

Detección de los principales virus en brotes de tubérculos y vitroplantas de papa por la técnica DAS-ELISA

Detection of major viruses in potato tubers-sprouts and plantlets by DAS-ELISA technique

Eglys Pichardo¹, Belkis Camacho², Amparo Quintero³, Norkys Meza², Emmy Flores³ y Daxi Segovia³

¹Profesor. Universidad de los Andes. Núcleo Universitario Rafael Rangel. La Concepción, estado Trujillo.

^{2 y 3}Investigadores. Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA). INIA Lara e INIA Trujillo, respectivamente.

Correos electrónicos: eglyspichardo@ula.ve, 43.jose@gmail.com

RESUMEN

Las enfermedades virales disminuyen el vigor y el rendimiento de las plantas y reducen las posibilidades de usar tubérculos como semilla. El objetivo de este trabajo fue detectar mediante la técnica DAS-ELISA, los virus asociados a clones y variedades de papa, en el control de calidad en semilla básica. El experimento se realizó en el laboratorio fitosanitario del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, donde se analizaron 65 muestras, de vitroplantas y tubérculos, utilizando un kit procedente del Centro Internacional de la Papa (CIP). En las muestras de vitroplantas de las variedades Costanera, María Bonita, INIAFRI, Kennebec, Andinita, Tibusay, Granola y de los clones 392634-21 y 392639-1, se detectaron los virus PVY, PVM, PLRV y PVS. En la variedad Granola se detectaron tres virus (PVY, PLRV y PVS) en María Bonita dos (PVM y PVY), en el resto de los materiales uno. Para el caso de tubérculos de Diacol Capiro, Granola y de los clones 392639-1; 393194-27 y 386328-7, se detectaron los virus PVY, PVM, PLRV y PVS; así se observó infección doble en clones 393194-27 con virus PVY y PVS y 386328-7 con PLRV y PVS. También se obtuvo porcentajes de infección de los virus que fluctúan entre 0 y 20% para tubérculos y de 0 a 33,6% para vitroplantas. Se concluye que al menos unos de estos virus: PVY, PVM, PLRV y PVS se detectaron en los diferentes materiales de propagación, a excepción de las variedades y clones: Esperanza, Atlantic, 392636-31, 392636-4 y 393193-16 que no presentaron resultados positivos.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, serología, clon, variedad.

ABSTRACT

Viral diseases decrease vigor and yield of the plants and reduce the possibilities to use as seed tubers. The aim of this work was to detect by DAS-ELISA, the virus associated to clones and varieties of potato in quality control of basic seed. The experiment was conducted in the plant laboratory of the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), where 65 samples of tissue culture plants and tubers were analyzed using a kit from the Centro Internacional de la Papa (CIP). In samples of plantlets of Costanera, Maria Bonita, INIAFRI, Kennebec, Andinita Tibusay, Granola and clones 392634-21 and 392639-1 varieties, PVY, PVM, PVS and PLRV viruses were detected. Variety Granola three viruses (PVY, PLRV and PVS) at Maria Bonita two (PVM and PVY) was detected in one other materials. In the case of tubers of Diacol Capiro Granola and clone 392639-1; 393194-27 and 386328-7, the virus PVY, PVM, PVS and PLRV were detected; and dual infection was observed in clones 393194-27 with PVS and PVY virus and PLRV 386328-7 and PVS. Also infection rates of viruses ranging between 0 and 20% for tubers and 0 to 33.6% for plantlets were obtained. We conclude that at least some of these viruses: PVY, PVM, PVS and PLRV were detected in the different propagation materials, except for the varieties and clones: Hope, Atlantic, 392636-31, 393193-16 and 392636-4 that they did not show positive results.

Key words: *Solanum tuberosum*, serology, kloon, variety.

INTRODUCCIÓN

En los Andes venezolanos se cultiva papa (*Solanum tuberosum* L.) desde épocas prehispánicas pero su importancia comercial ha ido aumentando en las últimas décadas, siendo en la actualidad el principal cultivo de los valles altoandinos. En Venezuela, las áreas más importantes de producción de papa se encuentran situadas principalmente en los estados Lara, Mérida y Trujillo (Romero y Monasterios, 2008). La producción nacional para el 2011 alcanzó aproximadamente 512.544 t métricas (MAT, 2012).

El insumo más importante en la explotación del cultivo papa, es la semilla, requiriéndose que sea de alta calidad. Sin embargo, debido a su forma de propagación asexual, está sometida a un alto riesgo de contaminación por virus, hongos, bacterias e insectos, durante el desarrollo del cultivo y almacenamiento de los tubérculos-semilla (Rodríguez *et al.*, 1995).

