

# EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE RT-PCR E IM-RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES VIRUS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE LA PAPA

CLAUDIA PATRICIA ROSAS MESA.

Código: 200017475

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS.

Bogotá, D.C.  
2002

**EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE RT-PCR E IM-RT-PCR PARA LA  
DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES VIRUS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE  
LA PAPA.**

CLAUDIA PATRICIA ROSAS MESA.  
Código: 200017475

Trabajo de grado como requisito para optar al título de  
**Magíster en Ciencias Biológicas.**  
**Área Biología Molecular de las Plantas.**

Directores:

**FABIO ARIZTIZABAL, Ph. D**  
Profesor asistente. Departamento de Farmacia.  
Universidad Nacional de Colombia.

**MARINA CARO MUÑOZ. I.A. Esp.**  
Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional de Colombia.

Codirector:

**ALFREDO BADILLO, Ph. D**  
Profesor asistente. Departamento de Ciencias Biológicas.  
Universidad de los Andes

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS.

Bogotá, D.C.  
2002

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
1.1. GENERAL.....	13
1.2. ESPECÍFICOS.....	13
<b>2 . MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1. EL CULTIVO DE PAPA.....	14
2.2. PROBLEMÁTICA VIRAL DEL CULTIVO.....	15
<b>2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VIRUS.....</b>	<b>16</b>
2.3.1. Virus X de la papa (PVX).....	18
2.3.1.1. Características generales.....	18
2.3.1.2. Genoma.....	19
2.3.1.3. Modo de infección.....	21
2.3.1.4. Sintomatología.....	21
2.3.2. Virus Y de la papa (PVY).....	22
2.3.2.1. Características generales.....	22
2.3.2.2. Genoma.....	22
2.3.2.3. Modo de infección.....	25
2.3.2.4. Sintomatología.....	25
2.3.3. Virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV).....	26
2.3.3.1. Características generales.....	26
2.3.3.2. Genoma.....	26
2.3.3.3. Modo de infección.....	30
2.3.3.4. Sintomatología.....	31
2.3.4. Virus S de la papa (PVS).....	31
2.3.4.1. Características generales.....	31
2.3.4.2. Genoma.....	32
2.3.4.3. Modo de infección.....	34
2.3.4.4. Sintomatología.....	34
<b>2.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....</b>	<b>34</b>
2.4.1. Microscopia electrónica.....	34
2.4.2. Métodos serológicos (ELISA).....	35
2.4.2.1. Generalidades.....	35

2.4.2.2. Tipos de ELISA.....	35
2.4.2.3. ventajas y desventajas de la técnica.....	38
2.4.3. TECNICAS BASADAS EN PCR.....	39
2.4.3.1. Generalidades.....	39
2.4.3.2. Principios de las tecnicas de PCR y RT - PCR.....	39
2.4.3.3. Ventajas y desventajas de la técnica.....	40
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	42
3.2. METODOLOGÍA.....	44
3.2.1. Pruebas de ELISA.....	44
3.2.1.1. Preparación de la muestra.....	44
3.2.1.2. Protocolo.....	44
3.2.2. Aislamiento del ARN total.....	45
3.2.3. Extracción de ADN.....	45
3.2.4. Descripción de los primers empleados.....	46
3.2.5. Síntesis del ADNc.....	50
3.2.6. Amplificación por PCR del ADN transgenico y del ADNc.....	50
3.2.7. Inmunocaptura – RT – PCR (IM – RT – PCR ) .....	52
3.2.7.1. Preparación de las muestras.....	52
3.2.7.2. Captura viral, síntesis y amplificación del ADNc.....	52
<b>4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1. SINTOMATOLOGÍA Y PRUEBAS DE ELISA.....	53
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	57
4.3. ANÁLISIS DE LOS PRIMERS.....	58
4.4. SÍNTESIS Y AMPLIFICACIÓN DEL cADN VIRAL Y DEL ADN TRANSGÉNICO POR RT -PCR.....	63
4.5 AMPLIFICACIÓN POR IM – RT – PCR.....	67
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Clones usados en el estudio .....	42
TABLA 2. Descripción de los primers empleados.....	46
TABLA 3. Síntomas y Resultados de las pruebas de ELISA .....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma de PVX.....	21
figura 2. Genoma de PVY.....	21
Figura 3. Mecanismo general de readthrough.....	28
figura 4. Estructura general de una secuencia seudonudo implicada en el salto de lectura .....	29
figura 5. Genoma de PLRV.....	30
figura 6. Genoma de PVS .....	37
figura 7. Pasos generales prueba DAS – ELISA .....	37
figura 8. Localización de los primers.....	47
Figura 9. Electroforesis de los primers en gel de poliacrilamida al 15% .....	49
Figura 10. Sintomatología de PVY y PLRV.....	53
Figura 11. Prueba de ELISA para PVY y PLRV.....	56
figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN obtenido.....	59
figura 13. Resultados del Blast para la accesión M72416 del virus PVX.....	59
figura 14. Resultados del Blast para la accesión D00441 del virus PVY .....	61
figura 15. Blast realizado sobre la accesión número D13953 de PLRV .....	62
Figura 16. Resultados del Blast para la accesión D00461 del virus PVS .....	62
figura 17. ADNc de PVY y PLRV.....	66

figura 18. Electroforesis de los productos de RT – PCR para PLRV.....66

figura 19. Electroforesis de los productos de PCR del ADN transgenico.....69

figura 20. IM – RT- PCR para material infectado con PLRV.....69

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Prueba de ELISA .....	81
ANEXO B. Preparación de las soluciones buffer para ELISA .....	83
ANEXO C. Tratamiento de los materiales con Dietilpirocarbamato (DEPC).....	85
ANEXO D. Extracción de ARN utilizando Trizol®.....	86
ANEXO E. Extracción de ADN utilizando DNAzol® .....	87
ANEXO F. Utilización de ADN Utilizando Ultra Clean .....	89
ANEXO G. Electroforesis del ADN y los productos de ADNc.....	91
ANEXO H. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	92
ANEXO I. Preparación búferes y colorantes para electroforesis.....	93
ANEXO J. Síntesis de ADNc .....	94
ANEXO K. Amplificación del ADNc y el DNA transgénico.....	95
ANEXO L. Inmunocaptura RT – PCR.....	96
ANEXO M. Acciones de PVX reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.....	98
ANEXO N. Acciones de PVY reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.....	98
ANEXO Ñ. Acciones de PLRV reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.....	100
ANEXO O. Acciones de PVS reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.....	101



## RESUMEN

La papa es uno de los principales cultivos de la zona Andina Colombiana. Su reproducción de tipo vegetativa, por la utilización de tubérculos obtenidos de la cosecha anterior, hace que la propagación de los virus que la infectan se expanda y mantenga en el cultivo, causando pérdidas en la producción. Una de las estrategias para disminuir su influencia es la utilización de tubérculo certificado (mal llamado semilla). Para tal fin, son indispensables la realización de pruebas serológicas y moleculares que garanticen la limpieza del material utilizado. El diagnóstico de los virus utiliza como primera medida la determinación visual, la cual es engañosa pues la sintomatología de muchos virus es semejante a la dada por la deficiencia de nutrientes y por estrés abiótico. La determinación por medios serológicos como ELISA presenta problemas en casos de infección temprana, donde la cantidad de virus puede ser imperceptible por este método, razón por la cual métodos moleculares como el RT – PCR son más confiables. Uno de los principales inconvenientes en la utilización del RT – PCR es la dificultad en la extracción del ARN. Se han buscado diferentes alternativas que obvien este paso, entre las cuales tenemos la combinación de la técnica de ELISA y el PCR en una híbrida denominada Inmunocaptura – RT – PCR (IM – RT – PCR), la cual ha sido ampliamente usada para la detección de virus de la familia *potiviridae*, *closteroviridae* y *tobamoviridae*, principalmente; presenta ventajas sobre la RT – PCR en tiempo, costos y sensibilidad.

Los principales virus que afectan el cultivo de la papa son: el virus X de la papa (PVX), el virus Y de la papa (PVY), el virus del enrollamiento de la papa (PLRV) y el virus S de la papa (PVS); pertenecientes a las familias *Potexviridae*, *Potyviridae*, *Luteoviridae* y *Carlaviridae*, respectivamente. El principal objetivo de este trabajo fue probar, para los tres primeros virus, las técnicas de RT – PCR y de IM – RT – PCR para su detección utilizando primers específicos reportados en la literatura. Para los ensayos se utilizó como muestra material vegetal proveniente de mejoramiento genético evaluado para resistencia a virus y al cual se le practicó la prueba de ELISA, escogiendo los más altamente positivos.

Se aplicó por primera vez en el país la técnica de IM-RT-PCR para la detección de PLRV en hojas, con buenos resultados, posibilitando su uso en reemplazo de la técnica de RT-PCR como método molecular de detección temprana.

## ABSTRACT

The potato is one of the main crops of the Colombian Andean area. Their vegetative type reproduction, for the use of tubers that the last time; its makes that the propagation of the virus that they infect it expands and maintain in the cultivation, causing losses in the production. One of the strategies to reduce their influence is the use of certified tubers (bad named seed); for such an end, the realization of tests serológicos and molecular that guarantee the cleaning of the used material, they are indispensable. The diagnoses of the virus uses a first measure the visual determination, which is deceiving because the sintomatología of many viruses is similar to the one given by the deficiency of nutritious and for abiótic estrés. The determination for means serológicos like ELISA, presents problems in cases of early infection, where the quantity of virus can be imperceptible for this method, reason for the one which molecular methods as the RT – PCR are more reliable. One of the main problems in the use of the RT - PCR is the extraction of the RNA; different mechanisms have been looked for that obviate this step among which we have the combination of ELISA'S technique and the PCR in a hybrid denominated Inmunocaptura - RT - PCR (IM - RT - PCR) which has been broadly used for the detection of virus of the family potviridae, closteroviridae and tobamoviridae, mainly; it presents advantages on the RT - PCR in time, costs and sensibility.

The main virus that they affect the cultivation of the potato is the Potato Virus X (PVX), Potato Virus Y (PVY), Potato Leafroll Virus (PLRV) and the Potato Virus S (PVS) belonging to the families *Potexviridae*, *Potyviridae*, *Luteoviridae* and *Carlaviridae* respectively. The main objective of this work was to prove the techniques of RT - PCR and of IM - RT - PCR in the detection of these virus using specific primers reported by the literature for the first three. The rehearsals were carried out on breeding material that had been evaluated by the in vitro tissue culture group for virus resistance and they have given highest positive ELISA in previous tests.

In this work we apply for first time the IM-RT-PCR technique for the detection of PLRV in leaf with excellent results; this result possibility the use of this technique in change whit RT-PCR for molecular early detection.

## INTRODUCCIÓN

La papa es uno de los principales cultivos de la Zona Andina y uno de los productos de mayor consumo entre los colombianos. Por su propagación de tipo vegetativa, la expansión de enfermedades especialmente de tipo viral, dada no solo por el mal manejo agronómico del cultivo (periodos indebidos de fumigación, riego, manejo inapropiado de los instrumentos de siembra, etc.), sino también por la siembra de tubérculos contaminados, disminuyen significativamente la producción.

Es por esto que en este tipo de cultivos se hace indispensable la producción de semilla agronómica certificada, y para ello se buscan pruebas diagnósticas que permitan hacer una detección temprana y confiable de la presencia viral, garantizando el 100% de sanidad.

La presencia de virus en los cultivos se hace a veces difícil de detectar por métodos tradicionales (visual y serológicos), debido a la baja concentración en que se pueden encontrar y a que muchas veces su sintomatología se puede confundir con problemas nutricionales, principalmente ausencia de nitrógeno, fósforo y potasio (Agrios, 1997). Esto hace necesaria la búsqueda de pruebas más sensibles, que permitan detectarlos aun cuando su sintomatología no sea evidente, garantizando así al productor la limpieza de la semilla vegetativa producida.

El intercambio de material vegetal, no solo entre países sino entre regiones, requiere también el implemento de medidas que garanticen su sanidad y eviten la expansión de enfermedades que puedan causar problemas fitosanitarios en el país. Las técnicas moleculares, por facilitar la detección temprana de material infectado, pueden contribuir en la toma de medidas de control necesarias a tiempo. A pesar de sus ventajas, estas técnicas no son ampliamente usadas en el diagnostico rutinario, por lo cual innovaciones en las mismas que reduzcan tiempo, costos y aumenten la eficiencia son objeto de investigación.

El uso de técnicas serológicas como ELISA, que es tediosa y costosa, puede ser complementado, y reemplazado en algunos casos, con técnicas moleculares

como la RT-PCR, sobretodo en materiales en estadios tempranos de infección. Además el aislamiento de secuencias específicas del virus posibilitado por las técnicas moleculares, puede ser de gran utilidad para la clonación y posterior obtención de líneas transgénicas con resistencia (Faccioli G; 1995).

Se considera que uno de los pasos más críticos y costosos para la detección de virus ARN por la técnica de RT – PCR es el aislamiento y purificación del ARN total. Modificaciones que buscan evitar la extracción del ARN han sido probadas para diferentes materiales (Klebe, 1996); una de ellas es la Inmunocaptura Retrotranscripción - PCR (IM – RT- PCR), que combina la técnica de ELISA con la de RT – PCR y ha sido utilizada con éxito para la detección de virus de la familia *Potivirae* (Romero, 1997, Dallot, 1998, Castro, 2000), *Closteroviridae* y *Tobamoviridae* (Martin, 2000). Esta nueva técnica se considera muy efectiva, sencilla y sensible. Su especificidad es dada no solo por la naturaleza de los anticuerpos utilizados (monoclonales o policlonales), sino también por los primers diseñados para tal fin. Además de tener otras múltiples funciones que pueden ser dadas por el investigador al fragmento de ADN aislado, como por ejemplo la clonación, se evita la etapa de purificación y extracción del ARN viral, la cual se considera crítica y presenta limitantes, sobretodo en la cantidad de ARN viral obtenido (Faccioli, 1995; Martin, 2000 ).

Con el presente trabajo se busca aplicar el protocolo de IM – RT – PCR para la detección de los principales virus que afectan el cultivo de la papa en Colombia, como son PVX (*Potexviridae*), PVY (*Potyviridae*) y PLRV (*Luteoviridae*), con el objetivo de contar con una prueba eficiente y rápida para la detección temprana de ellos.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. GENERAL.

- Evaluación de las técnicas de RT –PCR e IM – RT - PCR en la detección de los virus PVX, PVY, PLRV en plantas de papa previamente reportadas como positivas por la prueba de ELISA.

### 1.2. ESPECÍFICOS.

- Evaluar por métodos informáticos la confiabilidad de los primers disponibles para la detección del máximo número de aislamientos reportados en los bancos de secuencias de PVX, PVY y PLRV.
- Utilizar la información disponible en las bases de datos, y los programas Hind-PCR y Primer Design, para el diseño de primers que puedan ser usados para la detección de PVS mediante técnicas moleculares.
- Utilizar los primers disponibles en el laboratorio para la detección de PVX, PVY y PLRV mediante la técnica de RT – PCR.
- Aplicar la combinación de las técnicas de ELISA y RT-PCR (IM – RT – PCR) en la detección de los virus PVX, PVY y PLRV.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. EL CULTIVO DE PAPA.

El cultivo de la papa es el principal sistema de producción de clima frío, con alrededor de 170.000 hectáreas sembradas y ocupando el tercer lugar en área sembrada en el país; es considerado como uno de los de mayor importancia de la economía campesina. Varios aspectos hacen que este cultivo sea uno de los más importantes en la actividad agroeconómica nacional, como son la superficie dedicada a este cultivo, la cantidad de productores dedicados a su explotación en todo el país (más de 100.000 familias), la alta generación de empleos directos a nivel rural, su condición de ser la especie eje en la mayoría de sistemas de producción de clima frío, su incidencia positiva en el crecimiento de la agroindustria nacional y en la generación de divisas (Moreno, 1996; Alonso, 2001).

Este cultivo se presenta en regiones de aproximadamente 13°C de temperatura y alturas mayores a 2000 m.s.n.m., incluyendo la zona de páramo, donde se mantiene para controlar su exposición a los áfidos vectores de virus, hecho que ha causado daños a nivel ambiental a este frágil ecosistema. En 1997 los departamentos con mayor área de papa cultivada fueron: Cundinamarca (34.1%), Boyacá (24.7%), Nariño (19.1%) y Antioquia (11.1%) (Alonso, 2001).

Los rendimientos a nivel nacional son en promedio de 16 toneladas por hectárea, aunque existen productores medianos y grandes con producciones iguales o superiores a 30 toneladas por hectárea debido principalmente al uso de tubérculo - semilla certificado libre de virus, al manejo agronómico que le dan al cultivo y a los paquetes tecnológicos que utilizan (Alonso, 2001).

Uno de los principales problemas que presenta el cultivo de la papa en el país es la incidencia de las enfermedades virales, las cuales causan disminución en la producción. Una manera de controlar la incidencia y propagación de dichas enfermedades es el uso de tubérculos - semilla certificados. En Colombia, los productores acostumbran para la siembra utilizar tubérculos provenientes de

cosechas anteriores. El agricultor de las zonas de Nariño, Cundinamarca y Boyacá, utiliza tubérculos – semilla provenientes de lotes comerciales ubicados en las zonas de paramos, los cuales conservan algún grado de sanidad. En otras zonas productoras, como Antioquia y los Santanderes, se registra déficit en la oferta de los mismos, presentándose un aumento en la demanda de tubérculos-semilla certificados (Alonso, 2001).

A nivel mundial, la papa es uno de los productos de mayor consumo, superado únicamente por el trigo, el maíz y el arroz. La producción anual de papa representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todas las raíces y tubérculos (Hawkes, 1990; Moreno, 1996).

Colombia, a nivel latinoamericano, ocupa el primer lugar en área comercial sembrada, volumen de producción, productividad y consumo per. Cápita. Esto se ha logrado gracias a las excelentes condiciones agroecológicas tanto para producción de semilla, como para el consumo (Pineda, 1996).

## **2.2. PROBLEMÁTICA VIRAL DEL CULTIVO.**

La problemática viral se centra principalmente en la baja producción del cultivo y en el degeneramiento de la semilla asexual de papa (tubérculos), lo que conlleva a reducciones en el rendimiento, que van del 10 al 90% dependiendo del grado de contaminación de los tubérculos así como del o los virus presentes (Pereira, 2001). Este problema se agrava cuando el cultivo se mantiene en zonas donde la población de vectores (áfidos, principalmente) es acentuada y en donde se siembra por dos o más generaciones continuas. Estas condiciones se presentan en regiones marginales del cultivo y a menos de 2500 m.s.n.m. (Salazar, 1995; Hernández, 1996; Moreno, 1996; Sánchez, 2000).

La significancia económica del problema viral se centra en dos aspectos, que son la disminución del rendimiento y/o efectos sobre la calidad de procesamiento o mercadeo de los tubérculos. Como regla general, se puede afirmar que los virus que producen síntomas severos en hojas causan mayores pérdidas en rendimiento, versus los virus asintomáticos o los que producen síntomas leves (Salazar, 1995).

Salazar (1995) clasifica los virus que atacan a la papa en dos grupos según su dependencia del cultivo para su sobrevivencia y diseminación: los que

dependen exclusivamente del cultivo (rango de hospedero limitado) y los que no (rango de hospedero amplio). Dentro del primer grupo encontramos, entre otros, a los virus PLRV, PVX, PVY, PVS y al virus del amarillamiento de venas. Estos reducen los niveles de rendimiento de la producción hasta en un 80% cuando se presentan combinados con otros patógenos, como *Phytophthora infestans* (gota) y la roya de la papa (*Puccinia pittieriana*) (Moreno, 1996).

La sintomatología típica producida por cada uno de los virus en papa es difícil de encontrar en campo, debido a que generalmente se presentan mezclas de virus que producen síntomas variados de acuerdo a las combinaciones que se den. En general los virus producen los siguientes síntomas: (Pereira 2001; Sánchez, 2000)

- Cambios en el color de las hojas.
- Deformaciones de las hojas.
- Enanismo.
- Muerte del tejido foliar.
- Necrosis de tallos.
- Necrosis y deformación de tubérculos.

### **2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VIRUS.**

Los virus se definen como complejos nucleoprotéicos conformados por una molécula de ácido nucleico, ya sea ADN o ARN, y una cubierta proteica. Son parásitos obligados de las células y dependen de ellas para su sobrevivencia. (Agrios, 1997; Sánchez, 2000).

La presencia de organismos virales dentro de la planta causa alteraciones en su metabolismo, ya sea por la producción de sustancias anómalas o por la creación de condiciones dañinas para su funcionamiento aunque generalmente sin causarle la muerte (Agrios, 1997).

El 80% de los virus vegetales presentan como genoma un ARN de cadena sencilla positiva, que actúa directamente como ARN mensajero. Estos ARN virales presentan en su extremo 5' ya sea una *CAP* similar a la de un ARNm de células eucarióticas, o una proteína pequeña covalentemente ligada (VPg) cuya función es aparentemente darle estabilidad al genoma y posiblemente estaría implicada en el proceso de encapsidación (Mattews, 1985; Oliveros,



2000). Algunos virus ARN de plantas presentan en su extremo 3' una secuencia de estructura y función similar a un ARN de transferencia, el cual podría cumplir la función de origen de replicación (Maizels, 1994).

Los virus son patógenos pasivos que para sobrevivir han tenido que coevolucionar con los entes biológicos de su entorno, adaptándose entonces a muchas especies cultivadas y silvestres sobre las cuales pueden o no expresar síntomas, y adaptarse a ciertos organismos aéreos y del suelo para ser transportados de una planta a otra y de un cultivo a otro. A grandes distancias los virus generalmente se transportan a través de partes vegetativas infectadas como, tubérculos, estolones, bulbos y esquejes (Sánchez, 2000).

La transmisión de los virus por insectos puede darse de manera persistente (el virus se aloja dentro del sistema circulatorio del insecto y allí permanece vivo en estado de latencia por horas y en algunos casos días), o no persistente (el virus se localiza en el estilete del insecto y allí permanece viable solo por unos minutos). En el primer caso, el agente transmisor son principalmente áfidos en su forma alada (migrantes), lo cual facilita su dispersión por todo el campo; mientras que en el segundo, la dispersión se da a distancias más cortas y es llevada a cabo principalmente por las formas no aladas del áfido llamadas colonizadores, ya sea dentro del cultivo o de plantas vecinas al mismo (Agrios, 1997; Sánchez, 2000).

Casi todos los virus presentan variantes que difieren del virus "tipo" en una o más propiedades. El virus "tipo" no es siempre la variante más estable o ideal; en su mayoría, es la primera que se estudió (Salazar, 1995).

La mayoría de los virus producen infecciones de tipo sistémica dentro de la planta hospedero; es decir infectan una célula inicial, se multiplican y propagan a través del floema a todas las células de la planta (Agrios, 1997; Sánchez, 2000).

Una de las sintomatologías más comúnmente presentada por los virus es la clorosis de las hojas, dada por un decrecimiento en la cantidad de clorofila, lo cual causa una disminución en la tasa fotosintética; el área de la hoja también se ve disminuida. Los virus causan generalmente una caída en la cantidad de hormonas por la inducción de sustancia inhibidoras del crecimiento, además de una disminución en la cantidad de nitrógeno soluble y en los niveles de carbohidratos (Agrios, 1997).

### 2.3.1. Virus X de la papa (PVX).

#### 2.3.1.1. Características generales.

El virus X de la papa (PVX) pertenece al género *Potexvirus*. Morfológicamente es una barra flexuosa de 470 –580 nm de largo y de 11 – 13 nm de diámetro, con simetría helicoidal; su peso molecular es de  $35 \times 10^6$  KDa, su coeficiente de sedimentación es de 15 -130  $S_{20w}$ , su punto isoeléctrico es a pH 4.4 y su densidad de flotación en cloruro de cesio de 1.31 g/cm<sup>3</sup>. Los viriones están compuestos de un 5% de ácido nucleico y 95% de proteínas (Brunt, 1996; Peñaranda, 1996).

El rango de hospedero de PVX se restringe solamente a la familia *Solanaceae*.

De PVX se conocen dos variantes: la HB, que no produce lesiones locales en *Gonphrena globosa* e infecta cultivos de papa con el gen de resistencia de *Solanum acaule* (Rx), y la C, que produce lesiones locales en *Gonphrena globosa* pero no infecta genotipos de papa con el gen Rx (Salazar, 1995).

