

NOTA TÉCNICA

ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL AMARILLAMIENTO DE LAS VENAS DE PAPA EN VENEZUELA

Martha E. Osorio¹, Alexis F. Marques¹, Gustavo J. Romay², Sara E. Roa¹,
Jhonny R. Demey² y Ariadne L. Vegas¹

RESUMEN

El virus del amarillamiento de las venas de papa (PYVV) pertenece al género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae* y es transmitido por la mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*). Es un problema importante para los países andinos debido a que ocasiona pérdidas en la producción, al causar reducción del número y tamaño de los tubérculos. Su diagnóstico, basado en la expresión de síntomas, es impreciso porque el virus puede infectar en forma asintomática a las plantas y el diagnóstico serológico se dificulta por la inexistencia de pruebas comerciales disponibles. El objetivo de este trabajo fue la adaptación de la técnica RT-PCR para el diagnóstico y posterior rastreo viral del PYVV en las zonas productoras de Venezuela. Se colectaron 10 muestras sintomáticas en los estados Táchira y Trujillo. La extracción del ARN se realizó utilizando el *kit* RNeasy Plant Mini (Qiagen), y se incorporó al proceso la ultracongelación del tejido (-60 °C) y adición de metabisulfito de sodio (0,05 mg·g⁻¹). La retrotranscripción se ejecutó mediante el *kit* ImPron-II Reverse-Transcription System (Promega). En la RT-PCR se utilizaron iniciadores específicos para los genes de CP y CPm, probándose diferentes temperaturas de hibridación y extensión, así como varias mezclas de amplificación. La adaptación realizada a la RT-PCR permitió la amplificación de fragmentos específicos, con los cuales se confirmó la infección del virus en el 100 % de las muestras. Se demuestra por primera vez su presencia en Venezuela basados en técnicas moleculares. Estos resultados aportan un referencial tecnológico de diagnóstico que puede ser implementado para prevenir la dispersión del virus a partir del tubérculo-semilla.

Palabras clave adicionales: Detección, estandarización, PYVV, *Solanum tuberosum*

ABSTRACT

Adaptation of RT-PCR technique for the diagnosis of potato yellow vein virus in Venezuela

Potato yellow vein virus (PYVV) belongs to the genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*, and is transmitted by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). It is an important problem for Andean countries because it causes loss of production by reducing the number and size of tubers. The diagnosis based on symptom expression is inaccurate because it can infect plants asymptotically, and serological diagnosis is hampered by the lack of commercial kits available in the country. The objective of this study was the adaptation of the RT-PCR technique for the PYVV diagnosis and subsequent viral tracking in producing areas. Ten symptomatic samples were collected in Táchira and Trujillo States, Venezuela. RNA extraction was performed using the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Deep freezing of the tissue (-60 °C) and addition of sodium metabisulfite (0,05 mg·g⁻¹) were incorporated as additional steps. The retrotranscription was executed by using the kit ImPron-II Reverse-Transcription System (Promega). Specific primers to amplify CP and CPm genes were utilized, as well as different annealing and extension temperatures, and various amplification mixtures. Such adaptations allowed the amplification of specific fragments, and confirmed virus infection in 100 % of the samples. It is the first time that PYVV is diagnosed by molecular techniques in Venezuela, thus it represents a diagnostic procedure that can be implemented to prevent the spread of the virus from seed tuber.

Additional key words: Detection, PYVV, *Solanum tuberosum*, standardization

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) procede de

las culturas pre-incas e incas y constituye junto al trigo, maíz y arroz, uno de los cuatro cultivos básicos en la alimentación humana. En Venezuela

Recibido: Mayo 1, 2015

Aceptado: Diciembre 7, 2015

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Maracay, Venezuela. e-mail: mosorio@inia.gov.ve

² Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Sartenejas, Baruta, Caracas 1015.

es considerada parte fundamental de la dieta alimenticia, especialmente para los pobladores ubicados en las zonas andinas, por su alto contenido de carbohidratos, vitaminas y minerales (Cuesta et al., 2002).

Las consecuencias de las infecciones virales en el cultivo de papa son variables, en algunos casos las pérdidas son poco significativas, como con el virus S de la papa (PSV), mientras que con el virus del amarillamiento de las venas de papa (PYVV), la disminución de la producción ha alcanzado hasta un 50%, especialmente en el Grupo Andígena (Salazar et al., 2000; Zapata et al., 2004; Guzmán et al., 2012).