Las enfermedades virales de la papa, a pesar de que en muy pocos casos son de carácter letal, generalmente reducen el vigor de las plantas y las posibilidades de usar los tubérculos como semilla (Hooker, 1980).

García *et al.* (2005) y Salazar (1986), indican que entre los virus que causan mayores efectos negativos en el rendimiento de la papa, se encuentran el Virus Y (potato virus Y, PVY; Potyvirus) y el Virus X (potato virus X, PVX; Potexvirus) y el Virus del enrollamiento de las hojas (potato leaf roll virus, PLRV; Polerovirus).

En la región andina de Venezuela, el cultivo de papa es afectado por una serie de virus entre los cuales se mencionan: PLRV, PVY, PVX, Virus S (potato virus S, PVS), Virus A, (potato virus A, PVA) y Virus del Moteado Andino (potato virus M, PVM), señalado por García *et al.* (2005).

Las pérdidas causadas por los virus son cuantitativas (reducción del rendimiento) y cualitativas (reducción del valor comercial). El tipo y severidad de las pérdidas dependen de la planta, de las condiciones ambientales y del virus. Por ejemplo, los virus PVS, PVX PVM pueden reducir el rendimiento de 5 a 40%; otros como el PLRV o infecciones combinadas de PVX y PVY causan pérdidas hasta de 90%.

En la práctica, las plantas infectadas con virus no pueden ser curadas. Generalmente, la severidad de la enfermedad y su diseminación aumentan de una campaña a otra, a menos que el ciclo de la contaminación sea interrumpido. Una forma efectiva de impedir el ciclo del contagio, es excluir de la multiplicación de semillas, las plantas infectadas de virus. Para este proceso se requiere de la detección de infecciones virales (Salazar, 1986).

El diagnóstico de los virus es complejo, y puede ameritar pruebas específicas como las serológicas y moleculares. La técnica ELISA (ELISA es un acrónimo formado de "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay") es una prueba serológica de alta sensibilidad que permite probar un gran número de muestras en corto tiempo (Rangel *et al.*, 2006; García *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue detectar mediante la técnica DAS-ELISA, los virus asociados a clones, variedades de papa en etapa de caracterización y tubérculo-semilla para el control de calidad de semilla categoría básica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del laboratorio de fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Trujillo), Venezuela. Se analizaron 65 muestras, de las cuales 45 fueron vitroplantas (quince materiales, tres repeticiones cada uno) y 20 de tubérculos (cinco materiales, cuatro repeticiones cada uno). Se utilizó un kit procedente del Centro Internacional de la Papa (CIP) para la detección individual de los virus PLRV, PVY, PVX, PVS, PVA y PVM en papa, por DAS-ELISA (se dispuso una placa de microtitulación para la detección de cada virus) y se siguió la metodología descrita en el manual de instrucciones de este estuche.

El muestreo se realizó de forma aleatoria en materiales asintomáticos: a) en el caso semilla tubérculo, se colectaron brotes y una pequeña sección de tejido entre la unión del estolón y el tubérculo; b) para el caso de vitroplantas, se consideró cada frasco contentivo de 10 vitroplantas, como una unidad experimental. De cada muestra de semilla tubérculo o unidad experimental se pesó 1 g y se maceró con el buffer de extracción.

Con el extracto se realizó la prueba mediante el uso de anticuerpos específicos para los virus PLRV, PVY, PVX, PVS, PVA y PVM. Las muestras infectadas (reacción positiva) son aquellas que muestran color amarillo, cuya intensidad varía dependiendo de la concentración de virus en la muestra.

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de ELISA Multiskan, de 30 a 60 min después de agregar la solución de sustrato, como lo indica el manual de instrucciones. Se incluyó testigo negativo absoluto (cuatro celdas en cada placa de microtitulación). Luego se procedió a aplicar el punto de corte para determinar las muestras positivas; $X = x_h + 0,05$. Donde X: muestras del CIP; las muestras positivas fueron aquellas cuya absorbancia fue superior en 0,05 al promedio de las lecturas de los testigos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras constituidas de vitroplantas de las variedades Costanera, María Bonita, INIAFRI, Kennebec, Andinita, Tibisay, Granola y de los clones 392634-21 y 392639-1, se detectaron al menos uno de los virus PVY, PVM, PLRV y PVS; en este sentido, se observó tres tipos de virus (PVY, PLRV y PVS) en la variedad Granola, dos (PVM y PVY) en María Bonita y en el resto un solo virus.