Existen varias cepas de PVX que se han clasificado en 4 grupos con base en su interacción con los genes *Nx* y *Nb* del hospedero, los cuales en tabaco determinan la respuesta hipersensible (HR) a la infección con PVX. Esta clasificación también tiene en cuenta los síntomas desarrollados en la planta hospedero. Las cepas del grupo 1 inducen respuestas necróticas en cultivos de papa que llevan el gen *Nx* o *Nb*. Los grupos 2 y 3 contienen cepas que producen respuesta hipersensible (HR) en plantas de papa que llevan el gen *Nb*, o el gen *Nx*, respectivamente. Las cepas del grupo 4 superan ambos genes de resistencia. Ciertos autores han comparado esta clasificación con la obtenida mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, y han sugerido una nueva clasificación serológica, con cuatro grupos principales y nueve subgrupos (Acosta *et al.*, 1991; Won *et al.*, 2000).

Las similitudes en la secuencia entre las cepas varían del 83% al 99%, la mayor diferencia se encuentra en el ORF 4.

### 2.3.1.2. Genoma.

Su genoma está formado por una molécula lineal de ARN de sentido positivo, que constituye cerca del 5% de la partícula viral y funciona como ARN mensajero. El extremo 5' presenta un *CAP*, que es un nucleótido metilado ( $m^7G^5'pppGp$ ), mientras que el extremo 3' presenta una secuencia de poli A (Peñaranda, 1996).

Las cepas europeas se caracterizan por tener 6435 nucleótidos, sin contar la cola de poli A (Huisman, 1988), mientras que las suramericanas solo presentan 6342 nucleótidos (Querci, 1993).

Su genoma presenta 5 marcos de lectura abiertos (ORFs), donde el primer ORF codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN, de 147 kDa y requerida absolutamente para la replicación viral. Este primer ORF presenta 4371 nucleótidos de longitud, contiene el motivo NTP que podría ser el sitio de unión del nucleosido trifosfato y se encuentra precedido de 84 nucleótidos correspondientes a la región no traducida (NTR) y (Kim, 1996; Gorbalenya *et al.*, 1988; Won *et al.*, 2000). Parece ser que dentro de este motivo existe una región esencial para la replicación viral, ya que esta región en otros virus codifica para la actividad de ARN helicasa necesaria para desenrollar el ARN duplex formado durante la replicación (Zaccomer, 1995; Davenport, 1997). Este ORF también presenta el motivo conservado GDD (Gly – Asp- Asp), que se cree participa en la función catalítica de la replicasa (Hodgman, 1988), siendo así una región esencial para la replicación viral (Kim, 1996).

El segundo marco de lectura codifica para una proteína de 25 KDa que presenta homologías con motivos de helicasa; tiene actividad de ATPasa y de unión al RNA (Roouleau *et al.*, 1994; Katinina *et al.*, 1996; Bleykasten *et al.*, 1996; Donald *et al.*, 1997). Los ORF 3 y 4 codifican para proteínas de 12 KDa y 8KDa respectivamente, las cuales están involucradas en el movimiento del virus y presentan dominios hidrofóbicos (Sepparen *et al.*, 1997). Los ORF 2, 3 y 4 están sobrelapados y conforman el llamado triple gen block (TGB), involucrado en el transporte del virus célula a célula. En el TGB se presenta un segundo motivo de NTP (Zaccomer *et al.*, 1995)

Por último encontramos el ORF 5 que codifica una proteína de 25KDa que corresponde a la proteína de la cápside, involucrada además en la expansión de PVX a través de la planta (Won, *et al.*, 2000). En el extremo 3' presenta una región no codificante (NTR) de 72 nucleótidos (Kim, 1996) (Figura 1). La proteína

producida por el ORF2 se expresa como producto del ARN subgenómico de 2Kb (Figura 1). El ARN subgenómico puede formarse posiblemente por clivaje en puntos cercanos al codon de inicio del ORF sobrelapado, generando ARNs cortos capaces de traducir este ORF y los localizados corriente abajo del mismo. Otra posibilidad puede ser que la transcripción no comience en el extremo 5' sino en regiones internas del genoma (Matthews, 1991; Ashoub, 1998).

El primer ORF esta precedido por una secuencia líder de 84 pares de bases (NTR), la cual contiene múltiples señales regulatorias en *cis*. En estudios de traducción, Smirnyagina *et al.*, (1991; citado por Kim, 1996) definen la región NTR como dos regiones: la secuencia  $\alpha$  que va de los nucleótidos 1 al 41 (excluyendo la estructura *CAP*), la cual es rica en AC y contiene varias repeticiones ACCA común en todos los potyvirus aunque de diferente tamaño, y la secuencia  $\beta$ , que va de los nucleótidos 42 a 83. Elementos dentro de esta región modulan la traducción eficiente y aumenta la traducción de genes reporteros *in vitro* e *in vivo* (Kim, 1996). Huisman *et al.* (1988) sugieren que el RNA del virus PVX es traducido *in vivo* por medio de la estrategia Readthrough, a través de un codon de terminación ocre dando origen a dos productos de 166 KDa y 191KDa, correspondientes a los polipéptidos de 145 y 180 KDa reportados en estudios *in vitro*. Los viriones contienen RNA genómico, sin embargo en tejido infectado se encuentran RNA subgenómicos de 0.9, 2.1, 1.4, 1.8, 3.0 y 3.6 Kb, todos ellos portadores del extremo 3' presente en el genoma completo. Estudios *in vivo* han sugerido que la cubierta proteica se traduce del RNA subgenómico de 0.9 Kb, la proteína de 25 KDa es expresada como producto de una traducción simple del RNA subgenómico de 2.1 Kb, y las proteínas de 12 KDa y 8 KDa son expresadas de la misma forma por el RNA subgenómico de 1.4 Kb (Dolja, 1987; Huisman, 1988; Morozov, 1991; Zaccomer, 1995; Peñaranda, 1996).

Los virus ARN de sentido positivo necesitan una replicasa para producir ARN complementario de sentido negativo, que luego es transcrito para producir la progenie de ARN de sentido positivo o especies de ARN subgenómico. El ARN subgenómico sirve para expresar cistrones internos. Seis ARNs subgenómicos han sido obtenidos de extractos de hojas infectadas y se observan en microscopia electrónica de extractos puros del virus como fragmentos del mismo de 6 diferentes tamaños (290, 240, 170, 140, 110 y 75 nm), demostrando así la naturaleza multipartita de PVX. Estos fragmentos se ha demostrado que son formados durante la infección de PVX (Beachy & Zaitlin, 1977; Nassuth *et al.*, 1983 citado por Duplat, 1998; Price, 1993), sin embargo esta hipótesis resulta incongruente con la organización genómica del virus, ya que este como se dijo antes, presenta 5 marcos de lectura. Price (1993) propone que PVX lo que hace

es sintetizar y encapsidar ARNs subgenómicos no necesariamente para la infección, lo cual también se ha observado sucede en el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV).

Existen algunas evidencias que sugieren que la proteína de 166 KDa en PVX tendría importancia funcional para la replicación viral (Huisman *et al*, 1988), puesto que contiene la secuencia de aminoácidos GKS, la cual poseen las proteínas que funcionan como ARN polimerasas dependientes de ARN; en estudios mutacionales sobre esta se ha impedido la replicación viral (Peñaranda, 1996).

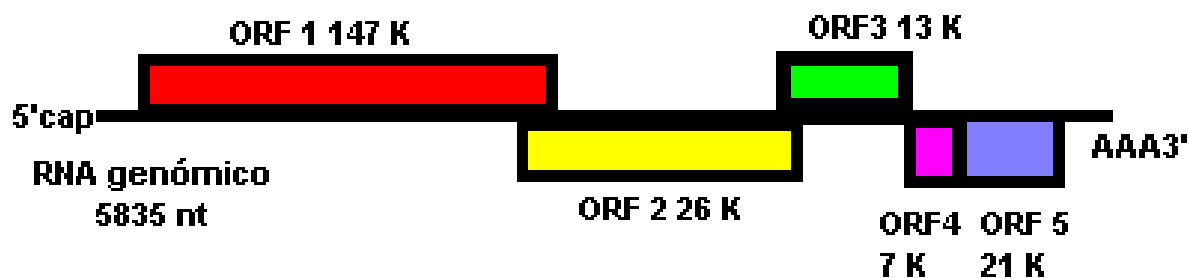


Figura 1. Genoma de PVX.

### 2.3.1.3. Modo de infección.

La transmisión de PVX se da de forma mecánica por contaminación en los equipos de riego, la maquinaria, contacto raíz con raíz, retoño a retoño entre plantas heridas infectadas y plantas sanas heridas, o con equipos de siembra corto punzantes contaminados, o por masticaduras de insectos. Hasta la fecha no se conoce ningún vector que lo transmita. No es transmitido ni por semilla sexual ni por polen (Salazar, 1995; Brunt, 1996; Peñaranda, 1996; Pereira, 2001).

### 2.3.1.4. Sintomatología.

Después del primer ciclo de infección, el virus usualmente no causa síntomas en muchos cultivares y puede ser propagado en los tubérculos sin ser percibido. A pesar de esto, su presencia puede disminuir la producción hasta un 15 % (Banttari, 1996)

Las plantas afectadas en forma sistémica y luego de varios ciclos de siembra,

en algunos casos presentan zonas cloróticas o de mosaico entre las nervaduras de las hojas; este mosaico puede ser imperceptible, medianamente perceptible y adicionalmente se pueden presentar hojas arrugadas en períodos de baja intensidad de luz y de bajas temperaturas. La sintomatología depende de la cepa viral, la variedad de papa y de condiciones ambientales. Existe una correlación positiva entre la severidad de la sintomatología y la concentración viral. Cuando el virus actúa sinérgicamente con el virus Y o A, se pueden presentar arrugas en las hojas, mosaico rugoso o color pardo de las hojas (Bantari, 1996; Peñaranda, 1996; Sánchez, 2000).

Las cepas de PVX que se encuentran en el país son consideradas suaves y de síntomas muy tenues de difícil apreciación, aunque existen brotes de cepas aun más severas que causan moteamiento en las hojas (Sánchez, 2000). Por su efecto sinérgico con otros virus mas severos como PLRV, puede causar pérdidas mayores en el cultivo, que pueden llegar hasta un 61.2%, tal como lo demostró Guerrero en 1978.

### **2.3.2. Virus Y de la papa (PVY).**

#### **2.3.2.1. Características generales.**

Pertenece al género *Potyvirus*, son partículas filamentosas y flexuosas sin envoltura de diámetro de 750 x 11 nm; su simetría es helicoidal (Robaglia *et al.*, 1988).

El virión contiene una molécula lineal simple de ARN de sentido positivo de 9704 nucleótidos, que codifica una poliproteína de 3063 aminoácidos; el ARN representa el 5% del peso del virión (Robaglia *et al.*, 1988).

Dentro de las cepas reportadas encontramos PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> y PVY<sup>N</sup>. Análisis de secuencia sobre la región 5' no codificante (5' NTR), dividen los aislados de PVY en tres grupos: el grupo I comprende los aislados que producen necrosis venial en tabaco (PVY<sup>NTN</sup>), el grupo II contiene los aislados que producen ya sea necrosis venial en tabaco (PVY<sup>N</sup>) o mosaicismos (PVY<sup>O</sup>) y el grupo III aquellos que producen mosaicismos en tabaco y están relacionados con aislados turcos (Tordo *et al.*, 1995).

### 2.3.2.2. Genoma.

Su genoma se traduce en una poliproteína de 3063 aminoácidos, la cual es subsecuentemente procesada por un clivaje proteolítico en pequeñas proteínas funcionales, tal como lo sugieren estudios de traducción *In Vitro*. El clivaje es mediado por la actividad en *cis* y en *trans* de un grupo de tres proteasa virales (P1, HC – Pro y NIa) (figura 2) (Robaglia *et al.*, 1988; Tordo, 1995; Zaccomer, 1995; López - Moya *et al.*, 1999).

La estructura general del genoma comprende una región no codificante en el extremo 5' (5'NTR) rica en AU y cuya función principal es la de amplificar las señales de traducción del virus, probablemente gracias a la formación de estructuras secundarias estables. Presenta un motivo de 24 nucleótidos conservado, presente también en la región 5'–NTR del TMV (región líder  $\omega'$ ) (Nicolás y Laliberté, 1992; Tordo, 1995; Zaccomer, *et al.*, 1995; López – Moya, *et al.*, 1999). Unida al extremo 5' encontramos la proteína VPg de 24 KDa, codificada por el virus, la cual parece ser un determinante de patogenicidad y estaría también implicada en el proceso de replicación viral (Riechmann, *et al.*, 1992; Daros, *et al.*, 1999).

Hacia el extremo 3' encontramos la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína P1, de 31 KDa, la cual es una proteasa viral similar a las proteasa de serina; la P1 es responsable de su propio clivaje en la porción C- terminal (Tordo, 1995; López- Moya *et al.*, 1999). Esta proteína es capaz de unirse al RNA viral de una forma independiente de secuencia y esta involucrada en el movimiento célula a célula del virus (Riechmann *et al.*, 1992).

La siguiente proteína es la HC-Pro, de 50 KDa, cuya principal función es suprimir el sistema de defensa de la planta, es además el factor de transmisión del áfido y esta involucrada en el movimiento célula a célula del virus (Kasschau, 1998; Voinnet, 1999; Voinnet, 2000; Carrington, 2001). HC-Pro presenta un arreglo similar a la forma dedos de Zinc presente en varias proteínas. Este cluster contiene residuos de cisteína e histidina involucrados en las diferentes conformaciones de unión, además de adoptar una estructura secundaria en forma de alfa-hélice, la cual ha sido observada en otros motivos de dedos de zinc. La mitad carboxi de la proteína es una proteasa de cisteína del grupo de la papaína, la cual cliva autocatalíticamente su propia región C -terminal (Rabaglia *et al.*, 1988; Desviez *et al.*, 1999).

La proteína siguiente es la de inclusión citoplasmática (CI), la cual, como su

nombre lo indica, forma las diferentes inclusiones citoplasmáticas dentro de la célula. Tiene actividad ATPasa dependiente de ARN y en su secuencia incluye un motivo de unión a nucleótido, por lo cual se le ha considerado como una helicasa viral de ARN (Lain *et al.*, 1990). Funcionalmente se piensa que CI actúa durante la replicación en la separación de las cadenas de ARN. Se la ha encontrado igualmente en asociación con la membrana citoplasmática y el plasmodesmo en estados tempranos de la infección. Es requerida también para la traslocación del virus célula a célula (Riechmann, *et al.*, 1992)

Más hacia el extremo 3' se encuentra la secuencia para una proteasa de 27 kDa de tipo serina (Nla), involucrada en el clivaje de al menos una parte de la poliproteína y estructuralmente relacionada con la proteasas de serina. Su punto de clivaje es una secuencia conservada de siete residuos localizados a 24 posiciones corriente abajo de la porción C terminal dentro del dominio de proteasa (Darós *et al.*, 1999). Este corte produce dos fragmentos: uno que corresponde a la proteína VPg y el otro al dominio Nla – Pro (proteasa) de aproximadamente 27 kDa (Zaccomer, 1995; López – Moya *et al.*, 1999). Entonces, la VPg es procesada a partir de un bifuncional VPg – Nla con un dominio VPg N – terminal y un dominio C – terminal proteinasa (Zaccomer, 1995). La proteína Nla también es la encargada de formar los cuerpos de inclusión nuclear (Daros, *et al.*, 1999).

La proteína siguiente es una replicasa de 58 kDa (Nlb), involucrada en la replicación del ARN como ARN polimerasa dependiente de ARN (Daros *et al.*, 1999)

La última proteína es la de la cápside, de 30 kDa. Esta proteína posee varias funciones: esta involucrada en la protección del ARN formando la estructura morfológica característica de los potyvirus, esta implicada en la transmisión por áfidos en interacción con la HC – Pro a través de un motivo altamente conservado DAG presente en su secuencia, y participa en el movimiento célula a célula y a larga distancia durante la translocación del virus en la planta (Atreya *et al.*, 1990; Robaglia *et al.*, 1988; Desvieux *et al.*, 1999).

En el extremo 3' se encuentra una región no codificante (3'UTR) de aproximadamente 200 b, rica en AU, la cual podría estar involucrada en el proceso de replicación y en la expresión de los genes virales. Seguida a esta secuencia una cola de poli A, que tiene como función, además de proteger el genoma viral frente al ataque de ribonucleasas celulares, la regulación de la traducción de los genes virales y ser un factor importante de infectividad y



patogenicidad (figura 2) (Zaccomer *et al.*, 1995; Tacahashi y Uyeda, 1999; López – Moya *et al.*, 1999).

Comparaciones de secuencias proteicas con otros potyvirus, muestran que la primera proteína (PI), la tercera (CI) y la región N- terminal de la proteína de la cápside son las regiones más variables entre las poliproteinas potyvirales (Tordo, 1995).

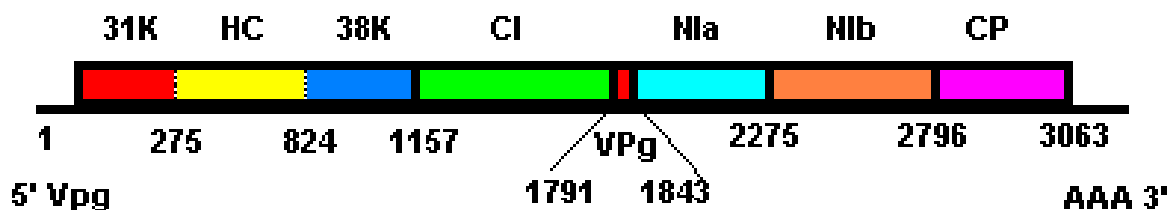


Figura 2. Genoma de PVY.

### 2.3.2.3. Modo de infección.

PVY, al igual que PLRV y algunas cepas de PVS, es transmitido de manera no persistente por áfidos, principalmente por las especies *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*; aunque también puede transmitirse mecánicamente por contacto entre hojas heridas (Banttari, 1996; Sánchez, 2000).

Puede infectar tabaco, papa, pimentón y tomate, así como especies silvestres de la familia *Solanaceae* (Tordo, 1995).

De las cepas reportadas, solo PVY<sup>C</sup> no se transmite fácilmente por áfidos

### 2.3.2.4. Sintomatología.

La presencia de PVY se reconoce por el color negruzco de las nervaduras de las hojas por el envés y el deformamiento de las hojas menores.

PVY<sup>N</sup> causan necrosis venial en tabaco y moteado como síntoma primario, mientras que PVY<sup>O</sup> solo mosaico y moteado (Tordo, 1995; Salazar, 1995).

La cepa PVY<sup>C</sup> comprende los aislados de PVY que inducen rayado punteado en cultivos de papa que contienen el gen *Nc*. En *Nicotiana tabacum*, sus síntomas son similares a los de la cepa PVY<sup>O</sup> (Tordo, 1995).

En general, PVY no presenta sintomatología en tubérculo, a excepción de la cepa PVY<sup>NTN</sup>, variante de PVY<sup>N</sup>, que causa anillos necróticos en los tubérculos (Tordo, 1995; Salazar, 1995).

La presencia de PVX y PVY en algunos casos severos se puede presentar entorchamiento, manchas visibles o moteado rugoso, que puede ir acompañado con una disminución drástica del crecimiento de las plantas (Sánchez, 2000).

### **2.3.3. Virus del enrollamiento de las hojas de la papa (PLRV).**

#### **2.3.3.1. Características generales.**

El virus del enrollamiento de las hojas (PLRV) pertenece al género *Polerovirus*; familia *Luteoviidae*. Son partículas isométricas de 26 nm de diámetro y perfil hexagonal, pertenece al subgrupo 2 de los luteovirus; su simetría es icosaédrica. Su masa relativa es de  $6.5 \times 10^6$  kDa; su densidad es de 1.38 en CsCl, su punto isoeléctrico es a pH 5.3 y su cociente  $A_{260}/A_{280}$  es de 1.8 (Brunt, 1996; Ashoub, 1998; Pringle, 1998).

#### **2.3.3.2. Genoma.**

Su genoma es un ARN de cadena positiva simple monopartita. Contiene aproximadamente 5900 nucleótidos, no poseen extremo poli A (Brunt, 1996). Presenta una pequeña proteína unida covalentemente al extremo 5' (VPg).

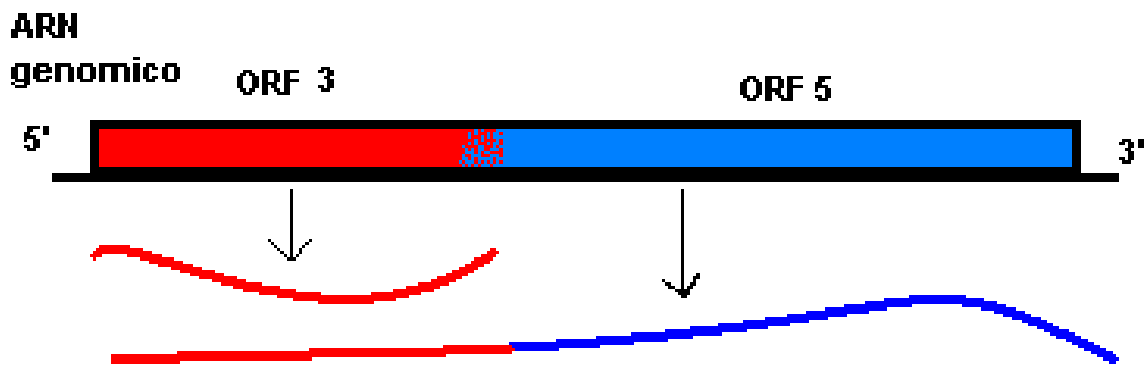
Su genoma hasta hace poco se decía que estaba compuesto por 6 ORFs, separados en dos clusters por una región intergenómica. El primero comprende los ORFs 0, 1 y 2 y se considera una región divergente en la familia *Luteoviridae*, mientras que el segundo cluster, formado por los ORFs 3 al 5, es el más conservado. El RNA genómico sirve como ARNm de los ORF 0, 1 y 2. Para la

traducción de los ORF 3 al 5, es necesario un ARN subgenómico (ARNsg<sub>1</sub>) de 2500 nucleótidos. Esta estrategia es utilizada por todos los luteovirus conocidos. Recientemente se ha encontrado que además se necesita un segundo ARN subgenómico (ARNsg<sub>2</sub>) de aproximadamente 800 nucleótidos, el cual codifica para dos proteínas virales correspondientes a los ORFs 6 y 7 descritos últimamente (Zarccomer, 1995; Ashoub, 1998; Rodhe, 2001).

Además de utilizar la estrategia de RNA subgenómico para la traducción de algunas de sus proteínas, PLRV emplea también la estrategia de readthrough para otras proteínas cuyos ORFs están fusionados, es decir, presentan la misma pauta de lectura (Zaccomer, 1995).

El mecanismo de readthrough consiste en un proceso en el cual el codon de terminación del ORF izquierdo (codón ámbar UGA) puede “pasarse”, gracias al apareamiento con el ARNt supresor, y llevar la traducción hasta el siguiente codon de terminación aguas abajo del primero, dando lugar a un segundo polipéptido funcional más grande (Banher, 1990; Matthews, 1991) (Figura 3). Esta estrategia es utilizada por PLRV para la expresión de los productos proteicos de los ORF 3, 5 y 7, correspondientes a la proteína de la cápside, al factor de transmisión del áfido y a un regulador de la transcripción, respectivamente. La supresión del codon de parada ámbar (UGA) del gen de la cápside, resulta en la formación de una proteína por readthrouh (ORF3/ORF5), la cual se supone es el factor de transmisión del áfido. Esta proteína es de 80 K y da lugar a componentes más pequeños por presumiblemente clivaje proteolítico de las secuencias C – terminal (Bahner, 1990; Ashoub, 1998).

El ORF 3 presenta un codon de iniciación AUG interno, pero con diferente marco de lectura, lo que permite la síntesis de la proteína del movimiento codificada por el ORF 4. Esta proteína es traducida a partir del ARN subgenómico 1 (ARNsg 1) por una iniciación de la traducción interna, la cual *in vitro* es siete veces más eficiente comparada con la de la proteína de la cápside (Sokolova, 1997).

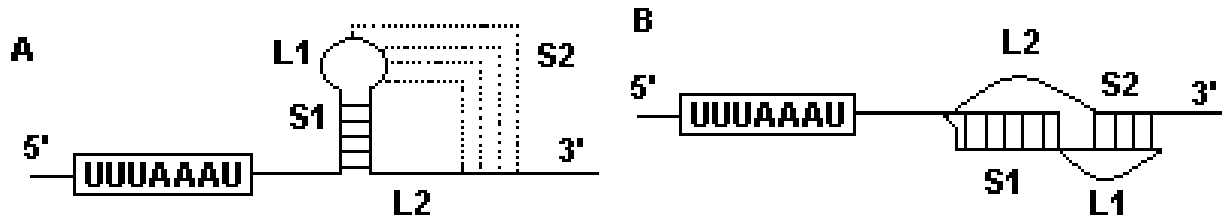


**Figura 3.** Mecanismo general de readthrough. Las líneas de colores representan las proteínas codificadas por los ORF 3(rojo) y ORF5 (azul).