El PYVV pertenece al género *Crinivirus* de la familia *Closteroviridae* y su ataque se limita al floema de la planta. Es un virus reemergente que representa una amenaza en la sostenibilidad de los agricultores porque se mantiene y disemina efectivamente a gran distancia mediante la mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*), vector que tiene una gran capacidad de adaptación lo que le ha permitido ampliar su nivel de acción a varios pisos térmicos y a diferentes hospederos, aumentando la posibilidad de dispersión del virus (Salazar et al., 2000; Livieratos et al., 2004; Dolja et al., 2006).

El diagnóstico del virus basado en la expresión de síntomas es impreciso porque éste puede infectar en forma latente y asintomática a las plantas y los estuches de diagnóstico mediante la

técnica de ELISA no están disponibles comercialmente, lo que ha imposibilitado la certificación de semilla por técnicas serológicas. Sin embargo, se han desarrollado técnicas moleculares que, aunque más costosas que las serológicas, tienen la ventaja de ofrecer un diagnóstico preciso; por ello, la adaptación y establecimiento de técnicas moleculares como la RT-PCR para el diagnóstico de los virus es de crucial importancia para evitar su dispersión (Cubillos, 2011; Guzmán et al., 2013; Medina et al., 2015). En este trabajo se planteó la adaptación de dicha técnica para el diagnóstico y posterior rastreo viral del PYVV en las zonas productoras de papa de Venezuela

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se colectaron 10 muestras de tejido foliar (cinco hojas por muestra), de plantas de *Solanum tuberosum* Grupo Andígena, procedentes de fincas productoras de los estados Táchira (6) y Trujillo (4). Las muestras presentaron diferentes grados de amarillamiento de la lámina foliar observándose, en las colectadas en el estado Trujillo, pequeños puntos amarillos en los bordes de las hojas (Figura 1 a,b), mientras que en las colectadas en el estado Táchira, el amarillamiento cubría casi la totalidad de la lámina, presentando escasos espacios intervenales verdes (Figura 1 c,d).

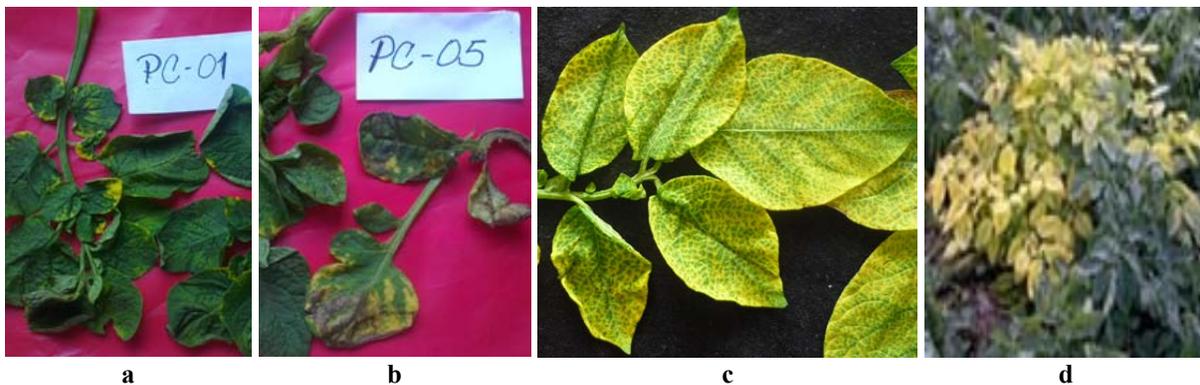


Figura 1. Síntomas producidos por PYVV en plantas de *Solanum tuberosum* Grupo Andígena de zonas productoras de la región andina venezolana. a y b: pequeños puntos amarillos en los bordes de las hojas; c y d: amarillamiento en casi la totalidad de la lámina

Todas las muestras se trasladaron envueltas en papel absorbente humedecido, en bolsas plásticas y colocadas en cavas con hielo, a los Laboratorios

de Virología Vegetal y de Biotecnología Agrícola del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP).