Asimismo, se presentaron muestras que resultaron negativos, es decir, no se detectó la presencia de virus, tal es el caso de la variedad Esperanza, Atlantic y los clones 392636-4, 392636- 31 y el 393193-16 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Virus detectados en vitroplantas de variedades y clones de papa.

Vitroplantas (variedades y clones)*	Muestras analizadas	PVY	PVM	PLRV	PVS	PVX
Costanera	3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Maria Bonita	3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
Esperanza	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
INIAFRI	3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
Atlantic	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Kennebec	3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Andinita	3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Tibisay	3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
Granola	3	2/3	0/3	1/3	2/3	0/3
392636-4	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
392634-21	3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
392636-31	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
393193-16	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
392639-1	3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3

Estudios anteriores mostraron la presencia del virus PVS en brotes apicales y laterales, en las distintas clases de semilla de Granola (Rodríguez *et al.*, 1995).

Para el caso de las muestras de tubérculos de las variedades Diacol Capiro, Granola y de los clones 392639-1, 393194-27 y 386328-7, se pudo apreciar resultados similares al de las vitroplantas, donde se presentan los mismos cuatro virus. Además, el clon 393194-27 presentó los virus PVY y PVS, y en el clon 386328-7 se detectó PLRV y PVS; este evento se conoce como infección doble (Cuadro 2).

El porcentaje de infección de virus en las muestras de tubérculos fluctúa entre 0 y 20%, donde el virus de mayor frecuencia es el PVS con un 20, seguido de PVY con 15, PLRV y PVM con 5 y PVX con 0. (Figura 1.) Asimismo, se observa para vitroplantas que la infección de los virus oscila entre 0 a 33,6 %, encontrándose con mayor frecuencia a PVY con un 33,6, seguido de PLRV y PVS ambos con 14,29 y PVM con 11,9 (Figura 2).

Los resultados obtenidos en la prueba permiten concluir que al menos unos de estos virus: PVY, PVM, PLRV y PVS, se detectaron en los diferentes materiales de propagación, a excepción de las variedades y los clones: Esperanza, Atlantic, 392636-31, 392636-4 y 393193-16, que no presentaron resultados positivos.

Se detectaron los virus PVY, PVM, PLRV y PVS para las vitroplantas y tubérculos, observándose que el virus PVS presentó mayor porcentaje de

infección a nivel los tubérculos, igualmente, en la variedad Granola se evidencia la infección de tres virus (PVY, PLRV y PVS).

Debe señalarse que la presencia conjunta de dos o más virus en la misma planta, incrementa la manifestación de los síntomas y las pérdidas; esto se observa con mezclas de PVX + PVY y PVY + PLRV pudiendo disminuir la producción de las cosechas hasta en un 80% (Agrios, 2005).

Sin embargo, el PVS aunque causa síntomas suaves, es considerado un virus latente, se estima que puede ocasionar pérdidas en los cultivos de papa que oscilan entre 10 y 20% (Dolby y Jones 1987). Adicionalmente, el PVS presenta una reacción sinérgica con otros virus como el PVX, que conduce a que ocasione síntomas más severos, aumente su tasa replicativa, y por ende, cause un mayor efecto detrimental sobre el número total de tubérculos producidos por las plantas (Nyalugwe *et al.*, 2012).

Aparte de las pérdidas económicas causadas por enfermedades virales que originan la reducción en el número y tamaño de los tubérculos (reducción del rendimiento), están las pérdidas ocasionadas por la disminución de la calidad sanitaria de los tubérculos semilla (reducción del valor comercial de la semilla), por lo que los programas de producción y certificación de semilla, tienen como objetivo la obtención de tubérculos semilla dentro de los límites de tolerancia de infección viral establecidos por el Reglamento de Certificación de Semillas, bajo sistemas estrictos de generaciones limitadas (García *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Virus detectados en tubérculos de variedades y clones de papa.