Otra estrategia utilizada por PLRV son los saltos que ocurren durante el proceso de traducción, que llevan a un cambio en la pauta de lectura del polipéptido que está siendo alargado (frameshift). Esta estrategia es frecuentemente empleada por los virus para la expresión de proteínas que se encuentran en marcos de lectura distintos y superpuestos. El cambio es posible gracias a la presencia en el ARN de una secuencia de deslizamiento (UUUAAAU), en donde ocurre el cambio en la pauta de lectura. Para que el deslizamiento ocurra, es necesario que el ribosoma se detenga, lo cual se logra, en el caso de PLRV, por la presencia de una secuencia corriente abajo que puede tomar la conformación ya sea de seudonudo o de bucle con tallo (stem-loop). El cambio de lectura involucra un "salto resbaladizo" del ARNt peptidil, ubicado en el sitio P del ribosoma.

Este tipo de expresión es usada para la síntesis de la ARN polimerasa dependiente de ARN (ORF1), la cual se expresa por un cambio en el marco de lectura en una posición hacia atrás (frameshift -1), donde el ORF 1 y 2 se superponen (figura 4) (Kujawa, 1993; Zaccomer, 1995).

Estos saltos de lectura involucran un simultáneo "salto resbaladizo" del ARNt aminoacil y del ARNt peptidil. Tal "salto" puede mantener estable la interacción con el codón por al menos dos o tres nucleótidos de cada uno de los dos anticodones (García, 1993; Kujawa, 1993).



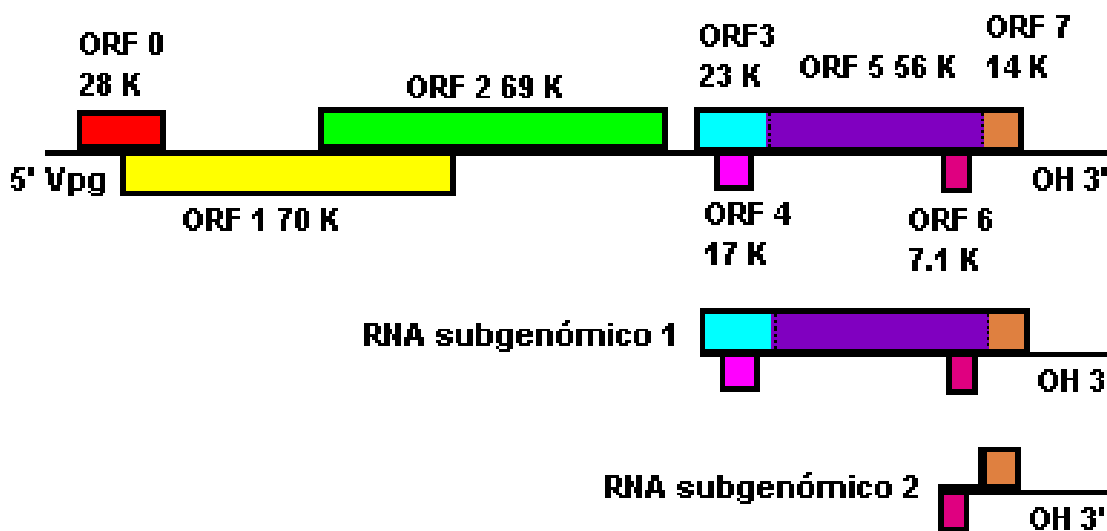
**Figura 4. Estructura general de una secuencia en seudonudo implicada en el salto de lectura.** A. plegamiento en una estructura de tallo con argolla. Se indican en líneas discontinuas las regiones apareadas. B. plegamiento en una estructura de seudonudo. S1 y S2 representan el tallo 1 y el tallo 2, mientras que L1 y L1 son las argollas 1 y 2 del seudonudo. Se muestra la secuencia de deslizamiento de PLRV (Tomado de García, 1993)

La replicación de PLRV, al igual que la de todos los virus ARN, tiene lugar en el citoplasma (Brunt, 1996).

Los ORFs presentes en el genoma codifican y presentan las siguientes características: el ORF 0 codifica una proteína de 28 kDa de función desconocida, comienza en la posición 70 con el codon de inicio AUG, y termina en la posición 811 con el codon de parada UGA (codon de parada ambar). El ORF 0 se sobrelapa con el ORF1 en la posición 203. Esta involucrado en el desarrollo de sintomatologías; el ORF 1 codifica una proteína de 70 kDa, que contiene motivos de helicasa y funciona como precursora de la VPg; el ORF 1 termina con el codon de parada UGA en la posición 2120. El ORF 2 codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN de 69 kDa, termina con el codon de parada UGA en la posición 3388. Los productos de ORF 1 y ORF 2 son prerequisite para la replicación de PLRV. Estos dos ORFs se sobrelapan en 582 nucleótidos (figura 5). El ORF 2 posee un motivo conservado GDD presente en todas las replicasas de virus vegetales ARN. Como este ORF no presenta codon de iniciación (AUG), su expresión debe realizarse por métodos no convencionales como los saltos de lectura (Wilk, *et al.*, 1989; Kujawa, 1993; Ashoub, 1998).

El ORF 3 codifica para la proteína de cápside de 23 kDa y esta separado del ORF 2 por una región no codificante de 197 nucleótidos comprendida entre las posiciones 3588 y 4212. El producto de 17 KDa, codificado por el ORF 4, es una proteína de movimiento que posee propiedades de unión al ácido nucleico y tiene una afinidad intrínseca por la región plasmodesmal que conecta las células del parénquima del floema con el complejo de células acompañantes. Para su funcionamiento, sufre una fosforilación gracias a una proteína Kinasa. El ORF 4 se encuentra dentro del ORF 3 entre las posiciones 3613 a 4081. El ORF 5

codifica una proteína de 56 kDa que es posiblemente el factor de transmisión del áfido y termina con el codon UGA en la posición 5739 (Wilk, *et al.*, 1989; Sokolova, 1997; Rodhe, 2001). La función de la proteína codificada por el ORF6 no es conocida, sin embargo, mutaciones del mismo realizadas en el virus BYDV resultan en variantes no infectivas. El ORF 7 corresponde a la región C terminal de la proteína sintetizada por readthrough del ORF 5 y se considera que participa en la regulación de la transcripción de los luteovirus, además de tener propiedades de unión al ácido nucleico (Ashoub, 1998) (figura 5)



**Figura 5. Genoma de PLRV.** El diagrama muestra la estrategia de expresión de PLRV para la transcripción de los dos RNAs subgenómicos. Las líneas punteadas indican aquellos ORFs que utilizan el readthrough como mecanismo de traducción (Adaptado de Rohde W, Prüfer D. Max Planck institute for Plant Breeding Research. [www.mpiz-koelm.mpg.de](http://www.mpiz-koelm.mpg.de).

### 2.3.3.3. Modo de infección.

PLRV es transmitido de forma persistente y circulativa por el áfido *Myzus persicae*. Sulz; es decir, que después de que el áfido lo adquiere, este es capaz de transmitirlo por el resto de su vida. Existe un período de latencia entre la adquisición y la inoculación, tiempo necesario para que las partículas del virus crucen la pared del estómago y entren en las glándulas salivares; este periodo va de 12 horas a varios días. Una vez en la planta, permanece restringido al floema donde se replica. No es transmitido de manera mecánica, aunque puede ser transmitido por injerto. (Banttari, 1996; DiFonzo, 1996; Pereira, 2001;

Rohde, 2001).

#### **2.3.3.4. Sintomatología.**

PLRV es uno de los virus más devastadores de la papa. La infección primaria se da durante el desarrollo del cultivo en plantas provenientes de tubérculos sanos, que sufrieron contaminación en el campo posterior a la siembra. Sus síntomas son evidentes en la porción apical de las plantas, donde se presenta palidez y enrollamiento ligero de las hojas. La infección secundaria, presente en plantas provenientes de tubérculos infectados durante primera siembra, se manifiesta en las hojas de la base de las plantas y progresa hacia arriba conforme ellas crecen. Las plantas se caracterizan por un crecimiento erecto, enanismo, enrollamiento severo de las hojas basales, hojas superiores pálidas, cambio en la textura (coriácea) y en el color de las hojas (Salazar, 1995; Agrios, 1997; Pereira, 2001).

#### **2.3.4. Virus S de la papa (PVS).**

##### **2.3.4.1. Características generales.**

PVS pertenece al género *Carlavirus*. Son partículas filamentosas de 650 x 12 nm y su simetría es helicoidal. El peso del virión es de cerca de  $60 \times 10^6$  KDa, su cociente de absorbanza  $A_{280}/A_{260}$  es de 1.1/ 1.3 y su densidad en cloruro de cesio es de  $1.31 - 1.33 \text{ g cm}^{-3}$  (Brunt, 1996; Zavriev, 1999).

Su distribución en la planta no es específica de tejido; las partículas se encuentran principalmente en el citoplasma y algunas veces forman grandes agregados bandeados. Las partículas virales no se han encontrado en el núcleo, cloroplastos, ni en ningún organelo (Zavriev, 1999).

De PVS se reconocen dos variantes: la andina, que solo difiere de la europea (común) por infectar sistémicamente a *Chenopodium quinoa* y a *C. amaranticolor* (Salazar, 1995).

#### 2.3.4.2. Genoma.

El virión contiene una molécula lineal simple de ARN de 7.4 Kb de tamaño y monopartita. El RNA genómico tiene cola de poli A en el extremo 3'; contiene seis ORFs que codifican para polipéptidos de 223 kDa, 25 kDa, 12kDa, 7 kDa, 34 kDa y 11 kDa respectivamente (Brunt, 1996; Zavriev, 1999).

El virus forma cantidades menores de ARN subgenómicos de 2.5 y 1.5 Kb, los cuales están incluidos en la partícula flexuosa filamentosa del virus. El más pequeño codifica para la proteína de la cápside y la de 11 KDa; este RNA subgenómico tiene una secuencia líder con función de enhancer traduccional (Matousek *et al*, 2000).

Poco se conoce acerca de su mecanismo de replicación, aunque plantas infectadas con virus de esta familia, incluyendo PVS, contienen formas replicativas de doble cadena de ARN (Zavriev, 1999).

Solo el ORF 1 se expresa a partir del RNA genómico (ARNg), las demás proteínas se expresan por medio de RNA subgenómicos de 2.5 y 1.5 Kb de longitud. Ambos ARNsg son 3' coterminal con el ARN genómico y poliadenilados. Esto hace suponer que los ORF 2, 3 y 4 son expresados por el ARNsg de 2.5 Kb y los ORF 5 y 6 por el de 1.5 Kb. En el caso de PVS, la secuencia de 101 nucleótidos aguas arriba del codon de iniciación AUG de la proteína de la cápside, actúa como enhancer traduccional *in vitro* e *in vivo* (Zavriev, 1999).

El primer ORF, que codifica para la replicasa, solo ha sido secuenciado parcialmente por no contarse con un fragmento completo de su extremo 5'. Presenta dominios metiltransferasa, NTP –helicasa y proteinasa, este último con actividad autocatalítica. Es homóloga con la región C – terminal de la replicasa viral de PVX y del virus del mosaico blanco del trébol (Mackenzie *et al.*, 1989; Zavriev, 1999).

Los ORF 2, 3 y 4 codifican para el triple gen block, que tiene similitud con el presente en PVX y codifica proteínas que facilitan el movimiento célula a célula del virus. El ORF 2, como en la familia *Potexvirus*, presenta también un dominio NTP – Helicasa y contiene, al igual que el ORF3, una región altamente hidrofóbica que puede asociarse con membranas en la planta (Mackenzie *et al.*, 1989; Zavriev, 1999).

El polipéptido de 34 kDa es la proteína de la cápside. Es similar en un 59% en sus



70 aminoácidos centrales a la secuencia homóloga en PVX, a pesar de no ser serológicamente relacionado con este virus. La función de esta región es la de mantener la estructura terciaria de la proteína de la cápside correcta e interactuar con el ARN viral (Mackenzie *et al.*, 1989; Zavriev, 1999).

La función del polipéptido de 11 kDa, codificado por el ORF 6, no se conoce con certeza, aunque codifica una proteína rica en cisteína que contiene motivos de dedos de zinc. Las posibles funciones de esta proteína serían ayudar en la incorporación al vector, en el ensamblaje inicial del virus y en la regulación de la transcripción y traducción del genoma. Por último, el genoma de PVS presenta secuencias no codificantes de 70 nt seguida de la cola de poli A, y de 38 y 21 nt entre los tres bloques de secuencias codificantes (Brunt, 1996; Zavriev, 1999) (figura 6).

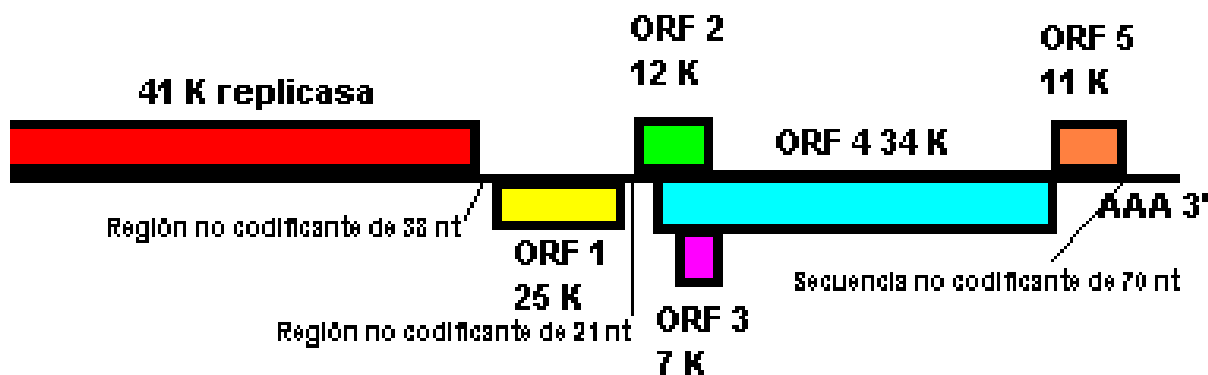


Figura 6. Genoma de PVS.

#### 2.3.4.3. Modo de infección.

Como PVX, PVS es transmitido de manera mecánica principalmente por contacto con superficies contaminadas aunque algunas variantes pueden ser transmitidas por áfidos (*Myzus persicae*) de manera no persistente. Infecta miembros de la familia *Solanaceae* y *Chenopodiaceae* principalmente. No es transmitido por semilla (Salazar, 1995; Brunt, 1996; Zavriev, 1999; Matousek *et al.*, 2000).

#### **2.3.4.4. Sintomatología.**

La presencia de PVS se caracteriza por una depresión ligera de las venas, bronceado de las hojas y un tipo de crecimiento abierto. Algunos cultivares pueden presentar manchado necrótico o estriado. Sus síntomas se pueden considerar leves y de difícil detección, en algunos casos llegando a ser asintomático. Puede llevar a pérdidas en la producción del 10 al 20% (Salazar, 1995; Brunt, 1996; Banttari, 1996; Zavriev, 1999; Pereira, 2001).

### **2.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN.**

#### **2.4.1. Microscopía electrónica.**

La microscopía electrónica constituye un recurso muy valioso en la detección de virus en plantas. Se puede emplear en cualquier etapa del cultivo, ya sea en *ex vitro* o *in vitro* (Castro, 2000).

Dentro de las técnicas más generalizadas, cabe mencionar la observación directa de partículas virales en extractos vegetales ("dip method"), la inmunoelectromicroscopía (IEM) y la observación de cortes ultrafinos de tejidos vegetales (donde se observan, ya sea el patógeno directamente, o las anomalías citológicas, inclusiones virales y efectos histopatológicos que se pueden presentar en la célula y que son una secuela producto de la replicación del virus) (Castro, 2000).

Para la observación directa por microscopía electrónica de transmisión, el material vegetal con sintomatología aparente es fijado en glutaraldehído. La muestra se incluye en resinas sintéticas y se practican cortes 10 veces más delgados que los de microscopía de luz. La tinción se realiza con sales de metales pesados, como citrato de plomo, tetróxido de Osmio o acetato de Uranilo, que permiten un contraste adecuado del tejido bajo el haz de electrones (Chuaqui, 2001).

Este método, aunque se encuentra limitado a laboratorios muy especializados, tiene ventajas en su rapidez y en su resultado inequívoco, ya que da una muestra tangible de la presencia viral, aunque esto depende de la habilidad

del técnico para preparar y manejar la muestra sin alterar las partículas virales (Salazar, 1995).

## **2.4.2. Métodos serológicos (ELISA).**

### **2.4.2.1. Generalidades.**

El ensayo de inmunoabsorción con conjugados enzimáticos (“enzyme –Linked immunosorbent Assay” ELISA) se basa en la producción de un conjugado anticuerpo – enzima, en el cual ambas moléculas retienen sus propiedades individuales. El anticuerpo se adhiere al antígeno, mientras que la reacción enzimática revela y amplifica tal reconocimiento. La enzima cataliza la conversión de sustratos a productos, pero la enzima no es consumida en el proceso. La enzima continúa actuando sobre más sustrato y produce miles de productos coloreados. Así, los antígenos son detectables cuando se presentan solamente en cantidades de nanogramos y picogramos.

Los anticuerpos reaccionan específicamente con el antígeno uniéndose a una pequeña porción de él conocida como determinante antigénico. Cada antígeno, como cada virus, tiene diferentes determinantes antigénicos en su superficie, formados por grupos de 6 a 12 aminoácidos, y cada uno de ellos prescribe la producción de diferentes tipos de anticuerpos en el suero. Si el suero contiene diferentes anticuerpos, la mezcla se denomina anticuerpo policlonal; mientras que si el suero presenta solo un tipo de anticuerpo, tal mezcla se denomina anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos policlonales reaccionan con el mismo antígeno, pero en diferentes áreas de su superficie, y el monoclonal solo en una (Salazar, 1995; Agrios, 1997).

### **2.4.2.2. Tipos de ELISA.**

Varios tipos de ELISA han sido descritos y se aplican de acuerdo con las necesidades de la investigación o aplicación. El más usado es el sándwich de doble anticuerpo (DAS – ELISA), aunque también es común el uso de membranas de nitrocelulosa (NMC) y el ELISA indirecto. En este último, la enzima empleada en la detección se conjuga a un anticuerpo antiglobulina, el cual se ha preparado contra el virus. Si el primer anticuerpo se obtuvo de un conejo, el segundo anticuerpo se obtiene por la inoculación de estos anticuerpos en un

ratón, de esta manera el segundo anticuerpo marcado enzimáticamente reacciona con muchos anticuerpos específicos dirigidos contra varios virus (Clark & Bar – Joseph, 1985 citado en Duplat, 1988).

**Elisa de doble anticuerpo (DAS -ELISA).** Esta técnica consiste en cuatro pasos principales: (Jayansinghe, 1993; Salazar, 1995) (Figura 6)

1. Recubrimiento de las placas de poliestireno con los anticuerpos específicos para el virus (IgG), dejándola incubar un tiempo prudencial para permitir la fijación de los anticuerpos a la placa. Luego se realiza un lavado posterior con PBS- Tween para retirar los restos de anticuerpo no fijados.
2. Preparación de las muestras y adición a la placa. La extracción se hace por maceración del tejido vegetal (principalmente hojas) en un buffer de extracción, para luego colocar una alícuota en la placa que ha sido previamente tratada con el anticuerpo. Como en el paso anterior, la placa se deja incubando por un tiempo prudencial para permitir que la reacción antígeno – anticuerpo se produzca.
3. Colocación del anticuerpo conjugado. Luego de retirar por medio de un lavado los restos de antígenos que no han sido fijados al primer anticuerpo, se coloca un segundo anticuerpo específico contra el antígeno, el cual está conjugado con una enzima (principalmente la fosfatasa alcalina). Este segundo anticuerpo se deja actuar por un tiempo prudencial para permitir la formación del complejo, para luego retirar por medio de un lavado los anticuerpos conjugados que no han reaccionado.
4. La reacción es revelada colocando el sustrato específico para la enzima, el cual para la fosfatasa alcalina es el p – nitrofenil fosfato (PNP). Otras combinaciones enzima – sustrato usadas son: peroxidasa –ortofenildiamina o penicilinasas –penicilina. La reacción enzimática puede ser observada visualmente o cuantificada por lectura en un colorímetro o espectrofotómetro, en donde se considera como positivo generalmente aquellas muestras cuya absorbancia sea superior en 0.05 al promedio de las lecturas de las muestras sanas usadas como control negativo.

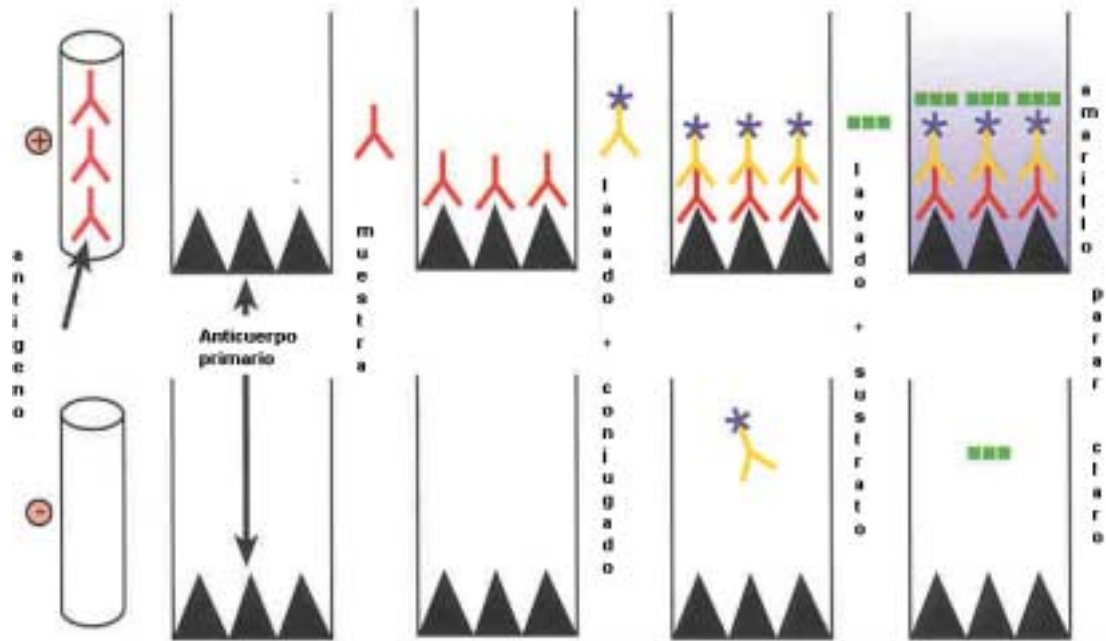


Figura 7. Pasos generales prueba DAS – ELISA.

**ELISA en membrana de nitrocelulosa (NMC- ELISA).** También conocida como NC-ELISA, dot-ELISA, o DIBA-ELISA. Es un método indirecto en donde el virus de interés se fija en un filtro de nitrocelulosa, para luego unirse a él los anticuerpos específicos. Los pasos principales son:

1. Absorción de las muestras a la membrana, la cual ha sido previamente humedecida en buffer tris salino (TBS).
2. Bloqueo y reacción con anticuerpo específico. La membrana se coloca en una solución de bloqueo para luego enjuagar con TBS.
3. Reacción con anticuerpo conjugado y revelado. El anticuerpo se agrega a la membrana previamente lavada y se incuba a temperatura ambiente, para luego lavar nuevamente y colocar en la solución con el sustrato de la enzima peroxidasa, de los cuales el más usado es el NBT (azul nitrogenado de tetrazolio) y BCIP (sal de toluidina de fosfato 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil); donde la reacción positiva se ve al estereoscopio como manchas de color morado.

#### **2.4.2.3. Ventajas y desventajas de la técnica.**

Dentro de las ventajas de las pruebas de ELISA encontramos su sensibilidad, el gran número de muestras que puede ser testeado con una pequeña cantidad de anticuerpos, la semiautomatización que puede sufrir el procedimiento, la gran aceptación que tiene esta técnica como método de detección y la comercialización a la que la ha tenido lugar, lo cual permite conseguir en el mercado gran cantidad de kits con anticuerpos específicos para un gran número de patógenos. Sus ventajas son resumidas en especificidad, sensibilidad, economía y seguridad (Jayasinghe, 1993; Salazar, 1995; Agrios, 1997).