Aislamiento o extracción del ARN viral. Para la extracción del ARN viral de las muestras con síntomas de PYVV, se utilizó el kit RNeasy Plant Mini de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante, éstas fueron básicamente: Se pesó 0,05 gramos de tejido, se colocó en tubos de microcentrífuga de 2 mL estériles y fríos, se agregó nitrógeno líquido (NL2) y se maceró. Se adicionó 450 µL de buffer (RLT o RLC) e incubó a 56° C por 1-3 minutos, posteriormente se transfirió el lisado a la columna QIAshredder, se colocó en un tubo de colección de 2 mL y se centrifugó a toda velocidad a 20-25° C por dos minutos. Se tomó el sobrenadante y adicionó 0,5 volúmenes de etanol (96-100%) para clarificar el lisado. Se transfirió la muestra a una columna RNeasy spin y se centrifugó por 15 segundos a 10.000 RPM. Se descartó lo que fluyó a través de la membrana, se adicionaron 700 µL de buffer RW1 y centrifugó por 15 segundos a 10.000 RPM. Se adicionó 500 µL de buffer RPE y se centrifugó por 15 segundos a 10.000 RPM. Se descartó lo que fluyó a través de la membrana. Se añadió 500 µL del buffer y se centrifugó dos minutos a 10.000 RPM. Se colocó la columna RNeasy en un nuevo tubo de colección de 1,5 mL y se adicionó 30-50 µL de agua libre de ARNasa. Se eluyó el ARN.

Durante el proceso de extracción se incorporó la ultracongelación del tejido foliar a -60° C, previa a su pulverización con nitrógeno líquido (N₂), y metabisulfito de sodio a razón de 0,05mg.g⁻¹ durante el macerado del tejido, con el fin de evitar la oxidación y mejorar la calidad del ARN.

Iniciadores para la RT-PCR de muestras foliares de papa con síntomas de PYVV. Para la reacción en cadena de la polimerasa mediada por transcriptasa reversa o RT-PCR, por sus siglas en inglés, se utilizaron iniciadores específicos

señalados en literatura para los genes de las proteínas de la cápside mayor y la cápside menor (Cuadro 1). Su selección se debió a que forman parte estructural del virus y participan en la protección del genoma, la replicación, el transporte viral y la transmisión célula a célula (Guzmán et al., 2008; Guerrero et al., 2009, Cubillos, 2011).

RT-PCR. Después de la extracción del ARN de los aislados, se hizo la transcripción reversa (RT) con el fin de obtener los ADN complementarios o ADNc que se emplearían en las reacciones de RT-PCR, para ello se utilizó el ImPron-II Reverse Transcription System, de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en la RT-PCR para PYVV en papa y sus secuencias

Gen	Secuencias de los iniciadores
CP (PYVVCP)	F (5'-ATGGAATCCGATCGTGGAACCT-3') R (3'-CTACTCAATAGATCCTGCTA-5')
CPm (PYVVCPm)	F (5'-GACCGCCGACTTGTGAATT-3') R (3'-TTGCTGCATTCTTGAACAGGTAA-5')

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo Gene Pro marca BIOER. Se probaron tres mezclas de amplificación y dos perfiles de temperaturas empleados en trabajos previos con el fin de amplificar el ADNc de los aislados PYVV sometidos a estudio (Cuadros 2 y 3). La amplificación de cada gen se realizó en reacciones separadas para cada aislamiento.

Los productos obtenidos de la RT-PCR, se analizaron en geles de agarosa 2,5% en buffer TBE 0,5X, teñidos con Sybr Safe (Invitrogen), utilizándose como patrón de peso molecular marcadores de 50 y 100 pb (Promega). La corrida electroforética se realizó a una tensión de 100 voltios y 40 mA durante dos horas.