Tubérculos (variedades y clones)*	Muestras infectadas y sanas			
	PVY	PVM	PLRV	PVS
Diacol Capiro	1	0	0	0
Granola	0	1	0	0
386328-7	0	0	1	2
393194-27	2	0	0	2
392639-1	0	0	0	1

*Cuatro tubérculos por muestras

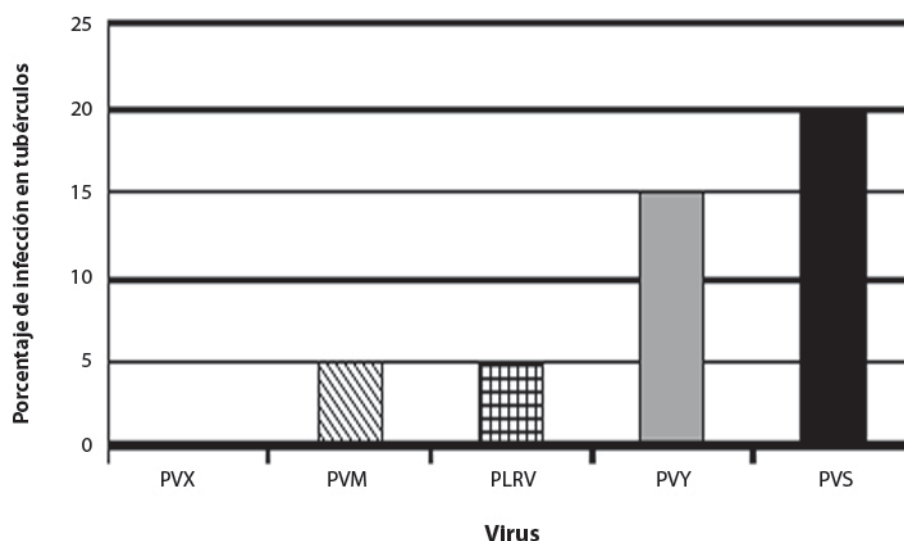


Figura 1. Porcentaje de infección de virus en muestra de tubérculos.

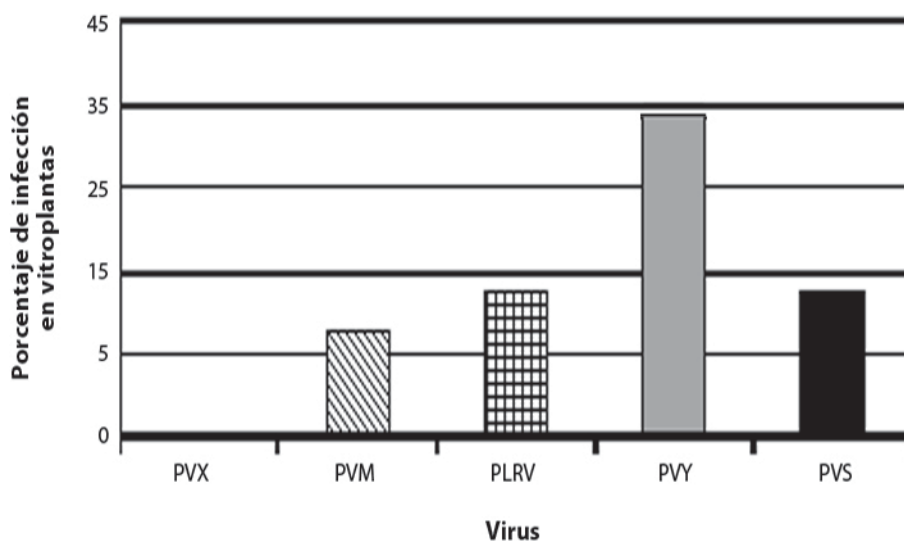


Figura 2. Porcentaje de infección de virus en muestra de vitroplantas.

Al mismo tiempo, se debe contar con material de propagación libre de enfermedades, cuando se realicen pruebas regionales, a fin de garantizar la sanidad de las áreas y campos dedicados a este tipo de ensayos; obteniendo de esta forma, sucesivas multiplicaciones de semilla de alta calidad.

Entre el conjunto de pruebas o técnicas aplicadas para la detección de virus, está la técnica inmunoenzimática de DAS-ELISA. En el presente trabajo,

se evidenció la rapidez y efectividad de esta técnica, como herramienta en la detección de los virus a objeto de estudio.

En aquellos materiales de propagación donde son detectados, y a fin de obtener plantas libres de virus, especialmente cuando se hallan varios virus, se someten a tratamiento con calor y posteriormente al cultivo de meristemos. No obstante, Valenzuela-Herrera *et al.* (2003), indican que la combinación del cultivo de meristemos con

la termoterapia y quimioterapia es efectiva en la erradicación del PVM y PVS, pero en menor grado con PVY; esto conlleva a que luego de los tratamientos antes indicados, nuevamente será necesario aplicar la técnica DAS-ELISA, para verificar que el virus sea eliminado.

En este sentido, la incorporación progresiva del uso de la técnica de ELISA en Venezuela, para la detección de patógenos en plantas, es una necesidad a la que no se ha dado la importancia que tiene, en función de su utilidad para mejorar el control de calidad fitosanitaria de semilla y material de propagación vegetativa.