Dentro de los inconvenientes que presenta esta técnica, encontramos el uso de antisueros que puedan presentar reacciones cruzadas con otras proteínas del huésped y dar como resultado falsos positivos. El mismo problema se puede dar, por la presencia de la enzima en la muestra utilizada en el test. Falsos negativos pueden resultar también por la presencia de inhibidores de la enzima en los reactivos serológicos (Salazar, 1995).

Otro de los problemas comúnmente encontrados con los antisueros es el relacionado con su especificidad, que parece ser más acentuada en DAS. Todo antisuero producido para un determinado virus debe ser evaluado frente a un panel amplio de variantes y aislamientos antes de ser usado en forma rutinaria (Salazar, 1995).

Si la cantidad de virus es muy baja, es necesario utilizar para su detección otras técnicas más sensibles, como la microscopía electrónica, el Western blot y técnicas moleculares como el PCR (Agrios, 1997).

Otro problema que se presenta está en la interpretación de los resultados, ya que por ser un método cualitativo los valores para los cuales se puede determinar si una muestra es positiva o no ofrece problemas. En general, Gugerli (1986 citado Salazar, 1995) sugiere que se deben considerar positivas aquellas muestras cuyo incremento de absorbancia por unidad de tiempo ( $\Delta A/\Delta t$ ) es mayor en tres desviaciones estándar al control negativo, con al menos cinco muestras de plantas sanas.

### **2.4. 3. TECNICAS BASADAS EN PCR.**

#### **2.4.3.1. Generalidades.**

Este método está basado en la síntesis específica de secuencias de ADN, gracias a una enzima ADN polimerasa termoestable, las cuales están localizadas entre dos iniciadores ("primers") de secuencia conocida y complementarios a la región del ácido nucleico que se desea amplificar (Saiki et al, 1985 citado Salazar, 1995).

La PCR es capaz de hacer una amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN por un factor de  $10^6 - 10^7$ , permitiendo la detección de una o pocas copias de ADN.

#### **2.4.3.2. Principios de las técnicas de PCR y RT – PCR.**

Esta metodología, consiste en calentar el ADN a más o menos  $95^{\circ}\text{C}$  para separar las hebras en presencia de los iniciadores. Al reducir la temperatura a  $36^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ , los iniciadores hibridizan con el ADN en la región de complementariedad. Luego se eleva la temperatura y la polimerasa extiende los iniciadores para copiar el ADN. Entonces la técnica consiste de ciclos sucesivos que comprenden la desnaturalización del ADN molde, la hibridación de los iniciadores y su extensión por la polimerasa (Querci, 1993; citado Salazar, 1995).

Uno de los aspectos claves en el éxito de la PCR se encuentra en el diseño de los primers. Como medida básica, estos deben cumplir las siguientes características:

- Las temperaturas de hibridación de los primers reverso y directo no debe ser significativamente diferente. La temperatura ideal se encuentra entre los  $45$  y  $60^{\circ}\text{C}$  y se toma  $5^{\circ}\text{C}$  más abajo de la temperatura media ( $T_M$ ) de los primers de amplificación.
- Deben tener en su extremo  $3'$  como mínimo una base C o G.
- Su extensión debe ser de aproximadamente 18 a 28 nucleótidos.
- Su porcentaje de C y G debe estar entre el 50% y el 60%.
- Se debe evitar la complementariedad entre sus extremos  $5'$  y  $3'$  con el fin de evitar la formación de dímeros.

La combinación del PCR, con la reacción de la transcriptasa reversa (RT – PCR), hace posible la amplificación de ARN viral.

Uno de los pasos críticos para la técnica de RT – PCR es la extracción y purificación del ARN. Para la extracción de ARN, uno de los métodos más usados es la lisis de las células con tiocianato de guanidina en presencia de un detergente, seguida de una extracción con fenol – cloroformo y precipitación con etanol, la cual es una metodología engorrosa y necesita la remoción de varios agentes que pueden interferir con el procedimiento de RT – PCR. Diversas metodologías que buscan obviar este paso han sido desarrolladas. Una de ellas utiliza el congelamiento (y por lo tanto el rompimiento) rápido de las células en presencia de un inhibidor de ribonucleasas (ARNsin) y un agente reductor (Ditriotreitol), evitando así el uso de los agentes mencionados arriba. El ARNsin y el Ditriotreitol cumplen como función principal proteger el RNA de la degradación por parte de ARNasas; se ha encontrado que en ausencia de los mismos la degradación de cerca del 60% del RNA ocurre en solo 2.5 minutos. Su uso es importante, sin importar el tipo de polimerasa y sobretodo si se trabaja con un número de células mayor a 20 (Klebe, 1996).

Entre las modificaciones hechas a la técnica RT - PCR, se encuentra la introducción de anticuerpos para la captura viral, evitando la extracción previa del ARN, la cual además de ser delicada, utiliza compuestos químicos tóxicos y de difícil eliminación (Chirgwin et al., 1979 citado Castro, 2000). Esta modificación ha sido denominada Inmuncaptura – Retrotranscripción- PCR (IM – RT – PCR) y fue aplicada por primera vez para la detección del virus de la hepatitis A humana (Jansen, et al., 1990). Tiempo después ha sido adaptada con éxito para la detección de virus vegetales, principalmente de la familia *potviridae* (Nolasco, et al., 1993; Munford y Seal, 1997).

#### **2.4.3.3. Ventajas y desventajas de la técnica.**

Algunas de las ventajas y desventajas que presenta el uso de PCR como método diagnóstico para detección de patógenos vegetales son:

- Presenta ventajas con respecto a la microscopía electrónica en la facilidad para la preparación de la muestra y lo simple del equipo utilizado.
- El método clásico de infección de plantas indicadoras con extractos provenientes de plantas sintomáticas es demorada y se basa en el método visual de diagnóstico, el cual es muchas veces inexacto.



- Las técnicas serológicas, si se realizan con anticuerpos policlonales, pueden perder la especificidad y la sensibilidad requerida para el diagnóstico rutinario.
- La técnica de PCR es significativamente más sensible que las técnicas inmunológicas y no requiere material fresco o apropiadamente congelado.
- El mismo protocolo de PCR puede ser usado para la detección de patógenos vegetales de diferentes tipos, en un método rápido y automático.
- El diseño de primers específicos, basado en la secuencia de genes determinados, puede discriminar entre un patógeno bajo investigación y especies relacionadas, o aún entre razas o patovares del mismo patógeno.
- Las técnicas moleculares permiten detectar pequeñas cantidades de virus, en comparación con ELISA, la microscopía electrónica, los ensayos biológicos y los test de hibridación de ácidos nucleicos (Singh, 1997).
- Como desventajas encontramos para la RT –PCR la necesidad de extraer ARN, lo cual es dispendioso y requiere de muchos cuidados.
- Necesidad de concentrar el ARN viral para facilitar su detección.
- Necesidad de contar con cantidad suficiente de DNAC viral para poder ser detectado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal utilizado provenía del programa de mejora genética de papa desarrollado en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, el cual estaba siendo evaluado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biotecnología para selección de resistencia a los principales virus de importancia económica (PVY, PLRV y PVS).

Luego de someter los materiales a la presión de los virus (resultados no pertenecientes a esta tesis), estos se evaluaron por medio de ELISAS para PVY, PLRV y PVS para determinar el grado de infectividad. De los treinta clones evaluados, aquellos con valores de ELISA altamente positivos para cada virus fueron utilizados para la extracción de RNA. Para la retrotranscripción, la amplificación del ADNc y para la IM-RT-PCR, se utilizaron los materiales altamente positivos para PVY y PLRV, al igual que los controles positivos para ELISA en cada caso. Para PVX, se utilizó solamente el control positivo para ELISA proveniente del Kit de ADGIA®. Estos extractos crudos fueron mantenidos a -20°C y el RNA a -80°C, hasta su uso (tabla 1).

Tabla 1. Clones usados en el estudio

CLON	ORIGEN
262	[381402.26(.814 x BK MEX) x 387205.8 (3811397-16 x 1-1039 )].24
263	[387205-5 (381397-16 x 1-1039) x 1-1058].2
264	BS3 ICA[(tbr x adg) x ((tbr x adg) x (tbr x adg))] x adg
268	(phu x pls).7
285	ICA BS3 [(tbr x adg) x adg]
292	[382133-7(378971-928 x BULK MEX) x 1-1039].7
298	[381400-22(.787 x BK MEX) x HUAGALINA].36
306	(82-3-5) x [79-94-3(Monserrate x 1-1058)].1
308	BS3ICA * [(tbr x adg) x tbr x adg]

337	(Tbr x adg) x masal resists. gota.
348	[79-94-3 8 (Monserate x 1-1058) x (blb x phu(Y. huevo)) x (phu bulk)
359	ICABS2
372	[U-88-29-2(blb x phu (Y. huevo)) x (phu bulk).2
377	(avl x phu).5
378	(S. cha 701570 x S. chm 473460).2
379	(tbr x adg) x (tbr x adg)
381	[(tbr x adg) x (tbr x ajh)] – 1
387	CIP 386043.1 x (blb x phu)
401	380474-8 (374080-5 x LT XY BLULK) x BK PRECOZ -84
ER3	(tbr x adg) x (tbr x adg)
ER4	(sto x pls).16
ER26	[(sto 230490 x phu (Y. huevo) x Parda Pastusa]
Maris piper	Variedad comercial de Escocia. Subespecie <i>tuberosum</i> . Variedad testigo positivo para PLRV
Pastusa	Variedad comercial de Colombia. Subespecie <i>Andigena</i> .
PR3	381400-22(.787 x BK MEX) x 387205-8 (381397-16 x 1-1039).56
PR4	[76-818-8 x (tbr x adg)] x 1-1058
PR5	(tbr x adg) x Monserate
PR8	[(tbr x (acl x phu (Var Y. huevo))].7
PR11	83-209-2[(tbr x adg) x (tbr x adg) x 1-1058] x adg (var. Pastusa)
Única	Variedad comercial de Colombia. Subespecie <i>Andigena</i>
Colorado Alvarado	Variedad testigo control negativo para todos los virus.

Para el estudio sintomatológico se tuvieron en cuenta características tales como textura de las hojas, presencia o no de enrollamiento y grado del mismo, amarillamientos, necrosis, deformidades de la hoja y presencia de círculos cloróticos.

Como control positivo de la reacción de PCR para PLRV, se utilizó ADN extraído de material transgénico de papa que contiene el gen de la proteína de la cápside de PLRV. Este material codificado como AT49 y AT63, corresponde a *Solanum phureja*, variedad yema de huevo (Franco, 1999), y fue mantenido bajo condiciones *in vitro* en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biotecnología. Para PVX y PVY, desafortunadamente no se contó con material que pudiera ser usado como control positivo de la reacción de PCR (idealmente ADNc de cada virus clonado en vectores de expresión).

## **3.2. METODOLOGÍA.**

### **3.2.1. Pruebas de ELISA.**

#### **3.2.1.1. Preparación de la muestra.**

Se tomaron hojas del material en estudio, las cuales fueron maceradas con ayuda de un mortero en buffer de extracción para ELISA en relación 1:10 (0.5 gramos de tejido vegetal por 5 ml de buffer de extracción) (Anexo B). El homogenizado se filtró a través de una gasa estéril y se centrifugó a 6000 r.p.m. por un minuto y el sobrenadante se utilizó para la prueba. Los extractos se mantuvieron a -20 °C hasta su uso y fueron empleados también para la prueba de IM – RT- PCR. Igual procedimiento se siguió tanto con el control negativo para todos los virus (clon Colorado Alvarado de *S. tuberosum*. Subs. *Andigena*, evaluado ELISA negativo para los virus PVY, PLRV Y PVS en ensayos anteriores), y con los controles positivos para PVY (liofilizado suministrado en el kit y manejado de la misma manera que las muestras) y PLRV (Maris pippier), los cuales habían sido reportados como altamente positivo en pruebas de ELISA anteriores. Para PVX no se realizó la prueba de ELISA, debido a no contar con los anticuerpos necesarios en cantidad suficiente, los anticuerpos disponibles se emplearon en la realización de la prueba de IM – RT – PCR para este virus, en donde se utilizó como muestra el control positivo para PVX proveniente del kit de ELISA de la casa comercial ADGIA®.

#### **3.2.1.2. Protocolo.**

La prueba de ELISA se realizó según el protocolo sugerido por el fabricante (ADGIA) (Anexo A). En resumen, una placa de poliestireno (Nunc – Immuno™), en la cual se ha colocado previamente el anticuerpo primario monoclonal específico para cada virus (PVY y PLRV), y que fueron suministrados por el kit comercial de detección, es incubada por 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de retirarlo y hacer lavados con Buffer PBS- Tween, se coloca la muestra (antígeno viral) preparada como se indica en el numeral 3.2.1.1 y se deja incubando por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de un nuevo lavado, se adiciona el segundo anticuerpo conjugado con la fosfatasa alcalina durante 2 horas a temperatura ambiente, para luego colocar por último el sustrato p- nitrofenil- fosfato en buffer PNP

(anexo B). Las densidades ópticas se midieron a los 30 minutos y a la hora de acción del sustrato, en un lector de ELISA a 405 nm (OD<sub>405</sub>) (BioRad modelo 550). Las muestras se consideran positivas cuando los valores de OD<sub>405</sub> eran dos veces mayores que el promedio de cuatro repeticiones del control negativo más la desviación estándar (tabla 3, figura 11).

### **3.2.2. Aislamiento del ARN total.**

Antes de empezar la extracción de ARN total, los implementos utilizados fueron previamente tratados con Dietilpírocarbamato (DEPC) al 0.1% con el fin de inhibir las posibles ARNasas presentes (anexo C).

La extracción de ARN se realizó utilizando la técnica de TRIZOL®, según el protocolo recomendado por el fabricante (Gifco BGRL) (anexo D), manteniendo en promedio 6 tubos con muestra para cada material. Los extractos obtenidos se conservaron a -80°C.

La extracción del ARN total se realizó tomando entre 50 – 100 mg de tejido vegetal fresco sintomático, ya sea proveniente de *in vitro* o invernadero, y macerándolo en 1 ml de TRIZOL® en un homogenizador de vidrio, para luego agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar a 10000 r.p.m. a 4°C, luego retirar el sobrenadante, agregar 300 µl de isopropanol, incubar 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugar a 10000 r.p.m. y guardar el pellet en etanol al 70 % a -80°C hasta su uso. En el momento de usarlo, el pellet se centrifuga a 6000 r.p.m. por 15 minutos y se deja secar en cámara de flujo laminar, para luego resuspender en 20 µl de agua tratada con DEPC. La presencia del ARN se comprobó por medio de una electroforesis (datos no mostrados).

### **3.2.3. Extracción de ADN.**

Para la extracción del ADN del material transgénico usado como control positivo de la reacción de PCR para PLRV, se utilizaron dos metodologías. La primera con la solución de DNAzol (Gibco) y la segunda con el kit Ultra Clean para extracción de ADN vegetal y de suelo (MoBio). Estas metodologías fueron realizadas según las indicaciones del fabricante (anexos E y F respectivamente). Con el fin de determinar la calidad del ADN obtenido, se corrió una

electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (anexo G, figura 11).

### 3.2.4. Descripción de los primers empleados

Los primers utilizados para el siguiente trabajo fueron diseñados y construidos con anterioridad a la realización del mismo. Ellos se encuentran descritos en la figura 7 y en la tabla 2.

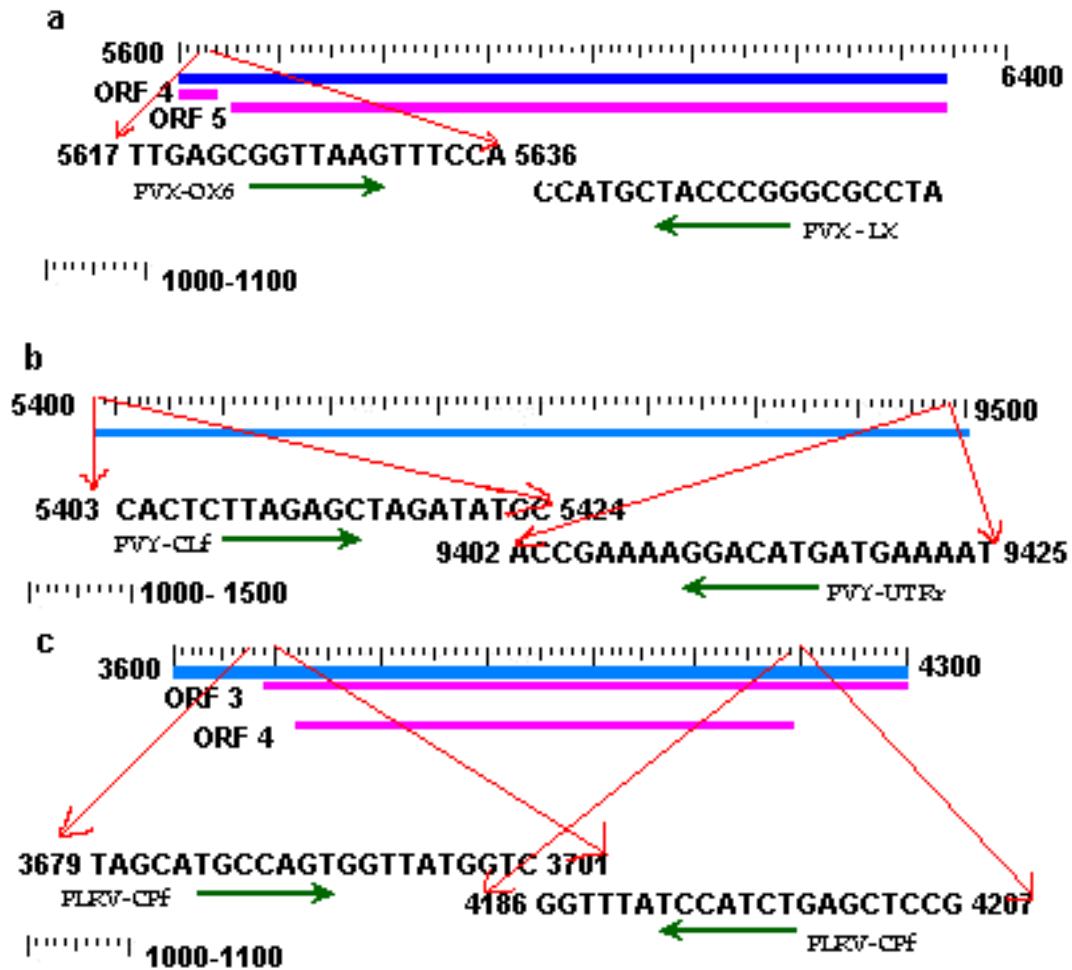
**Tabla 2. Descripción de los primers empleados.**

Nombre	Secuencia	Nº de nucleot.	Localización	Referencia
PVX-cDNA	5'ATC CGC GGG CCC ATG GTA CCT TTT TTT TTT TTT TTT T 3'	37 nt.	Polylinker + poli T**	Duplat, 1998
PVX-06 (f)*	5'TTG AGC GGT TAA GTT TCC A 3'	19 nt.	5617 - 5635	Duplat, 1998
PVX-LX (r)*	3'ATC CGC GGG CCC ATC GTA CC 5'	20 nt.	Polylinker***	Duplat, 1998
PVY-CLf (f)*	5'CAC TCT TAG AGC TAG ATA TGC 3'	21 nt.	5403 - 5424	Romero, 1997
PVY-UTRr (r)*	3'TAA AAG TAG TAC AGG AAA AGC CA 5'	23 nt.	9425 - 9402	Romero, 1997
PLRV-CPf (f)*	5'TAG CAT GCC AGT GGT TAT GGT C 3'	22 nt.	3679 a 3701	Franco, 1999
PLRV-CPr (r)*	3'GCC TCG AGT CTA CCT ATT TGG 5'	21 nt.	4186 a 4207	Franco, 1999

\*(f) Primer directo; (r) primer reverso

\*\*Primer usado para la síntesis de ADNc sobre genomas terminados en poli A.

\*\*\*Primer reverso usado para la amplificación de ADNcs sintetizados con el primer Polylinker + poliT.



**Figura 8** Localización de los primers a: para PVX, b: para PVY, c: para PLRV. La línea de color azul representa la región del genoma amplificada, mientras la de color violeta los ORFs localizados en ese sitio. Las flechas debajo de cada primer indican la dirección de la síntesis del ADN.

Con el fin de comprobar que los primers utilizados podían detectar todas cepas conocidas del virus particular, sin riesgo de reacciones cruzadas, se realizaron primero búsquedas de todas las secuencias nucleotídicas reportadas hasta la fecha para cada virus, empleando las bases de datos existentes a nivel internacional. Para cada virus estas secuencias se agruparon y compararon, teniendo en cuenta las cepas a las cuales pertenecía cada accesión, con el fin de lograr una secuencia de referencia sobre la cual localizar los primers. Para estas comparaciones se utilizó el programa Clustal W suministrado en la página Web del Instituto Europeo de Bioinformática (MBL - EBI) [www.ebi.ac.uk/Clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/Clustalw/)

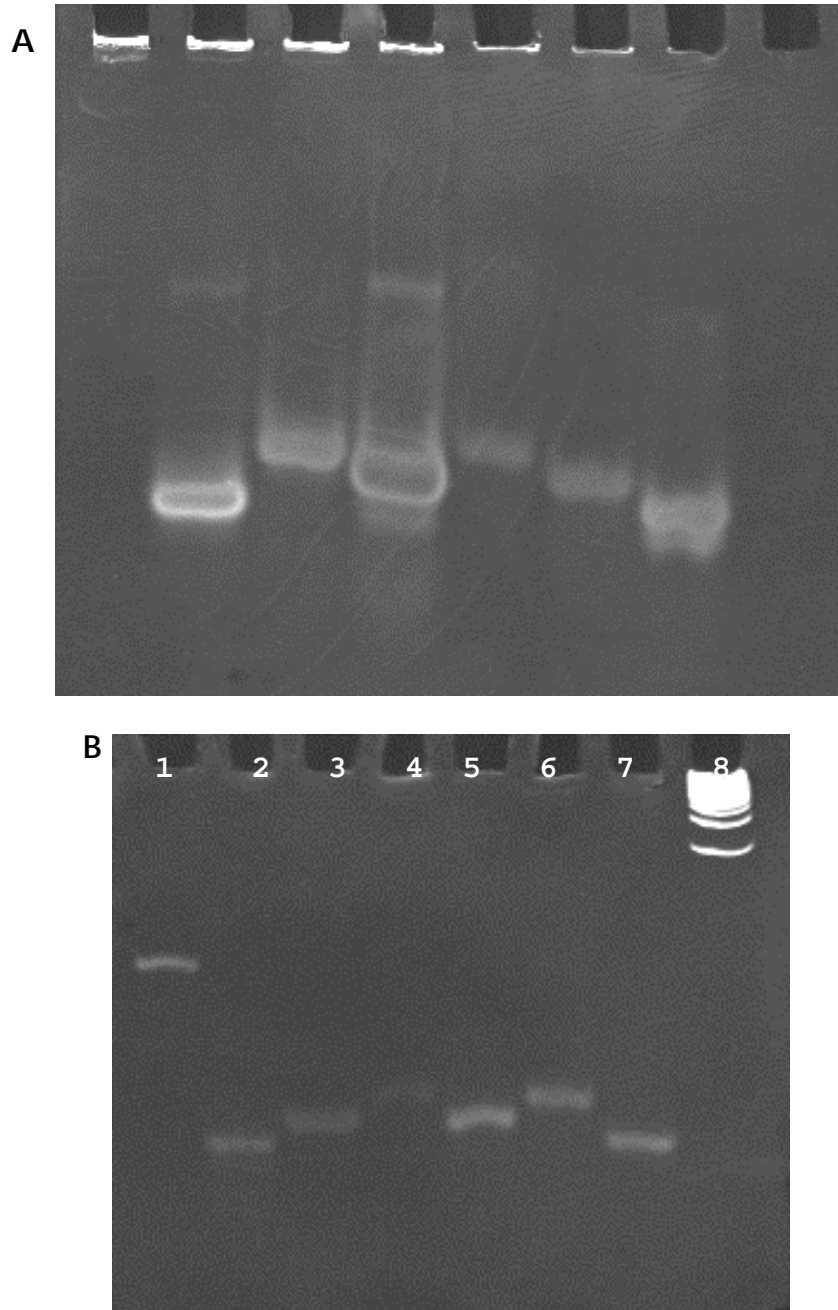
Tanto con la secuencia de referencia determinada, como con los primers utilizados, se procedió a correr el algoritmo Blast, empleando el servidor [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), el cual realiza una búsqueda comparativa de secuencias y permite generar mapas de alineamiento para cada elemento introducido. Esta búsqueda permite evaluar la especificidad esperada de los primers y cuales accesiones del virus pueden ser detectadas potencialmente con ellos.

