, la detección del virus con estos iniciadores no solamente detecta la variante relacionada con el PTNRD, ya que éstos también detectan variantes y aislados que no son tan virulentos, debido a las recombinaciones que ha sufrido el virus en su genoma con

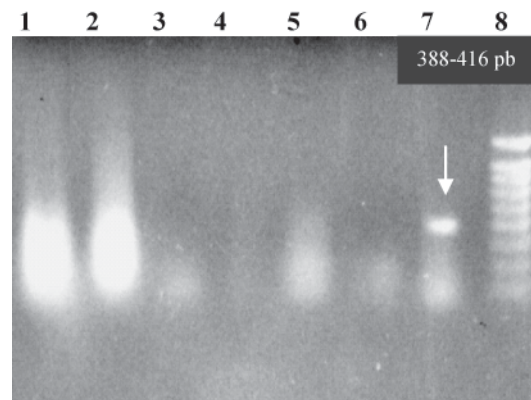


Fig. 3. RT-PCR con los iniciadores anti1/anti3/sen4. Carriles 1-6 muestras; carril 7 control positivo; carril 8 marcador de peso molecular Ladder 100.

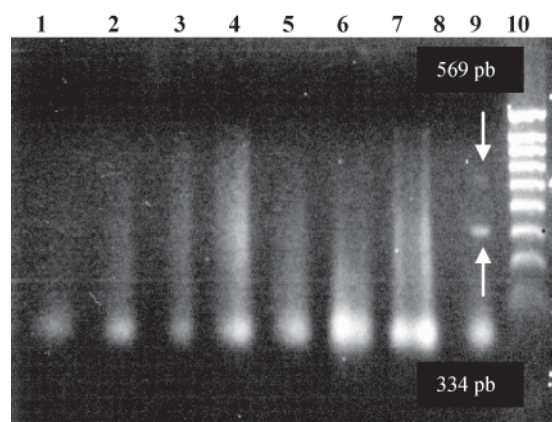


Fig. 4. RT-PCR con los iniciadores Mor1/Mor2/Mor3. Carriles del 1-7 muestras de problema, carril 8 control (-), carril 9 control (+), carril 10 Marcador de Peso Molecular Ladder 100.

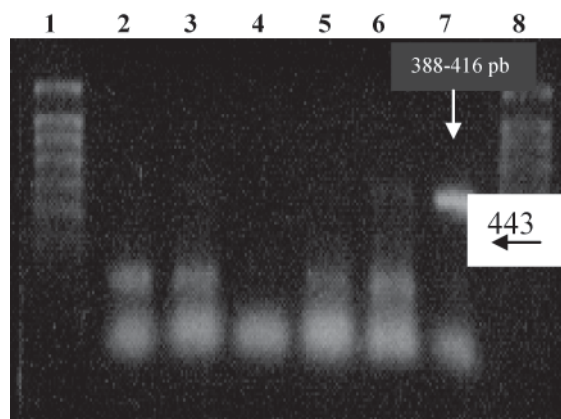


Fig. 5. RT-PCR con los iniciadores S4/Ant. Los carriles 1 y 8 marcador de peso molecular Ladder 100, carriles 2-5 muestras, carril 6 control (-), carril 7 control (+).

otras variantes del PVY y a que la diferencia entre la variante y los otros aislados de PVY es sólo en una base en la posición 8611 del genoma, donde el PVYNTN tiene una G en esta posición y los demás aislados tienen una A, siendo designados los iniciadores a la región de la cápside y a la región N1b del genoma del virus.^{14,20-21}

Para los iniciadores S4/Ant se obtiene una banda de 443 con el programa térmico 92-50-74°C por 60-40-40 seg por 34 ciclos, siendo éstos para la amplificación del PVYn (figura 5).