Los bajos índices de utilización de esta técnica, se explican por la simple aplicación de la ley de oferta y demanda, en la cual, la baja demanda de control de calidad con instrumentos tecnológicos del país en el sector vegetal (ya sea de particulares o agencias del gobierno), limita la ampliación de la oferta tecnológica, a pesar de contar con instituciones con competencias legales y capacidades técnicas para ello. Un medio para corregir esta desviación negativa del mercado, podría considerar la inclusión de una norma de obligatorio cumplimiento y cuya aplicación sea factible técnica y económicamente (Rangel *et al.*, 2006).

CONCLUSIÓN

La detección de los virus a nivel de la producción de semilla reviste gran importancia, ya que se debe garantizar que estas estén libres de patógeno que pueda comprometer la producción a nivel de las diferentes etapas de certificación de las mismas, es por esto que la detección de los virus en diferentes materiales estudiados, nos permiten saber las condiciones fitosanitarias de las mismas, hallando a la técnica de DAS-ELISA como una de las herramientas utilizadas para la detección de los virus. Es importante la detección a tiempo a nivel de vitroplantas, así como a tubérculos, donde una vez detectado el virus se procede a realizar otras técnicas para limpiar el material vegetal que se encuentra infectado.

LITERATURA CITADA

Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier, Academic Press, New York, NY.

Dolby, C. A. and R.A.C. Jones. 1987. Occurrence of the Andean strain of *Potato virus S* in imported potato material and its effects on potato cultivars. *Plant Pathol.* 36:381-388.

Converse, R. H. and R. R. Martin. 1990. ELISA methods for plant viruses. **In:** Hampton, R., Ball, E. and De Boer, S. (Eds). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens*. APS, St Paul, Minnesota, USA. pp. 179-196.

García, R., A. García y J. Garnica. 2001. Detección de virus en sistemas de producción de papa del estado Mérida Sociedad Venezolana de Fitopatología. Vol. 14 N° 2. julio-diciembre. (Resumen).

García, R., L. Niño y A. Vargas. 2005. Problemas sanitarios relacionados con la producción de tubérculos- semilla de papa. **In:** Producción de semilla de papa en Venezuela. Serie Manual de cultivo INIA N° 5. pp. 55-115.

Hooker, W. J. 1982. Compendio de enfermedades de la papa. Lima Perú. Centro Internacional de la Papa. 166 p.

Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (MPPPAT). 2012. Memoria y cuenta 2012. Tomo I. Caracas. 1.170 p.

Nyalugwe, E. P., C. R. Wilson, B. A. Coutts and R.A.C. Jones. 2012. Biological properties of *Potato virus X* in potato: Effects of mixed infection with *Potato virus S* and resistance phenotypes in cultivars from three continents. *Plant Dis.* 96:43-54.

Rangel, E., A. Schmidt y F. Centeno. 2006. Implementación de la técnica de ELISA para la detección de virus y otros patógenos en plantas en Venezuela. *Revista Digital CENIAP HOY* Número 10, 2006. Maracay, Aragua, Venezuela. ISSN 1690-4117, Depósito legal 200302AR1449. Disponible en: URL: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n10/arti/rangel_e/arti/rangel_e.htm

Rodríguez, Y., E. Ortega y G. Trujillo. 1995. Detección de los virus PLRV, PVY, PVX y PVS en brotes de tubérculos de papa por la técnica serológica de ELISA. *Revista Latinoamericana de la Papa.* 7(8):94-101.

- Rodríguez, Y., E. Rangel, F. Centeno, O. Mendoza y A. Parra. 2004. Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Jiménez, Iribarren y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 21:105-115.
- Romero, L. y M. Monasterio. 2008. Papas negras, papas del páramo. Un pasivo socioambiental de la modernización agrícola en Los Andes de Venezuela. *Boletín Antropológico*. 64:107-138.
- Salazar, L. F. 1995. Los virus de la papa y su control. Lima, PE, CIP (Centro Internacional de la Papa). 226 p.
- Salazar, L. F. 1986. Detección de virus en la producción de semilla de papa. Montevideo, Hemisferio Sur y Centro Internacional de la Papa. 14 p. (*Boletín de Información Técnica* 18).
- Valenzuela-Herrera, V., E. Redondo-Juárez y R. Bujanos-Muñiz. 2003. Detección de virus por serología y plantas indicadoras en el tubérculo-semilla y plantas de cultivo de meristemas en papa (*Solanum tuberosum* L.) Var. Alfa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 21 Número 002. Ciudad Obregón, México. pp. 176-180.