Es necesario tener en cuenta que por utilizar como primer reverso para PVX una secuencia Polylinker, ésta no presenta similitud con ninguna secuencia del virus. Sin embargo, al usar el primer Polilinker + poli T para la retrotranscripción, el ADNc obtenido presenta como extremo 3' la secuencia complementaria al primer polynlinker. Esto hace que se pueda usar el primer Polilinker, junto con el primer directo, para la reacción de PCR. Además con este diseño de primers se puede amplificar cualquier genoma viral con extremo 3' de poli A, en combinación con un primer directo específico para cada virus. Este primer Polilinker fue utilizado en trabajos anteriores para clonación de secuencias del virus PVX y para la creación de genotecas de ADNc del mismo (Duplat, 1998).

Para determinar visualmente la calidad de los primers, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, utilizando una solución de acrilamida: bisacrilamida al 40%, en relación 29:1 (anexo H). La electroforesis se corrió a 80 V constantes por hora y media, en una cámara Mini protean II cell (Biorad). Con base en la intensidad de las bandas (figura 9a), se prepararon las disoluciones de trabajo (2:5 para PLRV-CPr, PVY-CLf y PVX-LK; 1:2 para PVY-UTR y PVX-OX6 y 1: 10 para PVX-cDNA y PLRV-CPf) con el fin de tener una solución de concentración final, aproximada mediante examen visual, de 20 µm para cada uno de los primers (figura 9b).

Para la síntesis del ADNc de los virus PVY y PVX, que presentan en su extremo 3' una cola de poliA, se utilizó el primer PVX-cDNA, y para la síntesis de ADNc del virus PLRV se utilizó el primer reverso (PLRV-CPr) (tabla 2).





**Figura 9. Electroforesis de los primers en gel de poliacrilamida al 15 %.** **A: primers en solución primaria.** Carril 1:  $\lambda$ Hind III, carril 2: PLRV-CP<sub>r</sub>, carril 3: PLRV-CP<sub>r</sub>, carril 4: PVY-CLf, carril 5: PVY-UTR<sub>r</sub>, carril 6: PVX-OX6, carril 7: PVX-LK

**B: Primers en solución de trabajo.** Carril 1: PVX-cDNA (disolución 1: 10), carril 2: PVX-LK (disolución 2:5), carril 3: PVX-OX6 (disolución 1:2), carril 4: PVY-UTR<sub>r</sub> (disolución 1:2), carril 5: PVY-CPf (disolución 2:5), carril 6: PLRV-CP<sub>r</sub> (disolución 2: 5), carril 7: PLRV-CPf (disolución 1: 10) carril 8: DNA leader 100pb.

### 3.2.5. Síntesis del ADNc.

Para realizar la síntesis del ADNc el ARN total mantenido a  $-80^{\circ}\text{C}$  en etanol al 70% fue centrifugado a 6000 r.p.m. por 15 minutos, para ser secado y resuspendido en 20 $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC. A cada muestra, según el tipo de virus a analizar, se le adicionó el primer correspondiente (PVX-cDNA para los virus PVX y PVY o el primer PLRV-CPr para el virus PLRV), además de agua libre de RNAsas y la enzima transcriptasa reversa del Virus de la Mieloblastosis Avial (AMV) (casa comercial CPG). Junto a esta mezcla de reacción se adicionó buffer ADNc 10 X, dNTPs 10 mM, RNAsin 40 U y DTT 0.1 mM. La reacción se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos y se paró a  $72^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Una terminada la reacción, el ARN inicial no es eliminado, ya que este no interfiere con la posterior reacción de PCR (Torres, 1997; citado en Castro, 2000) (Anexo J).

Para determinar la calidad del ADNc sintetizado, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, donde se observaron bandas de diferentes pesos, correspondientes a diferentes ADNs copias presumiblemente tanto vegetales como virales. Este protocolo se realizó tal como se indica en el anexo G (Figura 17).

### 3.2.6. Amplificación por PCR del ADN transgénico y del ADNc.

La técnica de PCR fue utilizada para la amplificación del ADNc viral de PVX, PVY y PLRV, y del ADN extraído de material transgénico; este último usado como control positivo de la reacción de PCR para el virus PLRV. No se realizaron controles positivos para PVY por las razones especificadas anteriormente. La amplificación se llevo a cabo utilizando el kit para PCR de la casa comercial CPG, (Tac Force™ amplification system), el cual emplea la enzima *Taq* polimerasa, de la eubacteria *Thermus aquaticus*. Se utilizó el termociclador Parkin Elmer, modelo 2400. Los programas corridos para cada virus son como siguen:

Para PVX:

- El ADNc se desnaturizó primero a  $94^{\circ}\text{C}$  por un minuto y se realizaron luego 25 ciclos con el siguiente programa:

1. 92°C por 1 minuto para desnaturalización,
  2. Variaciones entre 40 - 50 °C por 15 segundos para apareamiento (en diferentes reacciones de amplificación).
  3. 72 °C por 30 segundos para la síntesis.
- El programa termina con un ciclo a 72°C por 1 minuto para la extensión final (Anexo L).

Para PVY:

- El ADNc se desnaturalizó a 94°C por 1 segundo y se realizaron 5 ciclos con el siguiente programa:
  1. 94°C por 1 minuto
  2. 39°C por 1 minuto
  3. 72°C por 4 minutos
- Luego se procedió a realizar 30 ciclos con las temperaturas anteriores, pero el paso 1 se realizó por 20 segundos. El programa también se corrió sin estos 5 ciclos iniciales.
- El programa termina con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Para PLRV:

- El ADNc y el ADN transgénico se desnaturalizaron a 94°C por 1 minuto y se realizaron 30 ciclos con el siguiente programa:
  1. 94°C por 1 minuto
  2. 55°C por 30 segundos
  3. 72°C por 30 segundos
- El programa termina con una extensión final de 1 minuto a 72°C.

Para visualizar los productos de amplificación, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (anexo G), colocando en cada pozo 5 µl del producto de PCRm, más 2 µl del buffer de carga. El gel se corrió a 50 voltios constantes por 3 horas y se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg / µl) por 10 a 20 minutos (anexo G, figura 18).

### **3.2.7. Inmunocaptura – RT – PCR (IM – RT – PCR)**

Se utilizó la metodología propuesta por Guzmán (1998), con algunas modificaciones (anexo L).

#### **3.2.7.1. Preparación de las muestras.**

En sí, el procedimiento realizado consistió en una maceración inicial de las muestras frescas en buffer de extracción de ELISA en disolución 1:10. El filtrado se guardó a -20 °C hasta su uso.

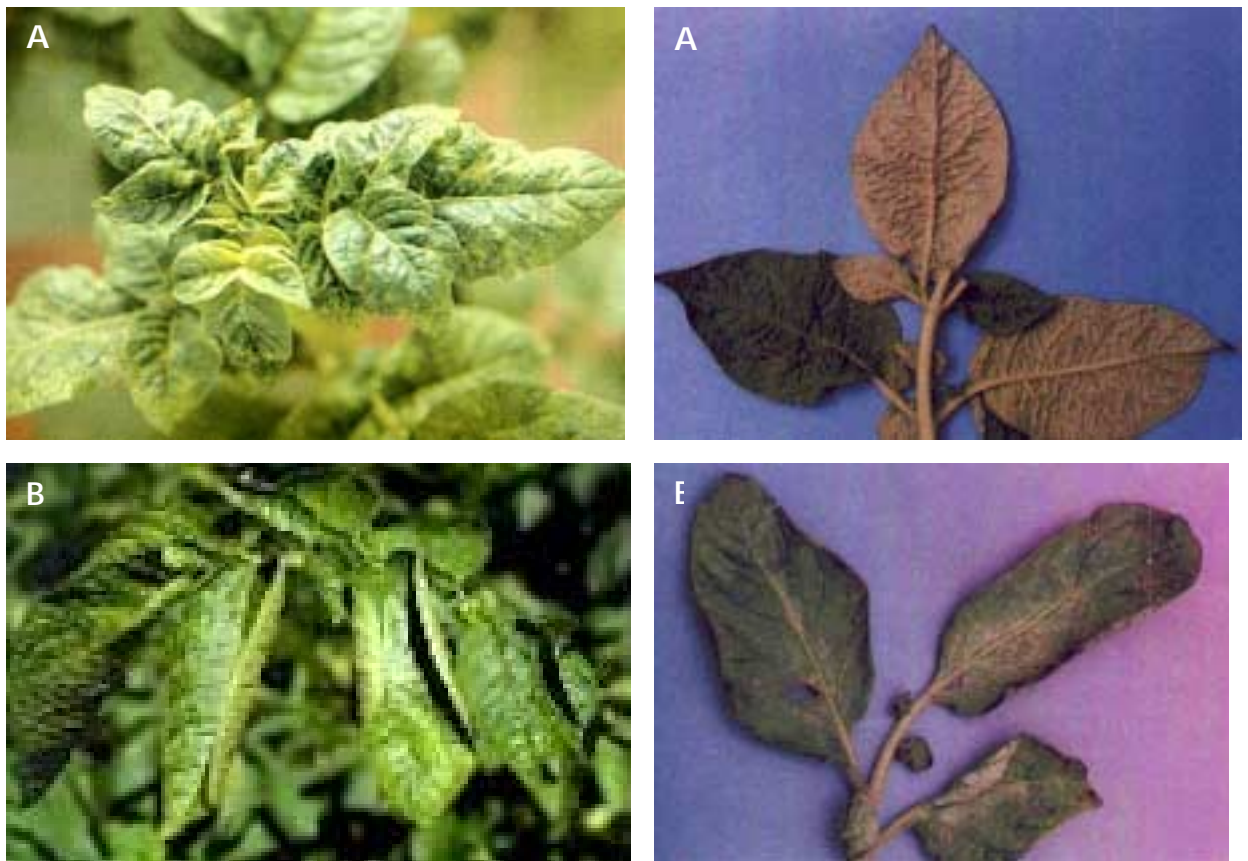
#### **3.2.7.2. Captura viral, síntesis y amplificación del ADNc.**

Los anticuerpos primarios para cada uno de los virus, suministrados en el kit para ELISA de la casa comercial ADGIA, se prepararon en una disolución 1: 50 en buffer de cubrimiento y se colocaron en tubos eppendorf libres de ARNasas para su fijación en las paredes del tubo dejándolo por 3 horas a 37°C. Se lavo con PBS – Tween y se colocó la muestra, la cual se dejó incubando por mínimo 12 horas a 4°C. Se realizó nuevamente un lavado con PBS tween, para posteriormente incubar a 70°C por 5 minutos con el fin de desnaturalizar la proteína de la cápside. Luego se realizó la mezcla para la síntesis de cDNA, que incluía la transcriptasa reversa (anexo L), y se dejó incubando a 42 °C por 45 minutos, parando la reacción a 95 °C por 3 minutos. La amplificación se llevo a cabo sobre el mismo tubo, completando a un volumen final de 20 µl y utilizando los programas descritos en el numeral 3.2.6., pero utilizando una mezcla de reacción que contenía Triton X100 (anexo L). El producto de PCR se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 50 voltios constantes por 3 horas y se tiñó con una solución de bromuro de etidio (5µg / ml) por 15 minutos (figura 20).

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. SINTOMATOLOGÍA Y PRUEBAS DE ELISA .

La descripción de la sintomatología observada para cada clon se encuentra resumida en la tabla 3 y en la figura 10.



**Figura 10.** Sintomatología de A: PVY, B: PLRV, observada en el material de estudio. Las fotos de la izquierda muestran la visión general y las de la derecha el detalle. Para PVY obsérvese el color negruzco de las nervaduras y la brotación de las mismas. Para PLRV, nótese el grado de enrollamiento, la clorosis y necrosis de ciertos puntos de la hoja.

**Tabla 3.** Síntomas y resultados de las pruebas de ELISA.

CLON	SINTOMAS	PLRV*	PVY*
262	Entorchamiento leve, algo de clorosis, algunos puntos necróticos	0,252	0,115
263	Entorchamiento leve de las hojas. Puntas amarillas y necróticas.	0,482	0,211
264	Entorchamiento leve, clorosis y hojas coriáceas.	0,305	0,157
268	Entorchamiento leve, hojas coriáceas y clorosis leve.	0,784	0,279
285	Algunos puntos necróticos. Sin otra sintomatología aparente.	0,384	0,211
292	Algunos puntos necróticos. Sin otra sintomatología aparente.	0,350	0,522**
298	Enrollamiento fuerte, deformidad de las hojas. Puntos necróticos y puntas amarillas. Hojas coriáceas	***	0,220
306	Enrollamiento y hojas coriáceas	0,362	0,120
308	Entorchamiento fuerte, puntos necróticos. Hojas coriáceas.	0,619	0,213
337	Hojas coriáceas, acucharadas, enrollamiento fuerte, deformidad de las hojas, puntos amarillos hacia los bordes, mosaicismo.	0,892	0,250
348	Puntos necróticos.	1,122	0,278
359	Sin sintomatología aparente, con algunos puntos negros.	0,369	0,174
372	Entorchamiento fuerte de las hojas, clorosis. Hojas coriáceas.	0,473	0,477
377	Puntos negros, sin otros síntomas aparentes.	0,300	1,663
378	Entorchamiento leve, hojas coriáceas y deformes.	0,614	0,209
379	Sin sintomatología aparente.	0,322	2,279
381	Puntos negros en el haz, hojas deformes. Clorosis leve, puntos necróticos y amarillos	0,372	0,104

387	Entorchamiento fuerte.	0,782	0,322
401	Enrollamiento fuerte, crecimiento arrosado.	0,554	0,186
ER3	Enrollamiento leve, amarillamiento en algunas hojas.	0,384	0,147
ER4	Enrollamiento leve, algunos puntos amarillos.	0,435	0,152
ER26	Hojas coriáceas, clorosis, entorchamiento leve	0,34	0,112
IN10	Hojas apicales amarillentas	0.442	1.712
IN22	Hojas apicales amarillentas.	0,368	2.658
Maris piper	Entorchamiento fuerte, hojas coriáceas, enanismo.	2.400	Nt***
Pastusa	Hojas coriáceas, enrollamiento leve	0,436	0,112
PR3	Hojas coriáceas, enrollamiento leve	0.584	2,054
PR4	Entorchamiento leve, hojas coriáceas y deformes	0,367	0,107
PR5	Entorchamiento fuerte, hojas coriáceas.	0,525	0,176
PR8	Hojas coriáceas, enrollamiento leve, algunas hojas con amarillamiento en las venas, hojas deformadas.	0,338	2,295
PR11	Entorchamiento de hojas, puntos necróticos, hojas coriáceas.	0,488	0,221
Única	Sin sintomatología aparente.	0.710	0,166
Colorado Alvarado	Sin síntomas. Material de <i>in vitro</i> . Control negativo.	0,191	0,147

\*Valores promedio de 4 medidas de absorbancia a 405 nm.

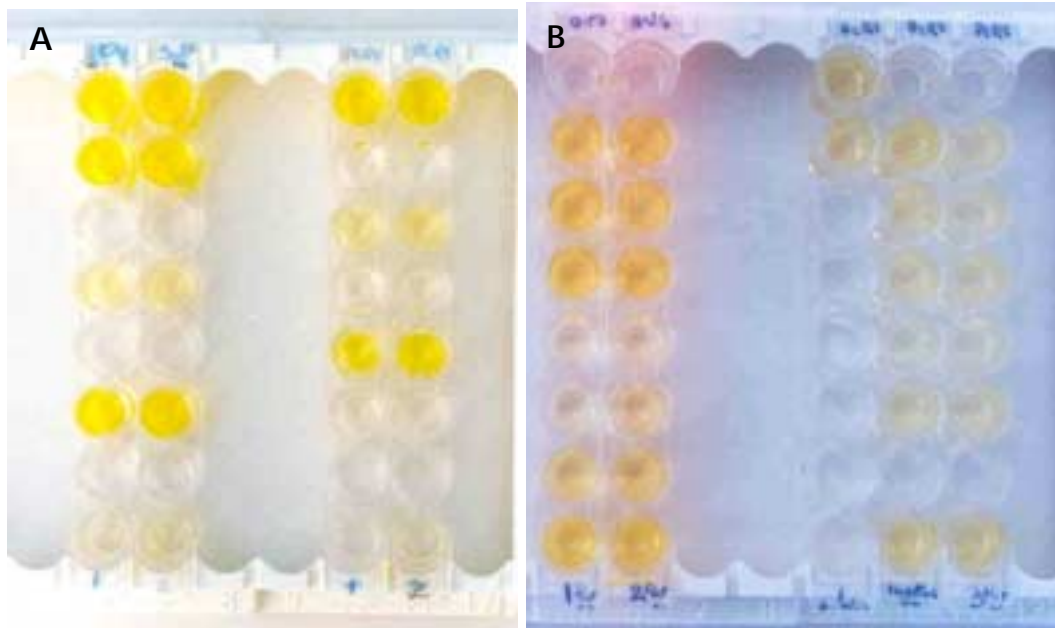
\*\*Valores positivos a los 60 minutos. Positivo = 2 veces el promedio de cuatro mediciones del control negativo más la desviación estándar. (Chernesky y Mahony, 1996; citado en Castro, 2000)

$$\text{PLRV: } 0.191 \times 2 + 0.001 = 0.383$$

$$\text{PVY: } 0.184 \times 2 + 0.001 = 0.369$$

\*\*\* Altamente positivo

\*\*\* Nt: dato no tomado.



**Figura 11. Prueba de ELISA.** A: PVY, B: PLRV. El amarillo intenso de los pozos, indica una reacción positiva.

Es bueno tener en cuenta que muchos materiales con sintomatología aparente de virus, como puntos cloróticos o necróticos y entorchamiento de hoja, no resultaron positivo para la prueba de ELISA. Es el caso de los materiales 262, 263, 264, 306, 308, 381 y 401. Esto sugeriría lo impreciso del método visual para la detección de virus y la necesidad de confirmar dichas observaciones con pruebas más precisas de tipo serológico o molecular.

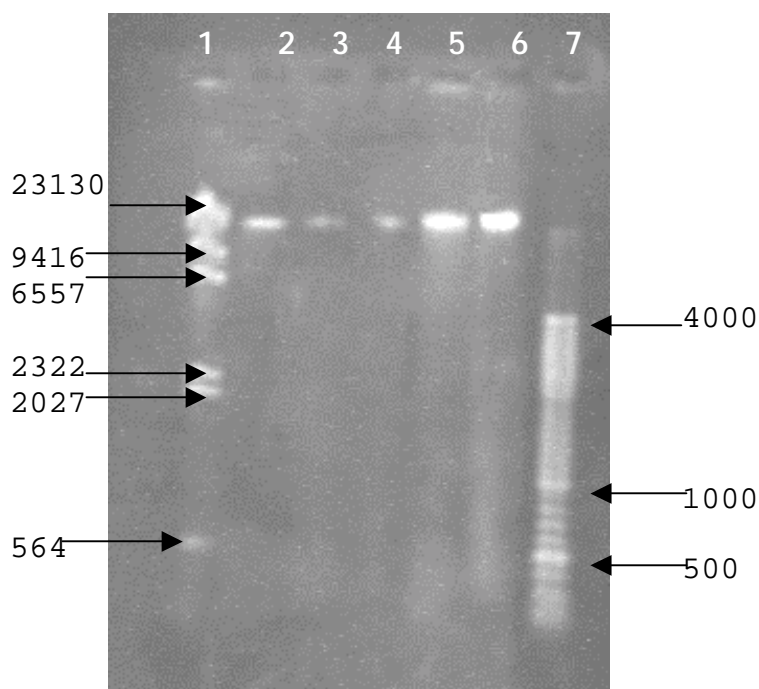
La deficiencia de nutrientes, ya sea por ausencia del elemento o por incapacidad de la planta para tomarlo del suelo, produce enfermedad que en muchas de sus sintomatologías semeja a la provocada por virus. En nuestro caso, la presencia de hojas distorsionadas y enrolladas en plantas ELISA negativo para PLRV, puede asumirse como deficiencia de calcio, ya que en su ausencia se presenta una sintomatología similar (Agrios, 1997). Sin embargo nosotros no estamos en capacidad de confirmarlo, debido a que ello esta fuera de nuestra capacidad y no hace parte de los objetivos del trabajo. A nivel fisiológico y nutricional, la clorosis se asocia con bajas cantidades de nitrógeno, potasio, magnesio, azufre, hierro, zinc, cobre y manganeso; siendo su patrón dependiente del elemento faltante. Tenemos así: la ausencia de Nitrógeno y de Azufre produce un amarillamiento total de



la hoja; para la deficiencia en Potasio, las hojas son de color amarillo y las puntas necróticas; para el caso de la deficiencia en Magnesio, las hojas son primero amarillas y después rojizas; la ausencia de Hierro, Zinc y Manganeso, produce clorosis en toda la hoja, pero las venas permanecen verdes; la ausencia de Cobre produce puntos cloróticos en las puntas y los márgenes (Agrios, 1997).

#### 4.2 EXTRACCIÓN DE ADN.

Para la extracción del ADN de las líneas transgénicas de papa, (AT49 y AT63) usadas como control positivo de la reacción de PCR para PLRV, el mejor resultado se obtuvo empleando el kit de la casa comercial Mo-Bio. En la figura 12 se observan los resultados de la extracción y vemos que la banda obtenida con este kit (carril 2) es mas definida y no presenta barrido como las observadas para las extracciones hechas con DNAzol®, indicativo de la calidad del mismo.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del ADN obtenido. Carril 1 Lamda ( $\lambda$ ) Hind III, Carril 2 ADN del clon AT49 extraído con Ultra Clean. Carril 3 ADN de AT49 extraído con DNAzol. Carril 4 ADN extraído con DNAzol de AT49 un mes antes. Carril 5 AT 63 extraído con DNAzol. Carril 6 AT63 obtenido con DNAzol un mes antes. Carril 7 ADN leader 100 pb 0.2  $\mu$ l/  $\mu$ l.

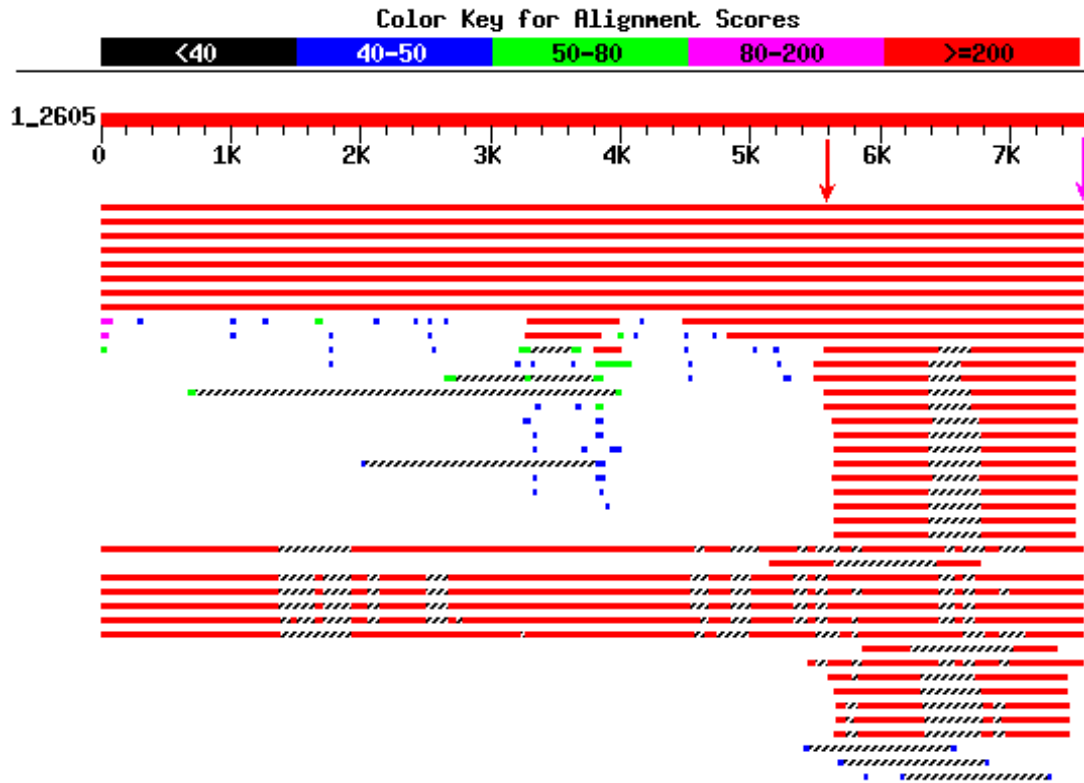
### 4.3. ANÁLISIS DE LOS PRIMERS

Las comparaciones realizadas intragrupos para cada uno de los cuatro virus, teniendo en cuenta la información de cada accesión disponible en la base de datos (principalmente cepa), permitió escoger una secuencia de referencia para cada virus. Con estas secuencias de referencia se corrió el algoritmo Blast, encontrando que para los virus PVX, PLRV y PVS, una sola corrida abarcaba todas las accesiones reportadas hasta la fecha (Octubre de 2001), mientras que para PVY fueron necesarias varias, indicativo de la gran cantidad de accesiones disponibles en las bases de datos relacionadas con este virus.