Cuadro 2. Mezclas de amplificación probadas para la amplificación por RT-PCR de los aislados PYVV, en un volumen total de 25 µL

Reactivos	Cubillos, 2011	Guzmán et al., 2013	Franco et al., 2013
Buffer	1X (Bioline)	1X (Bioline)	1X (Bioline)
MgCl ₂	1 mM (Bioline)	2,5 mM (Bioline)	2,5 mM (Bioline)
dNTPs	0,4 mM (Bioline)	0,4 µM (Bioline)	10 µM (Bioline)
Primer Directo	0,4 µM (Invitrogen)	0,4 µM (No indicado)	10 µM (No indicado)
Primer Reverso	0,4 µM (Invitrogen)	0,4 µM (No indicado)	10 µM (No indicado)
Taq. Pol	0,8 U (Bioline)	1 U (Bioline)	1,5 U (Bioline)
ADNc	20 ng	15 ng	15 ng

Cuadro 3. Perfiles térmicos probados para la RT-PCR de los aislados PYVV

Cubillos, 2011	Guzmán et al., 2013; Franco et al., 2013
3 min a 94 °C	3 min a 94 °C
35 Ciclos:	35 Ciclos:
1 min a 94 °C	30 s a 94 °C
1 min a 55 °C	30 s a 55 °C
1 min a 68 °C	1 min a 72 °C
10 min a 68 °C	10 min a 72 °C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reacciones de RT-PCR para CP y CPm. Las metodologías probadas en este estudio permitieron la amplificación por RT-PCR de los aislados PYVV con ambos genes, produciendo fragmentos correspondientes a los tamaños señalados en la literatura para CP (758 pb) y CPm (257pb); no obstante, la metodología descrita por Cubillos (2011) fue la que produjo fragmentos amplificados mejor definidos, salvo en los fragmentos de algunos aislados donde no se

observó buena resolución. Por ello, se incorporaron algunas modificaciones tanto en la mezcla de amplificación como en las temperaturas de los perfiles térmicos, con el fin de mejorar la nitidez y definición de los productos.

Las modificaciones realizadas a la mezcla de amplificación mediante RT-PCR descrita por Cubillos (2011) fueron, básicamente, reducciones en las concentraciones de *Taq* polimerasa, dNTPs e iniciadores, así como cambios en las temperaturas de hibridación de los iniciadores y de la fase de extensión del perfil térmico (Cuadros 4 y 5); esto permitió, en nuestro laboratorio y con los reactivos empleados, la obtención de fragmentos más nítidos y precisos (Figuras 2 y 3).

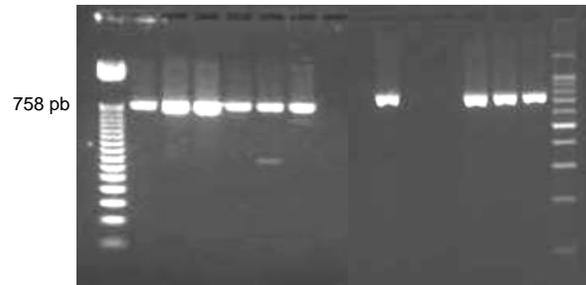
Las modificaciones se realizaron con base a la tendencia actual de disminuir las concentraciones de los reactivos, por una parte para aumentar la nitidez de los productos amplificados en el gel, por posible competencia entre los reactivos a causa de un exceso en la mezcla de amplificación y por otro lado para hacerlo más eficiente desde el punto de vista económico, con resultados a menor costo.

Cuadro 4. Mezcla de amplificación modificada en este estudio para la amplificación por RT-PCR de los aislados PYVV, en un volumen total de 25 µL

Reactivos	Cubillos, 2011	Adaptación propuesta en el presente estudio
Buffer	1X (Bioline)	1X (Promega)
MgCl ₂	1 mM (Bioline)	1 mM (Promega)
dNTPs	0,4 mM (Bioline)	0,2 mM (Promega)
Primer Directo	0,4 µM (Invitrogen)	0,2 µM (Eurogentec)
Primer Reverso	0,4 µM (Invitrogen)	0,2 µM (Eurogentec)
<i>Taq</i> . Pol	0,8 U (Bioline)	0,4 U GoTaq flexi (Promega)
ADNc	20 ng	20 ng

Cuadro 5. Perfiles térmicos para la RT-PCR de los aislados PYVV, en un volumen total de 25 µL, según la metodología original (Cubillos, 2011) y la modificada en este estudio

Cubillos, 2011	Adaptación propuesta en este estudio
3 min a 94 °C	5 min a 94 °C
35 Ciclos:	35 Ciclos:
1 min a 94 °C	1 min a 94 °C
1 min a 55 °C	1 min a 52 °C
1 min a 68 °C	1 min a 72 °C
10 min a 68 °C	10 min a 72 °C