Con respecto a los resultados de incidencia del virus en la semilla de origen nacional, se evaluaron 40 submuestras que correspondían al lote 1, de las cuales se detectaron 10 submuestras positivas, donde cada submuestra estaba compuesta de diez tubérculos, con una incidencia de 25%. Las muestras positivas detectadas procedían de San Joaquín, Galeana, Nuevo León, de la variedad Mondial. Lo anterior representa uno de los primeros reportes de la ocurrencia de PVYn en Nuevo León, ya que existen reportes recientes sobre el mismo virus en semillas y plantaciones en Canadá, Japón y otros países.²²⁻²⁷

Conclusiones

Como resultado del trabajo experimental de campo, bodega y laboratorio se obtuvo un protocolo basado en la transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa para una detección eficiente del virus Y de la papa variante NTN. Además, se determinó la incidencia de la variante n del virus Y en semilla nacional con las siguientes conclusiones específicas:

El método comercial Trizol Reagent es efectivo para la obtención de RNA. Los tres juegos de iniciadores utilizados Anti 1/Anti 3/Sen 4, y Mor 1/Mor 2/Mor 3 fueron efectivos en la detección del virus PVY^{ntn}; la sensibilidad de la técnica para la detección de PVY^{ntn} en muestras compuestas hasta por 25 tubérculos fue la esperada. De acuerdo con los análisis realizados, se estima que para el periodo 2004-2005 en las áreas muestreadas, el

porcentaje de incidencia del virus PVYⁿ en semilla de origen nacional fue de 25%.

Resumen

Para el diagnóstico del virus Y de la papa (PVY), se ha utilizado la técnica serológica ELISA, pero es imposible diferenciar la variante PVYNTN de la PVYn debido a la similitud entre éstas. El presente trabajo pretendió establecer una metodología eficiente para la detección del Potyvirus Y raza NTN, mediante la técnica RT-PCR, así como determinar la ocurrencia de esta enfermedad en cultivos comerciales en el estado de Nuevo León. Se emplearon diferentes primers (anti 1/ anti 3/ sen 4 ; Mor 1/ Mor 2/ Mor 3 y Antisense/S4) donde el primer juego resultó homólogo a la región P1, y el segundo a la región NIa, N1b y el CP del genoma del virus. Como resultado de este experimento se desarrolló un protocolo confiable y efectivo para la detección y diferenciación de las variantes del virus Y de la papa (PVY). Los tres juegos de primers resultaron efectivos para la detección de la variante PVYNTN. Además, se determinó una incidencia de 25% de la variante PVYn en semilla de origen nacional.

Palabras clave: Solanum tuberosum, RT-PCR, PVY^{ntn}.

Abstract

The ELISA serologic technique has been utilized for the diagnostic of Potato virus Y (PVY), however it is impossible to differentiate the PVY^{NTN} from PVYⁿ strain due to the similarity between them. The present work intended to establish an efficient methodology for detection of Potyvirus Y strain NTN (PVY^{NTN}) by the RT-PCR technique, as well as determining the occurrence of this disease in commercial fields in the State of Nuevo Leon. Different primers (anti 1/ anti 3/ sen 4 ; Mor 1/ Mor 2/ Mor 3 and Antisense/S4) were used, where the first set was homologous to re-

gion P1 and the second to region NIa, Nib, and CP of the virus genome. As a result of this experiment, a reliable and effective protocol for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detection and strain differentiation of Potato virus Y (PVY) was developed. All three primer sets were effective for detecting PVY^{NTN}. Also, an incidence of about 25% of PVY-n strain was determined on national seeds.

Key words: *Solanum tuberosum*, RT-PCR, PVY^{ntn}.

Agradecimientos

Al Paicyt-UANL, por su apoyo financiero para la realización de este estudio.