Para el virus PVX se corrió un Blast sobre la accesión M72416, la cual fue tomada como nuestra secuencia de referencia (figura 13). Esta accesión representa una secuencia completa del virus (6435 pb) y corresponde a una cepa europea. Este Blast ubica 211 accesiones en total, entre las cuales se cuentan todas las accesiones para PVX reportadas en la base de datos de la NCBI.

Las secuencias, vistas en la figura número 13 como líneas de color rojo, representan aquellas accesiones con un índice de similitud mayor a 200, donde se encuentran todas las accesiones reportadas de PVX en la base de datos de la NCBI (ver en el anexo M los números de las accesiones). Las líneas de colores diferentes representan secuencias de otros organismo con similitudes menores (virus del mosaico de la yuca, virus del mosaico de la papaya, virus X del cactus y el del mosaico del bambú y secuencias de genes de otros organismos no virales como el hombre, el ratón y la mosca de las frutas).

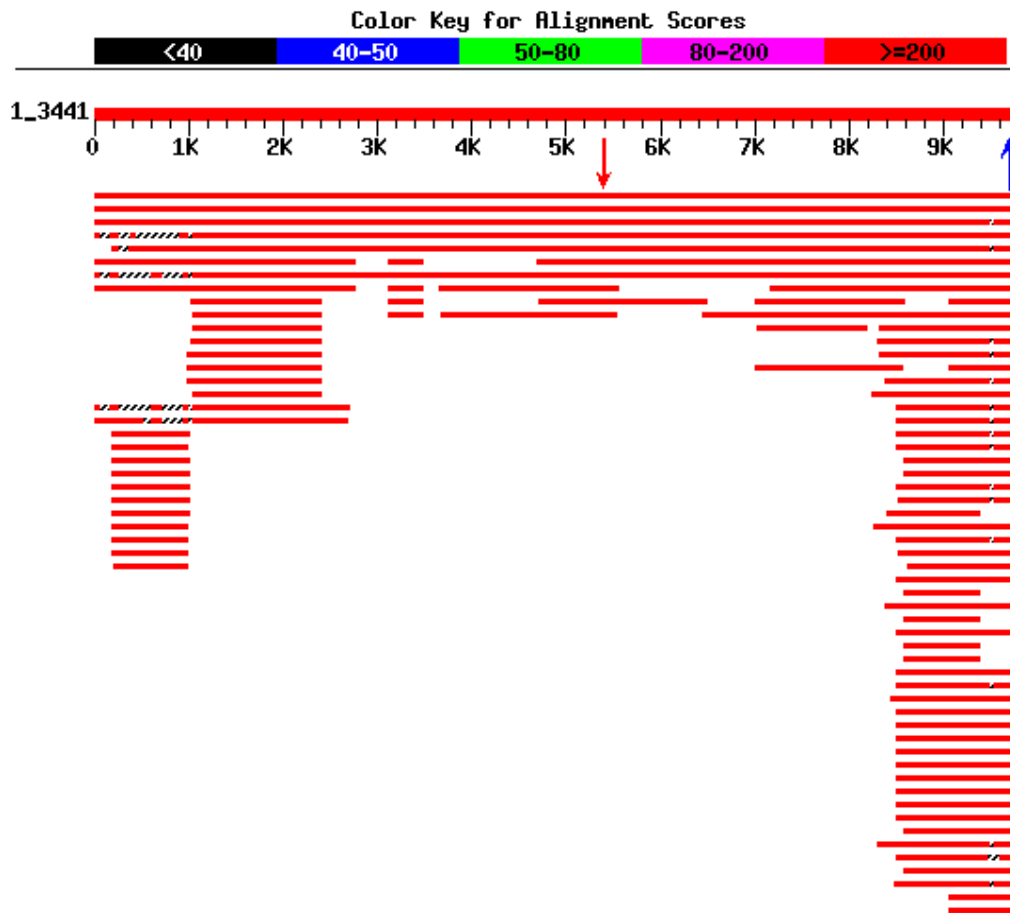
Con base en el resultado del Blast, podemos decir que la zona más similar para todas las accesiones de PVX se encuentra entre las regiones de 5.8 Kb y 6.2 Kb, y la de 7Kb hasta el final. Sobre esta última región se localiza el primer utilizado para la síntesis de ADNc (PVX-cDNA) mientras que el primer directo se localiza en la primera región. El primer reverso (PVX – LX) no presenta similitud con ninguna secuencia de PVX, debido a que es un polylinker. Sin embargo, el análisis de la información obtenida por medio del Blast nos da una idea de si nuestros primers conservan la especificidad reportada en los trabajos donde fueron usados anteriormente (Duplat, 1998). Para PVX, esta especificidad se mantiene, lo cual indica que estos primers pueden seguir usándose para la detección del virus PVX sin riesgo de reacciones con otros organismos virales que pudieran dar falsos positivos.



**Figura 13. Resultados del Blast para la accesión M72416 del virus PVX.** La regla muestra el número de nucleótidos de la secuencia sobre la que se realiza el Blast, mientras que los colores expresan una medida del grado de similitud. Las regiones rayadas sobre las accesiones muestran zonas heterogéneas con respecto a la secuencia inicial. Las accesiones están colocadas según su posición con respecto a la accesión de referencia. Las flechas indican la posición de los primers utilizados, ■ primer directo (PVX-OX6), ■ primer usado para la obtención del ADNc (PVX-cDNA).

Para PVY, como se explicó anteriormente, fue necesario correr diferentes Blasts, de los cuales sólo se reporta el que se realizó sobre nuestra secuencia de referencia (D00441), la cual corresponde a una secuencia completa de PVY, (cepa N) de 9704 pb. Sobre 216 accesiones presentes, la mayoría corresponden a accesiones de PVY, aunque también se encontró un índice de similitud de más de 200 con la accesión M11598, que corresponde a la secuencia para la proteína de la cápside del virus del moteado del pepino, indicativo de que nuestros primers pueden posiblemente detectar esta accesión.

Sobre este Blast, la región símil donde es conveniente construir primers para la detección de este virus se encuentra comprendida entre los 1Kb y los 9.450 Kb, es decir, sobre casi toda la extensión del genoma. Sobre esta región se ubican los primers construidos (figura 14).

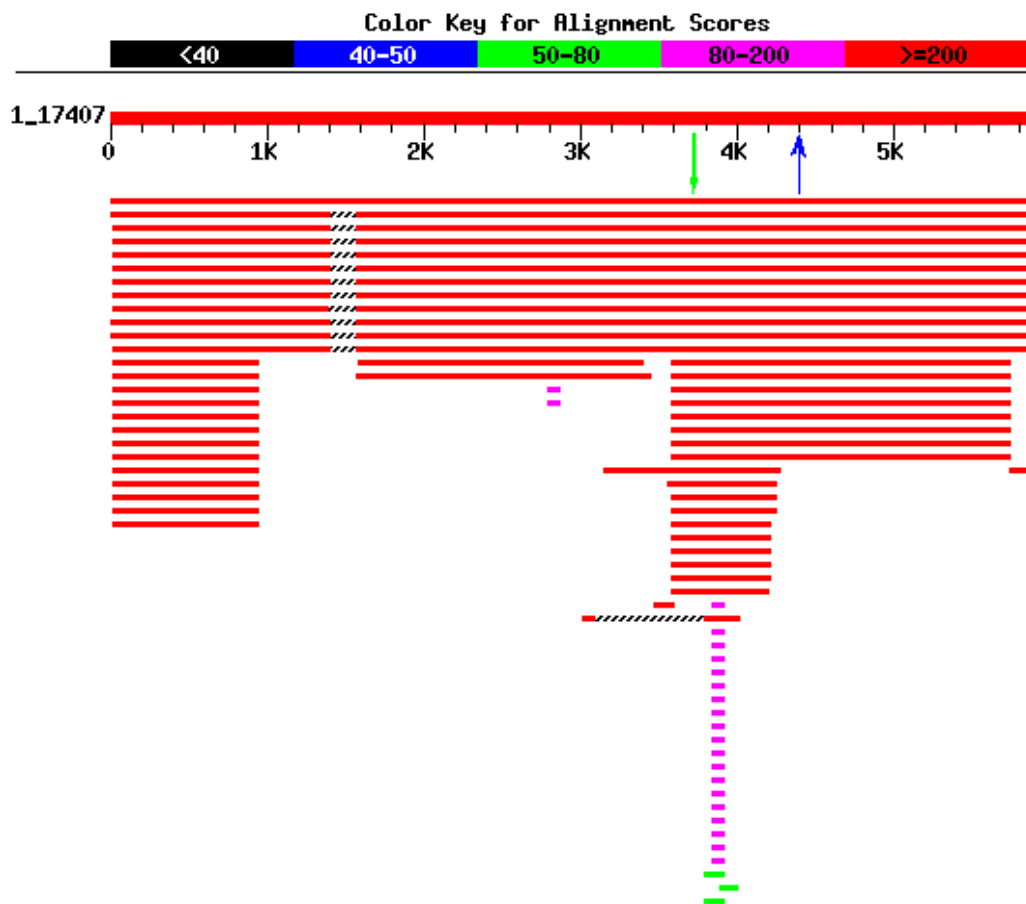


**Figura 14. Resultados del Blast para la accesión D00441 del virus PVY.** La regla muestra el número de nucleótidos de la secuencia sobre la que se realiza el Blast, mientras que los colores indican el índice de similitud. Las flechas corresponden a los juegos de primers, ■ directo (PVY -CLf), ■ reverso (PVY-UTRr).

Para PLRV, el Blast se corrió sobre la accesión D13953, que corresponde a una secuencia completa de 5987 pares de bases y proviene de un aislado australiano. Este Blast abarca todas las secuencias de PLRV reportadas hasta octubre de 2001 en la base de datos de la NCBI, en donde existe un índice de similitud de más de 200 con todas las accesiones de PLRV y con un aislado mexicano del virus del amarillamiento y enanismo del cereal. Presenta

similitudes menores con virus tales como el virus del enanismo amarillo del cereal, el virus amarillo de la remolacha, el virus del moteado de la soya, el virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar y el virus del amarillamiento del nabo.

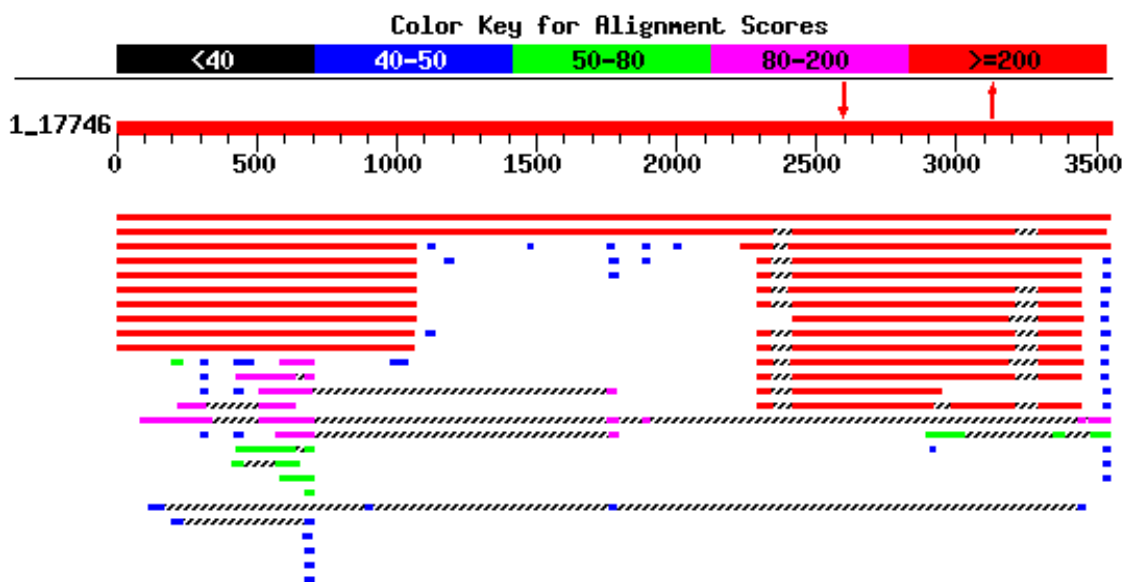
Sobre la figura 15 encontramos que las regiones con mayor similitud están entre los 0 - 1.0 K y 1.6 - 5.8 K. Es en esta última región donde se localizan los primers construidos para este trabajo.



**Figura 15. Blast realizado sobre la accesión número D13953 de PLRV.** La regla indica el número de pares de bases y los colores el índice de similitud con la secuencia comparada. Las flechas indican la posición de los primers construidos; ■ primer directo (PLRV-CPf), ■ primer reverso (PLRV-CPr).

Para PVS, a pesar de no contar con los primers para realizar las pruebas, se decidió realizar una propuesta teórica buscando un buen grupo de primers que pudieran ser usados bajo condiciones estándar (ubicados en una región

homologa a todas las secuencias reportadas de PVS hasta la fecha, con un tamaño entre 14 y 20 nucleótidos, con una temperatura de anillamiento de 40 a 50°C y que amplificaran un fragmento de 500 a 1000 pares de bases). Para esto, se corrió primero un Blast sobre la accesión más completa de PVS reportada hasta la fecha, la D00461, que corresponde a una cepa andina con 3552 pares de bases. Este abarca todas las secuencias de PVS reportadas a la fecha (vistas como líneas de color rojo). Sobre esta figura podemos decir que las regiones más similares, donde se pueden ubicar grupos de primers para su detección, se encuentran entre los 2600 y 3200 pares de bases. Las secuencias utilizadas para la comparación múltiple con el programa Clustal W fueron seleccionadas con base en el resultado del Blast, del cual deducimos que las accesiones más disímiles de PVS son D00461 (cepa Andina de PVS), Y15625 (cepa común), S45593 (cepa común de PVS), Y15612 (aislado kobra clon KACP2N), U74375 (cepa S-SE), U74376 (cepa S-RB) y Y15614 (aislado Kobra) (figura 16).



**Figura 16: Resultados del Blast para la accesión D00461 del virus PVS.** La regla muestra el número de nucleótidos de la secuencia sobre la que se realiza el Blast, mientras que los colores indican el índice de similitud. Las flechas indican la posición de los primers propuestos.

Con las regiones homologas en más de 14 pb entre las accesiones analizadas por el programa Clustal W, se busco sobre ellas, utilizando los programas Hind – PCR y Primer Desing, cuales podrían ser utilizadas como primers bajo los siguientes parámetros dados a los programas: tamaño de 14 a 25 nucleótidos,

con extremo 5' G o C, temperatura de hibridación de 45°C a 55°C, tamaño del amplificado de 500 a 1000 pb. Estos programas sugieren que el conjunto de primers más adecuado que puede ser usado para la detección de PVS es:

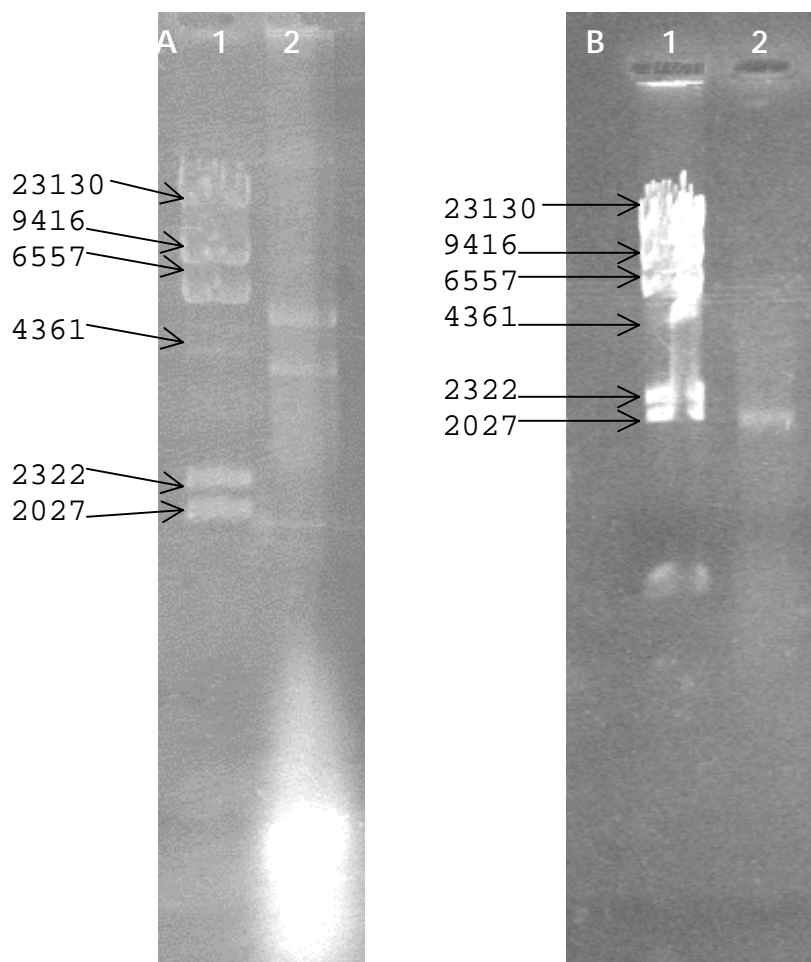
Antisentido (3144 a 3157) 3'-CGACTCTAACACGC -5' pb: 14 nt. Tm = 46.2°C  
Sentido (2588 a 2571) 5'- AAGATGGAAATCCGATC -3' pb: 17 nt. Tm = 50.2°C  
tamaño esperado del fragmento amplificado = 556bp

Para determinar si estos primers no llevan a reacciones cruzadas con otros organismos virales, se corrió el algoritmo Blast con cada uno de ellos, demostrándose así su especificidad para el virus PVS.

#### **4.4. SÍNTESIS Y AMPLIFICACIÓN DEL ADNc VIRAL (RT -- PCR) Y DEL ADN TRANSGÉNICO (PCR).**

Con los primers disponibles en el laboratorio y con el ARN total extraído, se procedió a realizar la síntesis del ADNc y su amplificación para cada uno de los virus (PVX, PVY y PLRV). Para determinar la obtención del ADNc se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, donde se observó un grupo de bandas de diferentes tamaños para la amplificación de PVY, producto de la retrotranscripción de los diferentes RNAs presentes. Para PLRV, se obtuvo una sola banda, debido al uso del primer reverso específico para la amplificación de este virus ya que por no poseer cola de poli A en su extremo 3', no podemos usar el primer poli T para su retrotranscripción (figura 17).

Estos son los resultados esperados, para la síntesis de ADNc del virus PVY y PVX, puesto que el primer utilizado (PVX- cDNA) presenta una secuencia poli T, se retrotranscriben entonces todos los ARNs que posean extremos 3' poliadenilados (ARNms y virales). Para el virus PLRV también son los resultados esperados, puesto que se utilizó un primer específico para este virus, (PLRV-CPr), entonces solo se espera retrotranscribir el RNA específico de PLRV. En todos los casos, se observó un barrido en la parte final del gel, el cual puede corresponder a una fracción de ARN degradado durante la electroforesis, y/o a un exceso de primers en forma de dímeros.



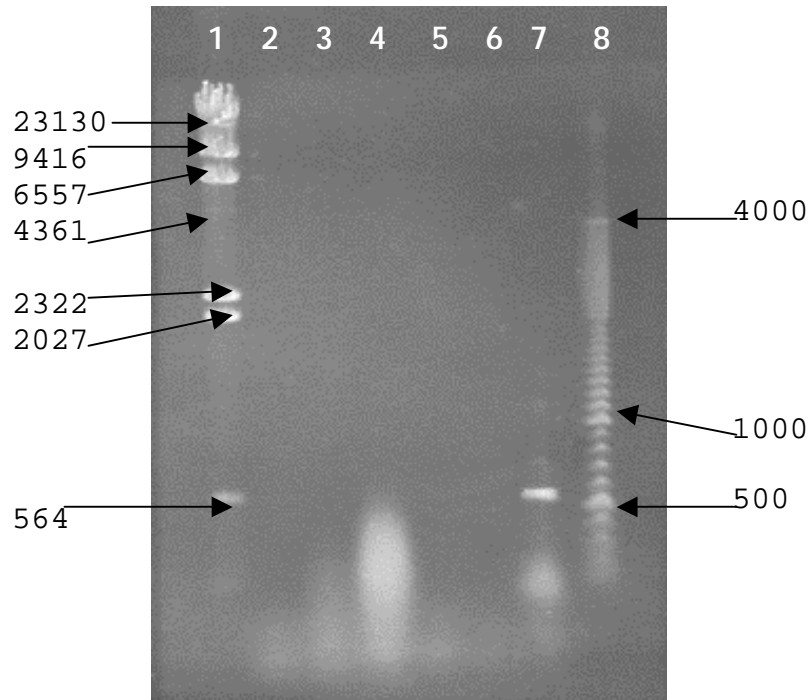
**Figura 17. ADNc de: A) PVY y B) PLRV.** Note en A) la presencia de varias bandas en el carril 2, correspondientes a los diferentes ADNc sintetizados tanto de la planta como viral y en B) la presencia de una sola banda en el carril 2 de aproximadamente 2027 pb la cual corresponde a ADNc viral.

Luego, con el ADNc sintetizado y la pareja de primers correspondientes, se realizó la amplificación para cada uno de los virus. En todos los casos, no se encontró ningún producto amplificado, a excepción del control positivo para la reacción de PCR del virus PLRV, que utiliza como molde el ADN transgénico y el mismo par de primers, donde se observó un fragmento esperado de 536 pb. Estos resultados son un indicio de que los problemas presentados durante la reacción de RT – PCR del virus PLRV, estuvieron posiblemente en la cantidad y calidad del ADNc viral obtenido. Sin embargo, debido a que no se contaron con controles positivos para la reacción de PCR de los virus PVY y PVX, no podemos descartar que los resultados negativos fueran causados por problemas en los primers y/o a condiciones inapropiadas de amplificación.



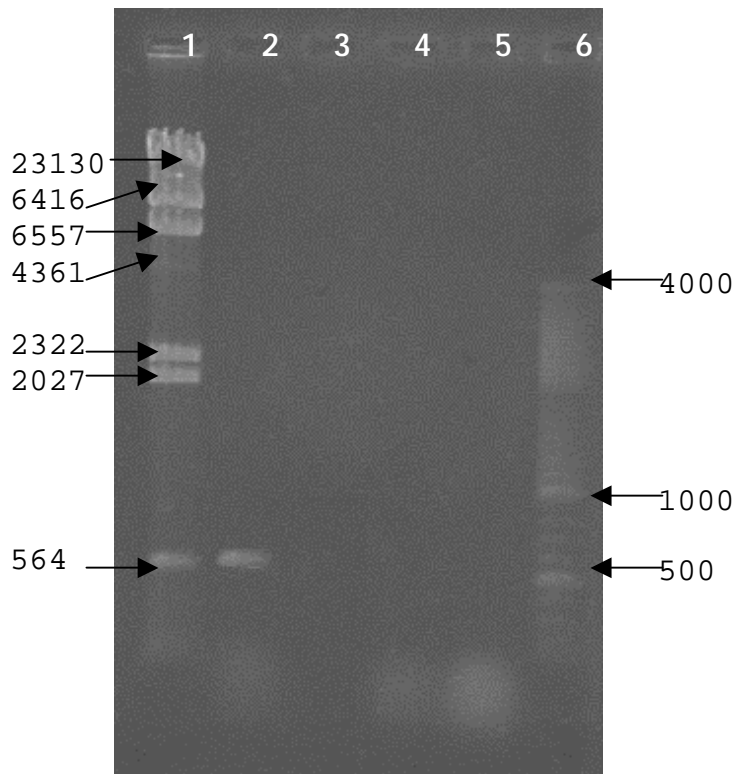
Para el caso de PVY, además de las razones anteriormente expuestas, al analizar el genoma y la región que amplifican los primers, se encontró que por su tamaño (4.1 Kb) la amplificación puede ser difícil. Según trabajos realizados por Singh (1997), la sensibilidad de la prueba de RT-PCR para PVY se ve afectada por el tamaño del segmento a amplificar; él demostró que fragmentos de 412 y 217 pb son detectables a concentraciones virales de 10 a 1 fg, mientras que los de 1040 pb solo eran visibles hasta concentraciones virales de 10 pg. Es posible que para poder visualizar el fragmento de nuestro interés de 4.1 Kb sea necesario que el virus se encuentre en concentraciones altas, y la concentración viral presente en nuestra muestra no sea suficiente. Otra razón muy fuerte y posiblemente la más aceptada, es que, para lograr una completa retrotranscripción de fragmentos grandes es necesario utilizar retrotranscriptasas termoestables. Para la amplificación de este tipo de fragmentos se deben utilizar ADN polimerasas altamente procesivas y con actividad correctora, ya que en las amplificaciones de fragmentos largos se pueden generar errores. Dentro de estas enzimas encontramos la *Pfu*, *Vent* o *Deep Vent DNA polimerasa*. También se podría usar otra enzima de amplificación, tal como la *rTth DNA polimerasa* (Romero, 1997).