**Figura 2.** RT-PCR en los seis materiales amplificados del estado Táchira y los cuatro amplificados del estado Trujillo con el Gen CP (758 pb). Izquierda: marcador 50 pb; derecha: marcador 100 pb (ambos de Promega)

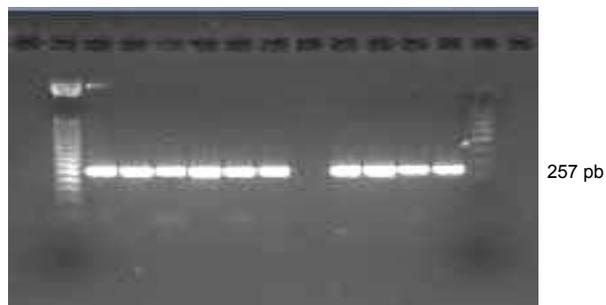


Figura 3. RT-PCR en los seis materiales amplificados del estado Táchira y los cuatro amplificados del estado Trujillo con el Gen CPm (257 pb). Izquierda: marcador 50 pb; derecha: marcador 100 pb (ambos de Promega)

CONCLUSIONES

La adaptación realizada a la técnica RT-PCR permitió la amplificación de los aislados PYVV con los iniciadores de los genes CP y CPm, es decir, que todos resultaron RT-PCR positivos con lo cual se confirmó infección en el 100% de las muestras estudiadas, al producir fragmentos amplificados más nítidos y precisos que permitieron demostrar por primera vez la presencia del PYVV en Venezuela basados en técnicas moleculares. Con la metodología descrita se cuenta con un referencial tecnológico para su uso en el diagnóstico preciso del virus en las zonas productoras de Venezuela, que puede ser implementado para prevenir su dispersión a partir del tubérculo-semilla.

LITERATURA CITADA

- 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. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 200 p.
- Cuestas, X., H. Andrade, O. Bastidas, R. Quevedo y S. Sherwood. 2002. Botánica y mejoramiento genético. In: El cultivo de la Papa en Ecuador. M. Pumisacho y S. Sherwood (eds.). INIAP-CIP. Quito-Lima. pp. 33-49.
- Dolja, V.V., J. Kreuze y J. Valkonen. 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117: 38-51.
- Franco-Lara, L., D. Rodríguez y M. Guzmán-Barney. 2013. Prevalence of potato yellow vein virus in *Solanum tuberosum* group *Phureja* fields in three states of Colombia. *American Journal of Potato Research* 90(4): 324-330
- Guerrero, C., H. Gutiérrez, O. Alvarado, J. Leos, A. Garza y L. Villareal. 2009. Detección del virus Y de la papa variante ntn mediante RT-PCR en plantaciones del estado de Nuevo León, México. *Ciencia UANL* 12: 56-61.
- Guzmán-Barney, M., P. Rodríguez y L. Franco-Lara. 2008. Molecular diagnosis of potato yellow vein virus (PYVV) in tubers of *Solanum phureja* (egg yolk) in samples from Colombia. *International Congress of Virology*. Ankara. 10 p.
- Guzmán-Barney, M., A. Hernández y L. Franco-Lara. 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.
- Guzmán-Barney, M., L. Franco-Lara, D. Rodríguez, L. Vargas y J. Fierro. 2012. Yield losses in *Solanum tuberosum* group *Phureja* cultivar criolla Colombia in plant with symptoms of PYVV in field trails. *American Journal of Potato Research* 89(6): 438-447
- Livieratos, I.C., E. Eliasco, G. Muller, R.C. Olsthoorn, L.F. Salazar, C.W. Pleij y R.H. Coutts. 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.
- Medina-Cárdenas, H., P. Gutiérrez-Sánchez y M. Marín-Montoya. 2015. Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS-Elisa y qRT-PCR en Antioquia (Colombia). *Bioagros* 27(2): 83-92.
- Salazar, L.F., G. Muller, M. Querci, J.L. Zapata y R.A. Owens. 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., A. Saldarriaga y L.F. Salazar. 2004. El amarillamiento de venas de la papa.

Corporación Colombiana de Investigación
Agropecuaria, Corpoica. Centro de

Investigación La Selva. Boletín Técnico 21.
Rionegro, Antioquia, Colombia. 12 p.