Referencias

- Guerrero G., C.E. 2005. Detección del Virus Y de la papa y de la variante NTN (PVYNTN) mediante la Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en cargamentos internacionales de papa y plantaciones comerciales del estado de Nuevo León. Tesis de licenciatura. Facultad de Agronomía, UANL. Marín, N. L. 35 p.
- Barreiro P., M. 1998. La papa en México, un cultivo con potencialidad. Claridades Agropecuarias. No. 57: 3-5.
- Agrios G. N. 1996. Fitopatología. Segunda edición. Ed. Limusa. 838 p.
- Beczner, L., J. Horvarth, I. Romhanyi y H. Forster. 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. Potato Res. 27: 339-352.
- De Bokx, J. A. 1972. Viruses of potato and seed potato production. Pudoc, Wageningen, Holland.
- Zúñiga L., L., Cadena H., M., Molina G., J. y Rivera P., A. 1999. Resistencia genética a los virus X y Y (PVX y PVY) de la papa. Agrociencia 33: 389-396.
- Salazar, L. F. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa. p. 256.
- Aloisi, R.M. 1979. Principles of immunodiagnosics. The C. V. Morby Co., Londres. Pág. 172.
- SAGARPA, Dirección General de Sanidad Vegetal, CNSA, Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario. Pp. 1-18.
- Salazar, L.F. 1979. Aplicación de la técnica serológica con conjugados enzimáticos (ELISA) para diagnosticar virus de la papa. Fitopatología 14-19.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry 162:156-159.
- Sambrook, J. and Russell. 2005. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Vol. 2. Third Edition. Edit. CSHL-PRESS. Chapter 8.
- Weilguny, H. and Singh, R.P. 1998. Separation of Slovenian isolates of PVYntn from the North American isolates of PVYn by a 3-primer PCR. J. Virol. Methods. 71: 57-68.
- Moravec, T., Cerovská, N. and Boonham, N. 2003. The Detection of recombinant, tuber necrotizing isolates of potato virus Y (PVYntn) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. Journal of Virological Methods. 109: 63-68.
- Nie, X. and R.P. Singh. 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. J. Virol Methods 104:41-54.
- Singh, R.P, Singh, M., McDonald, J.G., 1998. Screening by a 3-primer PCR of North American PVYN isolates for European-type members of the tuber necrosis-inducing PVYNTN subgroup. Can. J. Plant Pathol. 20, 227-23.
- Henson, J.M. and French R. 1993. The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease

- Diagnosis. Annu. Rev. Phytopathology. 31: 81-109.
18. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Toffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerasa. Science 239: 487-491.
 19. Hernández de la Cruz M. 2004. Detección serológica y molecular del virus PVYn y PVYntn en Solanum tuberosum L. y hospedantes alternos en Jalisco, México. Memorias del Congreso de Fitopatología. Isla del Padre, Texas, EUA. Resumen L-99.
 20. McDonald, J.G. and Singh, R.P., 1996. Host range, symptomology and serology of isolates of potato virus Y (PVY) that shared properties with both the PVYN and PVYO strain groups. Am. Potato J. 73, 309-315.
 21. Ohshima, K., Sako, K., Hiraishi, C., Nakagawa, A., Matsuo, K., Ogawa, T., Shikata, E. and Sako, N. 2000. Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease Occurring in Japan: Its Association with Potato Virus Y Necrotic Strain. Plant Dis. 84: 1109-1115.
 22. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). 1988. Normas NAPPO sobre medidas fitosanitarias. Requisitos para la importación de papas hacia un país miembro de NAPPO. Ontario, Canadá. 28 p.
 23. Ramírez Rodríguez, V. R. 2001. Detección del Virus PVYntn en Tubérculos de papa (Solanum tuberosum L.) Provenientes de Canadá, Mediante RT-PCR. Memorias del Congreso Nacional de Fitopatología, Querétaro, México. F-87.
 24. Sing, R.P. 1992. Incidence of the tobacco vein necrotic strain of potato virus Y (PVYn) in Canada in 1990 and 1991 scientific basis for eradication of disease. Can. Plant Dis Surv. 72: 113-119.
 25. Van den Heuvel, J.F.J.M., Van der Vlugt, R.A.A., Verbeek, M., DeHaan, P.T., Huttinga, H., 1994. Characterization of a resistance-breaking isolate of potato virus Y causing potato tuber necrotic ringspot disease. Eur. J. Plant Pathology. 100, 347-356.
 26. Weidemann, H.L. 1988. Importance and control of potato virus YN (PVYN) in seed potato production. Potato Res. 31, 85-94.
 27. Weidemann, H. L. and Maiss, E., 1996. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVYNTN) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. J. Plant Dis. Protect. 103, 337-345.

Recibido: 24 de agosto de 2007

Aceptado: 10 de enero de 2008