Para la amplificación por PCR del virus PLRV, sí podemos afirmar que tanto los primers como las condiciones de amplificación son las apropiadas, ya que los resultados negativos de la reacción de RT – PCR se deben posiblemente a la baja cantidad de ADNc viral sintetizado. La figura 18 muestra los resultados obtenidos para PLRV, no se muestran los demás resultados por ser similares.



**Figura 18. Electroforesis de los productos de RT – PCR para PLRV.** Carril 1:  $\lambda$  Hind III. Carril 2: blanco del PCR. Carril 3: 298. Carril 4: 348. Carril 5: Maris pimper. Carril 6: *Nicotiana benthamiana* (control negativo). Carril 7: ADN de AT 49 (control positivo). Carril 8: ADN leader.

Utilizando el ADN transgénico extraído mediante el kit Ultra clean (MoBio), se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (536 pb). Con el ADN extraído con el método de DNazol (Promega), no se obtuvo producto de PCR; esto puede ser por la baja calidad del ADN extraído y/o por su método de conservación, que utiliza buffer TE, que contiene EDTA y puede afectar la reacción de PCR (figura 19).



**Figura 19. Electroforesis de los productos de PCR del ADN transgénico.** Carril 1: Lamda ( $\lambda$ ) Hind III, Carril 2: PCR del clon AT49 extraído con Ultra Clean. Carril 3: PCR del clon AT49 extraído con DNAzol. Carril 4: PCR del clon AT63 extraído con DNAzol. Carril 5: Blanco de la PCR. Carril 6: ADN leader 100 pb.

#### 4.5. AMPLIFICACIÓN POR IM – RT – PCR.

Una vez realizados los ensayos de RT – PCR para los virus PVY, PLRV y PVX, se prosiguió con el ensayo de inmunocaptura – RT – PCR (IM- RT – PCR) para los mismos. Además se probó esta última técnica con PVX, usando los primers disponible y como muestra el control positivo para este virus suministrado por el kit de ELISA.

Cabe recordar que al material vegetal en estudio no se le realizó la prueba de ELISA para PVX, debido a que no se contaba con suficiente cantidad de anticuerpo, prefiriendo utilizarlos mejor para la prueba de IM – RT – PCR.

La prueba de IM – RT – PCR ofreció un resultado positivo solo para PLRV,

indicando la presencia del virus en los clones 298, 348 y Maris Pipper (Control positivo de ELISA). Los resultados positivos indican también, que tanto los anticuerpos, como los primers y las condiciones de amplificación, son las adecuadas, es decir, que la metodología en todo su conjunto es correcta (Figura 20).

Esta prueba dio negativo para los virus PVX y PVY (no mostrado)

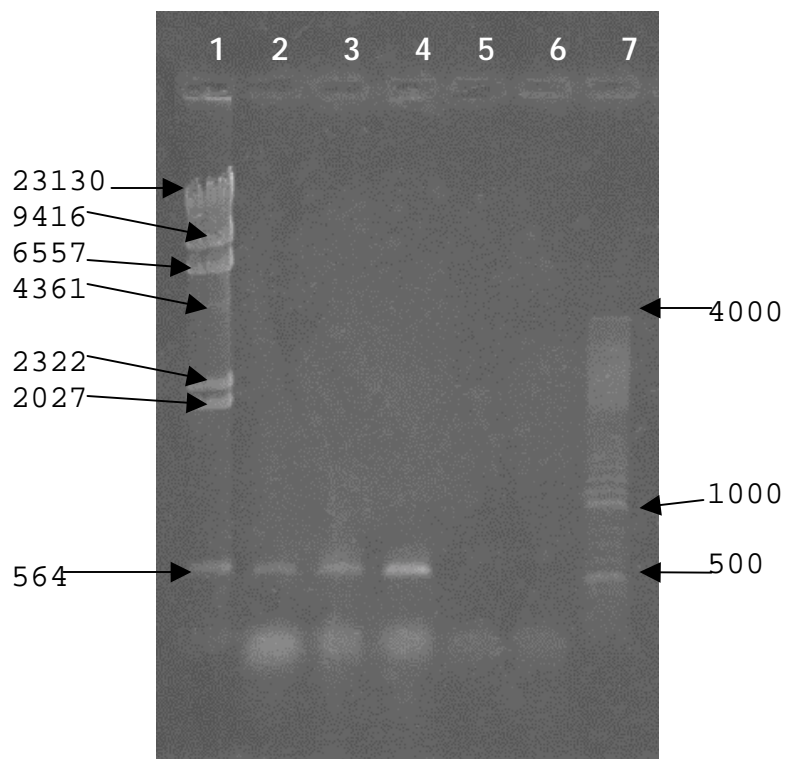
Para PVY se utilizaron como muestras extractos que mediante la prueba de ELISA se había demostrado la alta presencia del virus; sin embargo, la prueba de IM- RT – PCR no los detectó. Se descartan errores debido a la calidad y especificidad de los anticuerpos, debido a que estos fueron usados anteriormente en las pruebas de ELISA. Esto nos hace pensar que los errores ocurrieron ya sea durante la reacción de RT o durante la reacción de PCR. Estas reacciones se hacen bajo las mismas condiciones y con los mismos primers utilizados para la prueba de RT – PCR. Como se dijo anteriormente, esta última prueba no funcionó, haciéndonos pensar que las causas puedan ser las mismas (calidad, naturaleza de los primers, y / o condiciones de retrotranscripción y amplificación). Sin embargo, esto no se puede asegurar debido a que, como se dijo anteriormente, no contamos con controles positivos para la reacción de PCR de PVX y PVY. Se sugiere emplear como controles ADNc de los virus, insertado en vectores de clonación.

Para el resultado negativo de PVX es posible que el liofilizado suministrado por la casa comercial y utilizado como control positivo de la prueba de ELISA, no contenga partículas completas del virus y por lo tanto su subsiguiente retrotranscripción y amplificación no tengan lugar. Los resultados negativos de inoculaciones sobre plantas indicadoras usando este liofilizado apoyan esta hipótesis (resultados no mostrados).

Por último, los problemas pudieron darse durante la reacción de RT – PCR, debido a la naturaleza de los primers, los cuales presentan una temperatura de apareamiento muy disímil entre sí: (42°C para PVX- OX6 y 55°C para PVX- LK) lo cual dificulta el apareamiento, aunque el fragmento esperado sea de un tamaño corto (586 pb). Como en el caso de PVY, esta hipótesis no pudo ser probada debido a que no se contaba con un control positivo para la reacción de PCR.

Para PLRV, utilizando el material en estudio, el cual había dado ELISA positivo ( clones Maris pipper, 298, y 348), se probaron las técnicas de RT-PCR e IM-RT-

PCR. Se encontró que, mientras para el RT-PCR solo se observó un barrido fuerte en la parte final del gel, indicio de degradación del RNA, para la IM-RT-PCR se observa gel un producto de amplificación de 536 pb, el cual corresponde con el tamaño esperado (Franco, 1999). Los resultados positivos para la prueba de IM - RT - PCR indican que tanto los anticuerpos, como los primers y las condiciones de amplificación son las adecuadas; es decir, que la metodología en todo su conjunto es correcta. Los resultados obtenidos para PLRV colocan a la técnica de IM - RT - PCR como metodología apropiada para la detección molecular de dicho virus a partir de extracto de hojas, con ventajas sobre la técnica de RT - PCR en la fácil extracción del RNA viral, utilizando anticuerpos específicos que capturan el virus, lo cual podría aumentar la sensibilidad y selectividad de la técnica, tal como se reporta en la literatura (Leone, 1997; Schoen, 1996) (figura 20).



**Figura 20. IM - RT- PCR para material infectado con PLRV.** Carril 1:  $\lambda$  Hind III, carril 2: 348, carril 3: 298, carril 4: Maris piper, carril 5: *Nicotiana benthamiana* (Control negativo), carril 6: Blanco, carril 7: ADN leader.

## 5. CONCLUSIONES

- De las metodologías usadas para la extracción de ADN, la mejor fue el uso del kit Ultra Clean (MO Bio) para la extracción de ADN vegetal y del suelo, no solo por su facilidad y costo, sino también por la calidad del DNA obtenido y el facilitar su utilización directa para PCR.
- Según los resultados del análisis realizado para PVX, los primers utilizados para la síntesis de cDNA y el primer sentido se encuentran en una región similar a todas secuencias reportadas; mientras que el primer reverso no presenta similitud con ninguna secuencia del virus por ser un Polylinker. Además presentan inconvenientes de apareamiento por presentar temperaturas medias (TM) muy diferentes entre si.
- Para PVY, a pesar de que los primers se localizaron en regiones similares a las secuencias reportadas, no se obtuvo producto de amplificación, debido probablemente a que para la amplificación de fragmentos largos como en este caso, es necesario emplear una retrotranscriptasa y una polimerasa muy procesivas.
- Según los estudios realizados, los primers escogidos para PLRV amplifican una región que es común para todas las cepas reportadas en el Genbank, correspondiente a una parte del gen de la cápside de PLRV, y no coincide con otros organismos similares, siendo específicos para el virus.
- Para PVS, las comparaciones de las secuencias disponibles permiten sugerir el siguiente grupo de primers:

Antisentido 3144 3'-CGACTCTAACACGC -5' 3157  
Sentido 2588 5'- AAGATGGAAATCCGATC -3' 2571

- Por la técnica de IM-RT-PCR se pudo detectar por primera vez en el país la presencia de PLRV en materiales de papa, más no la de PVX y PVY, debido en estos últimos casos posiblemente a la naturaleza de los primers utilizados y a las condiciones en que el RNA viral estaba presente.
- Al comparar la técnica de IM – RT – PCR y la RT –PCR, se encuentran amplias ventajas de la primera por el aislamiento del virus en un solo paso, pero su desarrollo se ve limitado por la necesidad de anticuerpos específicos.

## 6. RECOMENDACIONES

- Valorar la sensibilidad, especificidad y selectividad de la prueba IM – RT - PCR
- Estandarizar la prueba IM-RT-PCR para PVX y PVY, buscando un mejor grupo de primers que permitan su utilización como método de diagnóstico para estos virus.
- Probar los primers propuestos para PVS, utilizando la técnica de IM – RT – PCR.
- Poner a prueba la técnica en estudios epidemiológicos.
- Estandarizar la técnica, buscando estrategias que permitan evaluar la posibilidad de desarrollar una técnica de PCR Múltiplex para la detección simultánea de los principales virus que atacan el cultivo de papa.
- Dar las pautas necesarias para el uso de esta técnica como método de diagnóstico que pueda ser ampliamente utilizado.
- Difundir la utilización de la prueba IM-RT-PCR como metodología para el diagnóstico molecular de PLRV.



## BIBLIOGRAFIA

**AAZIZ R., DINANT S., EPEL B.** 2001. Plasmodesmata and plant cytoskeleton. Trends in plant Science. 6(7): 326 – 330.

**ACOSTA O., MAYO M., BARKER H.** 1991. Prospects for improving virus resistance of potato crops in Colombia by transgenic technology. itopatología Colombiana 18: 65 – 77.

**AGRIOS G. N.** 1997. Plant Pathology. Fourth edition. Harcourt Academic Press. United States of America. 635 p.

**ALONSO J.L., HIJMANS.** 2001. Colombia. En: Word potato atlas. 10 p.

**ASHOUB A, ROHDE W., PRUFER D.** 1998. In planta transcription of a second sub genomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. Nucleic Acids Research. 26: 420 – 426.

**ATREYA, C. D., RACCAH, B. and PIRONE T.P.** 1990. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a Potyvirus. Virology. 178: 161 – 165.

**BAHNER I., LAMB J., MAYO M.A., HAY R.T.** 1990. Expresión of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon *in vivo*. Journal of General Virology. 71(10): 2251 – 2256.

**BANTTARI E., ELLIS P., KHURANA S.M.** 1996. Management of diseases caused by viruses and viruslike pathogens. Potato Health management. Rowe R. Ed. APS press. American Phytopathological Society. Pg 127-133.

**BLEYKASTEN C., GILMER P., GUILLEY H., JONARG G.** 1996. Triple gen block proteins binds nucleic acids in vitro. Journal of General Virology. 77: 889 – 987.

**BRUNT, A.A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M.J., GIBBS, A.J. WATSON, L. and ZURCHER, E.J. (Eds.).** 1996. Plant virus Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión 20<sup>th</sup> August 1996. URL. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/Vide/>.

**CARRINGTON J.C., KASSCHAU K. D., JOHANSEN L.K.** 2001. Activation and supresión of RNA silencing by plant viruses. Virology. 281: 1-5.

**CASTRO C.A., BERMUDEZ Y.** 2000. Detección e identificación del virus del mosaico del ñame por métodos serológicos y moleculares en plantas de *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*. Tesis Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia. 95 p.

**CHUAQUI J., GONZALES B. (ed).** 2000. Manual de patología general. Capítulo 6: técnicas diagnósticas en histopatología. Segunda edición. Universidad Católica de Chile.

**DALLOT S., BOUSALEM M., MALAURIE B.** 1998. A highly sensitive IC – RT – PCR test for the detection of Yam Mosaic Potyviruses in both leaves and tubers of yam species. Poster présenté au 7 éme symposium de la société des tubercules et des raciness, Branche Afrique (ISTRC – AB). Octobre 1998. Nigeria.

**DAROS, J. A., SCHAAD, M. C. and CARRINGTON, J. C.** 1999. Functional analysis of the interaction between VPg – proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of Tobacco Etch Potyvirus, using conditional and suppressor mutans. Journal of virology 73: (10): 8732 – 8740.

**DAVENPORT G., BALCOMBE D.** 1997. Mutation of the GKF motif of the RNA dependent RNA polimerase from potato virus X disables or eliminates virus replication. Journal of General Virology. 78: 1247 – 1251.

**DESBIEZ C., SCHEIBEL – WIPF, C. and LECOQ H.** 1999. Reciprocal assistance for Aphid transmission between Non – transmissible strains of Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus in mixed infections. Archives of virology. 144: 2213 – 2218.

**DIFONZO C. D., RAGSDALE D.W., RADCLIFFE E.B.** 1996. Manejo integrado de PLRV y PVY en papa para semilla, con énfasis en el Valle del Río Rojo de Minesota y Dakota del Norte. Universidad de Minesota. 7 p.

**DOLJA V; GRAMA D., MOROZOV S. Et al.** 1987. Potato virus X related single and double stranded RNAs. Characterization and identification of terminal structures. FEBS letters. 214: 308 – 312.

**DONALD R., LAWRENCE D., JACKSON A.** 1997. The barley stripe mosaic virus 58KDa is a multifunctional RNA binding protein. Journal of General Virology. 71: 1538 – 1546.

**DUPLAT LB.** 1998. Clonación del gen de la cubierta proteica del virus X de la papa. Tesis. Msc. Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

**FACCIOLI G., ROSNER A., FORNI M.** 1995. Use of the polymerase chain reaction to clone the potato leafroll virus coat protein gene directly from the total RNA of infected plants. *Potato Research*. 38: 211- 218.

**FRANCO L., GEACHY K.D., COMMANDEUR U., ET.AL.** 1999. Transformation of tobacco and potato with the cDNA encoding the full length genome of Potato Leafroll Virus: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *Journal of General Virology*. 80 (11): 2813 – 2822.

**GARCÍA A., DUIN JV., PLEIJ C WA.** 1993. Differential response to frameshift signals in eukaryotic and prokaryotic translational systems. *Nucleic Acids Research*, 21 (3): 401 – 406.

**GORBALENYA A., KOONIN E., DONCHENKO A., BLINOV V.** 1988. A conserved NTP motif in putative helicases. *Nature* 333: 22.

**GUZMÁN M.** 1998. Biología molecular del virus de la tristeza de los cítricos: vectores y huéspedes. Monografía. Universidad Nacional de Colombia. Santa fe de Bogotá D.C. 57 p.

**HAWKES J. G.** 1990. The potato. Evolution, Biodiversity and genetic resources. Smithsonian Institution Press. Washington. D.C. 558 p.

**HENSON J. M., FRENCH R.** 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual review of phytopatology*. 31: 81 – 109.

**HERNANDEZ C.E. Y PINEDA C.R.** 1996. Genética y mejoramiento de la papa. Papas Colombianas. Con el mejor entorno ambiental. P. 68 -69.

**HODGMAN T.** 1988. A new superfamily of replicative proteins. *Nature*. 333: 22 – 23.

**HUISMAN M., LINTHORST H., CORNELISSEN B.** 1988. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with varios plus stranded RNA viruses. *Journal of general virology*. 69: 1789 – 1798.

**JACKSON D.** 2000. Opening up the communication channels: recent insights into plasmodesmal function. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 394 – 399.

**JANSEN, R. W., SIEGL, G. and LEMON, S.M.** 1990. Molecular epidemiology of Human Hepatitis A Virus defined by Antigen – Capture Polymerase Chain Reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 2867 – 2871.

**JAYASINGHE, U. and SALAZAR L. F.** 1993. *Manual de Técnicas en Virología de Plantas*. Centro Internacional de la Papa. (CIP). Lima, Perú, 110 p.

**KASSCHAU, K.D., CARRINGTON J.C.** 1998. A counter – defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461 – 470.

**KATININA N., FEDORKIN O., SAMULOVA O., ET AL.** 1996. Expression and biochemical analysis of the recombinant potato virus X 25 K movement protein. *FEBS letters*. 397: 75 – 78.

**KIM K H., HEMENWAY C.** 1996. The 5' nontranslated region of potato virus X RNA affects both genomic and subgenomic RNA synthesis. *Journal of virology*. 70 (8): 5533 – 5540.

**KLEBE R.J., GRANT G.M., GRANT A.M., ET AL.** 1996. RT – PCR without RNA Isolation. *Biotechniques* 21: 1094 – 1100.

**KUJAWA A. B., DRUGEON G., HULANICKA D., HAENNI A L.** 1993. Structural requirements for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA- Dependent RNA polymerase of potato leafroll virus. *Nucleic Acids Research*. 21 (9): 2165 – 2171.

**LAIN S., RIECHMANN J. L., GARCIA J.A.** 1990. RNA Helicase a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* 18 (23): 7003 – 7006.

**LEONE G., SCHIJNDEL H.B., GEMEN B., SHOEN C.D...** 1997. Direct detection in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. *Journal of Virological Methods*. 66: 19 – 27.

**LOPEZ – MOYA, J.J. and GARCIA, J.A.** 1999. Potyviruses (Potyviridae). En: *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, New York, E.E.U.U. p 1369 – 1375.

**MACKENZIE D.J., TREMAINE J.H., SMITH S.** 1989. Organization and intervirial homologies of the 3' terminal portion of Potato Virus S RNA. *Journal of general virology*. 70: 1053 – 1063.

**MAIZELS N., WEINER A.** 1994. Phylogeny from function: evidence from the molecular fossil record that RNA + originated in replication, not translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6729 – 6734.

**MARTIN R.R., JAMES D., LEVESQUE A.** 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual review of phytopathology*. 38: 207 -39.

**MATTHEWS, R. E. F.** 1991. *Plant Virology*. 3rd edition. Academic Press. New York. 835 p.

**MATOUSEK J., SCHUBERT J., DEDIC P., PTACEK J.** 2000. Abroad variability of potato virus s (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase – polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 23: 29 -37.

**MORENO J.D.** 1996. Problemática Del Cultivo de la papa en Cundinamarca y Boyacá. *Papas Colombianas. Con el mejor entorno ambiental*. P. 93- 95.

**MOROSOV S., SOLOVYER A., FEDOIRKIN O. ET AL.** 1991. Expression strategy of the potato virus X triple gen block. *Journal of General Virology*. 72: 2039 – 2042.

**MUNFORD, R.A. and SEAL, S.E.** 1997. Rapid single tube immunocapture RT- PCR for the detection of two Yam Potyviruses. *Journal of Virological Methods*. 69: 73 – 79.

**NICOLAS, O. and LALIBERTÉ, J. F.** 1992. The complete nucleotide secuence of Turnip Mosaic Potyvirus RNA. *Journal of General Virology*. 73: 1 -16.

**NOLASCO, G., DE BLAS, C., TORRES, V. and PONZ, F.** 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant virus and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods*. 45: 201 – 218.

**OLIVEROS O.** 2000. Generalidades acerca de la organización genómica de virus. *Seminario virología*. 3 pg.

**OPARKA K., ROBERTS A.** 2001. Plasmodesmata. A not so open – and – shut case.

Plant Physiology. 125: 123 – 126.

**PEÑARANDA J.** 1996. Biología moléculas de virus: tópicos seleccionados. Bogotá. Editorial Universidad Nacional de Colombia. 509 p.

**PEREIRA R. A.** 2001. Enfermedades virales de la papa. 3p.

**PINEDA C.R.** 1996. Perspectivas para el desarrollo agroindustrial del cultivo de la papa en Colombia. Papas Colombianas. Con el mejor entorno ambiental. P. 71-73.

**Plant Molecular Biology.** A laboratory manual. 1997. Melody S. Clark Ed. Springer – Verlag. New York. P. 54 –74.

**PLANTE C.A., HYUNG K., PILLAI N., et al.** . 2000. Soluble, template - dependent extracts from *Nicotiana benthamiana* plants infected with Potato Virus X transcribe both Plus and minus Strand RNA templates. Virology. 275: 444 – 451.

**PRICE M.** 1993. Multipartite nature of Potato Virus X. Journal of Virology. 67 (1): 596 – 600.

**PRINGLE C.R.** 1998. Virus taxonomy – San Diego 1998. Report of the 27<sup>th</sup> meeting of the executive committee of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology. 143: 1449 – 1459.

**QUERCI M. VAN DER BLUNT R., GOLDBACK A., SALAZAR F.** 1993. RNA secuencia de potato virus X strain HB. Journal of General Virology. 74: 2251- 2255.

**QUIÑONES P.A.** 1998. Genoteca de cDNA del virus X de la papa. Tesis Biología. Universidad Pontificia Javeriana. Bogotá.

**RIECHMANN J. L., LAIN, S and GARCIA, J. A.** 1992. Highlights and prospects of Potyvirus molecular biology. Journal of General Virology. 73: 1 – 16.

**ROBAGLIA C., DURAND M., TRONCHET M., BOUDAZIN G., ET AL.** 1988. Nucleotide secuencia de Potato Virus Y (N Strain) genómico RNA. Journal of General Virology. 70: 935 – 947.

**ROMERO A., BLANCO B., PONZ F.** 1997. Amplification and cloning of a long RNA virus genome using inmunocapture – long RT – PCR. Journal of Virological

methods 66: 159 -163.

**ROHDE W., PRÜFER D.** Molecular Plant Virology. Potato Leafroll Virus (PLRV). Max Planck Institute for Plant Breeding Research. [www.mpiz-koelm.mpg.de](http://www.mpiz-koelm.mpg.de)

**ROULEAU M., SMITH R., BANCROFT J., MACKIE G.** 1994. Purification properties and subcelular localization of tail Potexvirus 26 KDa protein. *Virology*. 204: 254 – 265.

**SALAZAR L.F.** 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la papa. Lima – Perú. 226 p.

**SAMBROOK J. FRITSCH E.F. and MANIATIS T.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1659 p.

**SANCHEZ C.** 2000. La semilla como clave del manejo de enfermedades sistémicas en papa. Papas Colombianas. Con el mejor entorno ambiental. P. 175 - 181.

**SCHOEN C.D., KNORR D., LEONE G.** 1996. Detection of Potato Leafroll Virus in dormant potato tubers by inmunocapture and flourogenic 5' nuclease RT-PCR assay. *Phytopatology*. 86(9): 993 – 999.

**SEPPAREN P., RUSKA R., HONKAREN J., ET AL.** 1997. Movement protein derived resistance to triple gene block containing ant viruses. *Journal of General Virology*. 78: 1241 – 1246.

**SINGH M. and SINGH R.P.** 1997. Potato virus Y detection: Sensitivity of RT – PCR depends on the size of fragment amplified. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 19: 149 – 155.

**SINGH R. P.** 1998. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *Journal of Virological Methods* 74: 125- 138.

**SOKOLOVA M., PRUFER D., TACKE E., ROHDE,W.** 1997. The potato leafroll virus 17 K movement protein is phosphorylated by a membrane associated protein kinase4 from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS letters* 400 (2) : 201 – 205.

**TACAHASHI Y and UYEDA.** 1999. Restoration of the 3' end of Potyvirus RNA

derived from poly (A) – deficient infectious cDNA clones. *Virology*. 265: 147 – 152.

**TORDO M. J., CHACHULSKA A.M., FAKHFAKH H., ET AL.** 1995. Sequence polymorphism in the 5' NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *Journal of General Virology*. 76: 939 – 949.

**VACA J.C.** 1998. Identificación de posibles virus RNA presentes en plantas de lulo (*Solanum quitoense Lam*). Tesis M. Sc. Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá – Colombia. 64 p.

**Virus Taxonomy.** Six report of the International Committee on Taxonomy of viruses. 1995. Ed. Murphy F.A., Fauquet, C.M.; et al. Springer- Verlag. New York. 585 p.

**VOINNET O., PINTO V.M., AND BAULCOME D.C.** 1999. Suppression of gene silencing : a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plant. *Proceedings of the National Academic Science of USA*. 96 (24) : 14147 – 14152.

**VOINNET O., LEDERER C., AND BAULCOME D.C.** 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157 – 167.

**WILK FV. HUISMAN M J., CORNELISSEN B JC. HUTTINGA H., GOLDBACH R.** 1989. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. *Febs letters*. 245 (1-2): 51 -56.

**WON JUNG H., SOO YUN W., WON SEO H., II HAHM Y., HYUNG KIM K.** 2000. Characterization and partial nucleotide sequence of Potato virus X Isolated from Potato in Korea. *The plant Pathology Journal*. 16 (2) : 110 – 117.

**ZACCOMER, B., HAENNI A.L., and MACAYA G.** 1995. The remarkable variety of Plant RNA virus genomes. *Journal of general Virology*. 76: 2331 -247.

**ZAVRIEV S K.** 1999. Carlaviruses. *Enciclopedia of Virology*. Second edition. Vol 1. Academic Press, New York, E.E.U.U p 238 – 242.



## ANEXOS

### **ANEXO A. Prueba de ELISA. (Según las instrucciones de la casa comercial ADGIA ®)**

Para preparación de búferes, ver anexo B.

#### **1. Preparación del anticuerpo de cubrimiento.**

Diluir en relación 1:200 el anticuerpo conjugado en buffer de cubrimiento. Esta preparación debe realizarse minutos antes de ser usada, sobre hielo.

Con esta solución, se inmuniza inmediatamente la placa, colocando 100 µl por pozo y se deja incubando en cámara húmeda a temperatura ambiente por 4 horas o toda la noche a 4°C.

#### **2. Maceración de las muestras.**

Las muestras se maceran tomando 0.5 gramos de tejido en 5 ml. de buffer de extracción; se filtran, se centrifugan a 6000 r.p.m. y se guardan en congelación hasta su uso.

#### **3. Lavados.**

Se lava la placa con PBS – tween de 4 a 6 veces, eliminando con un golpe seco sobre una toalla absorbente, evitando la contaminación de los pozos por mezcla de sus contenidos.

#### **4. Colocación de las muestras.**

Se colocan 100 µl de la muestra por pozo teniendo cuidado de colocar también los controles positivos y negativos y dos como blancos absolutos (pozos G10 y G11). Realizar el diagrama de colocación de las muestras. Dejar incubando por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

#### **5. Lavados.**

Como en el paso 3.

## **6. Preparación del anticuerpo conjugado.**

Minutos antes de ser usado, preparar el anticuerpo conjugado en disolución 1:200 en buffer ECI. De esta solución se sirven 100  $\mu$ l por pozo y se deja incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

## **7. Lavados.**

Como en el paso 3.

## **8. Preparación de la solución de PNP (p- nitrofenil fosfato).**

Disolver una pastilla en 5 ml. de buffer PNP en oscuridad, minutos antes de ser usada. Manejar con cuidado pues la solución de PNP y las pastillas son cancerígenas.

Colocar 100  $\mu$ l de la solución por pozo cuidando de tapar cada pozo a medida que se va llenando. Dejar incubando en cámara húmeda y oscuridad por 30 minutos y hacer la lectura.

## **9. Lectura.**

Leer en el lector de ELISA a 405 nm, a los 30 minutos y a la hora. Parar la reacción con una gota de NaOH 3 M por pozo.

## ANEXO B. Preparación de las soluciones buffer para ELISA.

### 1. Buffer general de extracción.

Disolver en 1000 ml de PBST:

Sulfito de sodio (anhidro) ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )	1.3 g
Polyvinylpyrrolidona (PVP) MW 24 – 40,000	20.0 g
Albúmina de huevo de pollo	2.0 g
Tween 20	20.0 g

Ajustar pH a 7.4. Almacenar a 4°C.

### 2. Buffer de cubrimiento.

Disolver en agua destilada a 1000 ml:

Carbonato de sodio (anhidro) ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	1.59 g
Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	2.93 g

Ajustar pH a 9.6. Almacenar a 4°C.

### 3. Buffer PBS – Tween (PBST) 1X. (Buffer de lavado).

Disolver en agua destilada a 1000 ml:

Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	8.0 g
Fosfato de sodio bibásico (anhidro) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.15 g
Fosfato de potasio monobásico (anhidro) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.0 g
Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )	0.2 g
Tween 20	0.5 g

Ajustar pH a 7.4.

#### 4. Buffer ECI

Adicionar a 1000 ml de PBST 1X:

Albúmina de suero bovino (BSA)	2.0 g
Polyvinylpyrrolidona (PVP) MW 24 – 40,000	20.0 g

Ajustar pH a 7.4. Almacenar a 4°C.

#### 5. Buffer PNP

Disolver en 800 ml de agua destilada:

Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ )	0.1 g
Diethalonamida	97.0 ml

Ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico (HCL). Ajustar el volumen final a 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C.

### **ANEXO C. Tratamiento de los materiales con Dietilpirocarbamato (DEPC)**

Todos los elementos utilizados deben de ser tratados previamente con DEPC (Dietilpirocarbamato). Este reactivo debe ser manejado con cuidado; con guantes, mascarara y en cámara de extracción pues es toxico.

La vidriería se deja en una solución de DEPC al 0.1% por dos horas mínimo (100 µl de DEPC en un litro de agua HPLC) para luego ser secada y puesta a esterilizar a 150 libras de presión, 120 °C por 20 minutos.

El agua se prepara en solución al 0.1 % y se esteriliza a 150 libras de presión, 120°C por 20 minutos para eliminar los restos de DEPC que puedan interferir con la reacción.

## **ANEXO D. Extracción de ARN utilizando TRIZOL®. (Según indicaciones del fabricante, Gifco BGRL)**

**Trizol:** Solución monofásica de fenol e isothiocianato de guanidina.

### **1. Homogenización.**

Tomar aproximadamente 100 mg de tejido vegetal (aproximadamente 3 hojas medianas) y colocar 1 ml de TRIZOL®. Macerar bien la muestra en el homogenizador de vidrio y dejarla incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.

### **2. Separación.**

Adicionar 200 µl de cloroformo y agite con cuidado. Incubar por tres minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 10000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C.

### **3. Precipitación del ARN.**

Con ayuda de una micropipeta y cuidando de no mezclar las fases, tomar la parte superior (de color rosado) y pasar a un tubo nuevo libre de RNAsas.

Colocar 300 µl de isopropanol y homogenizar bien. Dejar incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 10000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C.

### **4. Lavado**

Descartar el sobrenadante y el pellet se lava, colocando 600 µl de etanol al 70 % (preparado con agua tratada con DEPC). Guardar a -80°C para su posterior utilización.

## **ANEXO E. Extracción de ADN utilizando DNAzol® (GIBCO BRL).**

Procedimiento basado en el uso de una solución detergente y lísica de guanidina que hidroliza el RNA y permite la precipitación selectiva del DNA del lisado.

### **1. Extracción.**

Pulverizar 0.1 g del material vegetal en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y una mano hasta obtener un polvo fino. Transferir el polvo a un tubo de micro centrifuga nuevo y adicionar 300 µl de DNAzol®. Mezclar bien por inversión e incubar con agitación por 5 minutos a 25°C. Adicionar 300 µl de cloroformo agitar e incubar por 5 minutos a 25°C nuevamente.

Centrifugar a 10000 r.p.m. por 10 minutos a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante (con ayuda de una micropipeta), a un tubo nuevo.

### **2. Precipitación del ADN.**

Agregar al sobrenadante, 225 µl de etanol al 100%.

Mezclar por inversión 6 a 8 veces e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Sedimentar el ADN por centrifugación a 4000 r.p.m. por 4 minutos y retirar el sobrenadante.

### **3. Lavado del ADN.**

Aparte, preparar una solución de DNAzol®: etanol, tomando 300 µl de DNAzol® y 225 µl de etanol al 100%. Agregar 250 µl de esta solución al tubo, mezclar e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 4000 r.p.m. por 4 minutos a temperatura ambiente.

Retirar la solución de lavado y resuspender el pellet en 70 µl de etanol al 100%. Guardar en nevera a -20°C hasta su uso.

#### **4. Solubilización del ADN.**

Al momento de usar el ADN, este se centrifuga a 4000 r.p.m. por 4 minutos. Se retira el sobrenadante, y el pellet se pone a secar con los tubos puestos verticalmente en cámara de flujo laminar. Resuspender el pellet el 70  $\mu$ l de buffer TE (pH 8.0).



## **.ANEXO F. Extracción de ADN utilizando Ultra clean. (Mo Bio).**

**Precaución:** Trabajar con guantes a temperatura ambiente, evitar contacto con ojos y piel.

1. A un tubo con 2 ml de la **solución espumosa** (Viene en el kit) adicionar 0.05 g de tejido vegetal (macerado previamente en nitrógeno líquido).
2. Revisar la solución **P1**, si esta precipitada, calienta hasta disolver. Adicionar 60 µl de la solución **P1** y realice un vortex hasta mezclar. Puede formarse un precipitado blanco inicialmente pero este se disuelve por calentamiento.
3. Colocar los tubos en un baño con agua o en un baño seco a 55°C por 10 minutos.
4. Fijar los tubos al vortex con ayuda de una cinta, y agitar a máxima velocidad por 10 minutos.
5. Centrifugar a 8000 r.p.m. por 30 segundos. Asegúrese de no exceder esta velocidad, o los tubos se pueden romper.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo de micro centrífuga nuevo.
7. Adicionar 250 µl de la solución **P2**, haga un vortex por 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 minutos.
8. Centrifugar a 8000 r.p.m. por 1 minuto.
9. Evite el pellet, transfiriendo 500 µl del sobrenadante a un tubo nuevo.
10. Adicione 1 ml de la solución **P3** al sobrenadante y haga un vortex por 5 segundos.

**Nota:** Un total de tres cargas por muestra procesada son necesarias. Cargar aproximadamente 650 µl en el filtro giratorio (suministrado) y centrifugue a 8000 r.p.m. por 30 segundos. Descartar el sobrenadante y adicione el sobrenadante sobrante al filtro y centrifugar nuevamente a

8000 r.p.m. por 30 segundos. Eliminar el sobrenadante.

11. Adicionar 300  $\mu$ l de la solución **P4** y centrifugue por 30 segundos a 10000 r.p.m.
12. Eliminar el sobrenadante.
13. Centrifugar de nuevo a 8000 r.p.m. por 1 minuto para remover residuos de la solución **P4**.
14. Cuidadosamente desplazar el filtro giratorio en un tubo nuevo. Evite aplastar algo de **P4** en el filtro giratorio.
15. Adicionar 50  $\mu$ l de la solución **P5** al centro de la membrana blanca del filtro.
16. Centrifugar por 30 segundos a 8000 r.p.m.
17. Descartar el filtro giratorio. El ADN esta en el tubo listo para usar. No es necesario ningún paso más.

Se recomienda almacenar el DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La solución **P5** no contiene EDTA.

## **ANEXO G. Electroforesis del ADN y los productos de ADNc.**

1. Se preparó un gel en agarosa al 0.8% (CPG) en solución buffer TBE 0.5X.
2. Calentar el gel hasta ebullición.
3. Sellar las ranuras de la cámara. Adicionar el gel y colocar los peines. Esperar a que gelifique (30 minutos a 1 hora).
4. Colocar el gel en la cámara y cubrir con buffer TBE 0.5X.
5. Colocar 7  $\mu$ l de muestra por pozo. Cada muestra constaba de:
  - 2.5  $\mu$ l del DNA copia obtenido.
  - 2.5  $\mu$ l de agua DEPC.
  - 2  $\mu$ l de buffer de carga 6X con azul /naranja (Promega).
6. Los patrones de peso molecular se colocan tomando 1  $\mu$ l del fago  $\lambda$  digerido con HIND III (BIOLABS) más 2  $\mu$ l de buffer de carga 6X con azul /naranja (Promega).  
Para el marcador DNA step leader 100 bp 1  $\mu$ g/ $\mu$ l (Promega), se realizó primero una solución stock tomando 2  $\mu$ l del marcador y disolviendo en 8  $\mu$ l de agua, tomar de esta solución 1  $\mu$ l y mezclar con 2  $\mu$ l de buffer de carga 6X con azul /naranja (Promega).
7. Correr a 80 voltios constantes por 1 hora en buffer TBE 0.5X.
8. Revelar el gel, retirándolo de la cámara y colocándolo en una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g /  $\mu$ l) por 10 a 20 minutos, decolorar con agua destilada por 10 minutos y observar bajo luz UV para luego fotografiar.

## ANEXO H. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

### 1. Preparación del gel de poliacrilamida al 15%.

Colocar en un beaker la siguiente mezcla (para 20 ml) en este orden:

Agua destilada y desionizada estéril	6.72 ml
Buffer TBE 0.5 X pH 8.5	5.0 ml
Acrilamida: bisacrilamida* 40% (29 : 1) (CPG)	8.0 ml
Persulfato de amonio	100 µl
TEMED (Biorad)	10 µl

\*La mezcla acrilamida: bisacrilamida es TOXICA. Debe manejarse con cuidado, evitando regarla y con guantes y tapabocas.

Armaz la cámara según las instrucciones del fabricante cuidando de no romper los vidrios y utilizando vidrios de diferente tamaño. Colocar vaselina en las uniones para evitar salida del líquido, servir con cuidado con ayuda de una jeringa evitando que se formen burbujas, colocar los peines y esperar 10 a 20 minutos a que gelifique; retirar con cuidado los peines.

### 2. Montaje del sistema.

El sistema, se coloca en la cámara de electroforesis, la cual ha sido llenada previamente con buffer TBE 0.5 X. Revisar si existen fugas y rellenarlas con vaselina.

### 3. Colocación de las muestras.

Las muestras se colocan en los pozos, cargando 2µl de buffer de carga 6X con azul /naranja (Promega) mas 2 µl de muestra por pozo. Mezclar bien antes de colocar en el pozo.

Correr el gel a 80 Voltios constantes por 1 hora.

### 4. Tinción del gel.

El gel se desmonta del sistema y se tiñe en una solución de bromuro de Etidio (0.5 µg / µl) por 10 a 20 minutos, decolorar con agua destilada por 10 Minutos y observar bajo luz UV para luego fotografiar.

## **ANEXO I: Preparación Búferes y colorantes para electroforesis.**

### **1. Preparación buffer TBE 5X.**

Disolver en agua destilada y desionizada estéril:

Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
ETDA pH 8.0	20 ml.

Completar a un litro con agua destilada y desionizada estéril.

### **2. Preparación buffer TBE 0.5 X (Solución de trabajo).**

Disolver 100 ml de buffer TBE 5X en 900 ml de agua destilada y desionizada estéril. Guardar a temperatura ambiente. Esta solución se puede reutilizar para máximo tres corridas.

### **3. Preparación solución de bromuro de Etidio.**

**PRECAUCIÓN:** Trabajar con guantes y tapabocas cuidando de no dejar ningún residuo en el ambiente.

La solución stock se prepara pesando 0.1 g de bromuro de etidio y disolviendo en 10 ml de agua DEPC. Guardar en oscuridad, rotular.

Para la solución de trabajo, se disuelven 50 µl de la solución stock y se disuelve en 500 ml de agua DEPC. Guardar en frasco ámbar y rotular.

## ANEXO J. Síntesis del ADNc. (Para 20 µl de volumen de reacción)

1. En un eppendorf adicionar 5µl de ARN total más 2.5 µl del primer R (20 Pico moles) y 6.95 µl de agua DEPC.
2. Incubar a 70°C por 10 minutos.
3. Enfriar en hielo por 1 minuto.
4. Realizar la siguiente mezcla para obtener el ADNc:

Buffer PCR (CPG)	10X	2 µl
Mix dNTPs (CPG)	10 mM	0.8 µl
RNA sin (Promega)	40 U	0.25 µl
DTT (Merck)	0.1 M	2 µl

5. Incubar a 42°C por 5 minutos y pasar a hielo.
6. Adicionar 0.5 ml de AMV (CPG) de 20 U / µl.
7. Incubar a 42°C por 45 minutos.
8. Parar la reacción a 70°C por 15 minutos.
9. Pasar a hielo si se desea continuar con la PCR a almacenarlo a -20°C.

**ANEXO K. Amplificación del ADNc y el ADN transgénico. (Para 20 µl de volumen de reacción.**

1. Sobre hielo y en cámara de flujo laminar, realizar el siguiente mix de reacción:

Agua libre de RNAsas.		11.65 µl
Buffer de PCR (CPG)	10X	2.0 µl
Mix dNTPs (CPG)	10mM	0.4 µl
Primer Reverse	20 pm	0.5 µl
Primer Forward	20 pm	0.5 µl
Taq pol (CPG)	5 U/ µl	0.2 µl

2. Colocar 15 µl del mix anterior en el tubo que contiene 5 µl del ADN o del ADNc.
3. Correr el programa de PCR indicado.

## ANEXO L. Inmunocaptura RT – PCR.

1. Colocar 50  $\mu$ l de la solución de anticuerpo primario (ADGIA) para PLRV en disolución 1: 50 en cada tubo. La solución de anticuerpo se prepara en buffer de cubrimiento para ELISA (anexo B).
2. Incubar por 3 horas a 37°C con agitación.
3. Retirar con ayuda de una micropipeta la solución de anticuerpo y colocar 200  $\mu$ l de buffer de lavado (PBS Tween). Dejar actuar por 3 minutos y retirar.
4. Colocar 200  $\mu$ l de la muestra (antígeno) (macerada en buffer de extracción para ELISA en relación 1:10).
5. Incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
6. Retirar la muestra con ayuda de una micropipeta y lavar con PBS tween colocando 200  $\mu$ l del buffer y dejando actuar por 3 minutos. Repetir 3 veces.
7. Incubar los tubos a 70°C por 5 minutos y pasar a hielo de inmediato.
8. Realizar la mezcla de retrotranscripción para 5  $\mu$ l por tubo así:

Agua DEPC		2.625 $\mu$ l
DTT	0.1 M	0.5 $\mu$ l
Buffer PCR (CPG)	10 X	0.5 $\mu$ l
Mix dNTPs (CPG)	10 mM	0.5 $\mu$ l
Primer reverse	20 $\mu$ M	0.625 $\mu$ l
RNA sin (Promega)	40 u/ $\mu$ l	0.125 $\mu$ l
AMV (CPG)	20 u/ $\mu$ l	0.125 $\mu$ l

9. Colocar 5  $\mu$ l de la solución por tubo.
10. Incubar a 42 °C por 45 minutos.
11. Parar la reacción a 95 °C por 3 minutos.
12. Preparar la mezcla de amplificación para PCR (volumen de reacción 15 $\mu$ l).



Agua DEPC		9.5 $\mu$ l
Triton X100	1.7 %	2.25 $\mu$ l
Buffer PCR (CPG)	10 X	1.88 $\mu$ l
Mix dNTPs (CPG)	10 mM	0.375 $\mu$ l
Primer reverse	20 $\mu$ M	0.469 $\mu$ l
Primer forward	20 $\mu$ M	0.469 $\mu$ l
Tac pol (CPG)	5 u/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l

13. Colocar 15  $\mu$ l a cada tubo de reacción.
14. Correr en el termociclador el programa propuesto.
15. Realizar la electroforesis (anexo G. numeral 3.2.6)

**ANEXO M. Acciones de PVX reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.**

AB056718	X05198
AF172259	X12804
AF191105	X55802
AF202462	X62442
AF202463	X62443
AF260640	X62444
AF260641	X62445
AF272736	X65015
AF373728	X72214
AJ270990	X88781
AJ485891	X88782
AJ489260	X88783
D00344	X88784
D87692	X88785
M27662	X88786
M31541	X88787
M38480	X88788
M38655	Z23256
M63141	Z29338
M72416	Z29334
M95516	Z29335
NC-001455	Z34261
U19790	

**ANEXO N. Acciones de PVY reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.**

AB025415	AF372646	AF424726	AJ390289	S63507
AB025416	AF372647	AF424727	AJ390290	S70722
AB025417	AF372648	AF424728	AJ390291	S74810
AB042811	AF372649	AF424729	AJ390292	S74813
AB042812	AF372650	AF424730	AJ390293	U06789
AB042813	AF401600	AF424731	AJ390294	U09508
AF012026	AF401601	AF424732	AJ390295	U09509
AF012027	AF401602	AF463399	AJ390296	U10378
AF012028	AF401603	AJ005639	AJ390297	U25672
AF012029	AF401604	AJ223592	AJ390298	U33454
AF062999	AF401605	AJ223593	AJ390299	U91747
AF118153	AF401606	AJ223594	AJ390300	X12456
AF126258	AF401607	AJ223595	AJ390301	X14136
AF139838	AF401608	AJ245554	AJ390302	X54058
AF139839	AF401609	AJ245555	AJ390303	X54611
AF166115	AF401610	AJ245556	AJ390304	X54636
AF173328	AF424704	AJ245557	AJ390305	X68221
AF227515	AF424705	AJ245558	AJ390306	X68222
AF228630	AF424706	AJ303093	AJ390307	X68223
AF228631	AF424707	AJ303094	AJ390308	X68224
AF228632	AF424708	AJ303095	AJ390309	X68225
AF228633	AF424709	AJ303096	AY061994	X68226
AF228634	AF424710	AJ303097	AY095170	X79305
AF228635	AF424711	AJ313454	D00441	X82848
AF229174	AF424712	AJ315738	D00488	X92078
AF230362	AF424713	AJ315739	D00489	X97895
AF248499	AF424714	AJ315740	D12539	Y16879
AF248500	AF424715	AJ315741	D12570	Z29526
AF255659	AF424716	AJ315742	D17386	Z50041
AF255660	AF424717	AJ315743	D17387	Z50042
AF264151	AF424718	AJ315744	M22470	Z50043
AF275951	AF424719	AJ315745	M37180	Z70237
AF321554	AF424720	AJ315746	M38377	Z70238
AF325927	AF424721	AJ315747	M81435	Z70239
AF325928	AF424722	AJ390285	M95491	
AF345650	AF424723	AJ390286	NC-001616	
AF372644	AF424724	AJ390287	S51663	
AF372645	AF424725	AJ390288	S51664	

**ANEXO Ñ. Acciones de PLRV reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.**

A07935	AF453398
A07940	AF453399
A07941	AF454283
A07947	AY001727
AB001894	AY079210
AF022782	D00530
AF220151	D13746
AF271214	D13753
AF271215	D13953
AF296280	D13954
AF453388	M89926
AF453389	NC-002747
AF453390	S77421
AF453391	U73777
AF453392	U74377
AF453393	Y07496
AF453394	X13906
AF453400	X14600
AF453401	X15501
AF453402	X74789
AF453403	X77321
AF453404	X77322
AF453405	X77323
AF453406	X77324
AF453395	X77325
AF453396	X77326
AF453397	

**ANEXO O. Acciones de PVS reportadas a octubre de 2001 en la base de datos del NCBI.**

AY079209

D00461

S45593

U74375

U74376

Y15609

Y15610

Y15611

Y15612

Y15613

Y15614

Y15615

Y15616

Y15617

Y15618

Y15619

Y15620

Y15621

Y15622

Y15623

Y15624

Y15625