

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA**

**"IDENTIFICACION DE ENFERMEDADES VIRALES EN PAPA  
(*Solanum tuberosum* L.) E IMPORTANCIA DE ALGUNOS  
FACTORES PARA SU MANEJO EN EL SUR DE SONORA"**

**TESIS**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS**

**JESÚS ANTONIO CANTÚA AYALA**

**DICIEMBRE DE 2009**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) E IMPORTANCIA DE ALGUNOS FACTORES PARA SU MANEJO EN EL SUR DE SONORA.**

**TESIS**

Sometida a la consideración del  
Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora.

por

Jesús Antonio Cantúa Ayala

Como requisito parcial para obtener  
el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura.

Diciembre de 2009.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del consejo particular aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR:

\_\_\_\_\_  
DR. PEDRO FIGUEROA LÓPEZ

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. FRANCISCO JOSÉ RIVAS SANTOYO

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ COSME GUERRERO RUÍZ

SUPLENTE:

  
\_\_\_\_\_  
DR. SERGIO FRANCISCO MORENO SALAZAR

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Pedro Figueroa López, por su acertada dirección en el presente trabajo.

Al Dr. Francisco José Rivas Santoyo, Dr. José Cosme Guerrero Ruíz, Dr. Sergio Francisco Moreno Salazar, por sus observaciones para la mejor realización del presente trabajo.

Al personal académico del Departamento de Agricultura y Ganadería, por todas sus enseñanzas en esta etapa de mi desarrollo profesional.

Al Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Patronato para la Investigación y Experimentación Agrícola del Estado de Sonora, A.C. (PIEAES, A.C.); por las facilidades otorgadas.

## **DEDICATORIA**

A la Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería, por darme la oportunidad de concluir una etapa más de mi desarrollo profesional.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle del Yaqui (INIFAP/CEVY).

A mi esposa Pinki Candy Hernández Cortes y a mis hijos Sarai, Esther y Jesús Iván.

A la familia Cantúa Ayala.



## INDICE

	Página
INDICE DE CUADROS .....	vi
INDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUCCION .....	1
LITERATURA REVISADA .....	4
1.1. Generalidades de los virus fitopatógenos. ....	4
1.2. Virus de la papa .....	4
1.3. Virus cuarentenados para México .....	6
1.4. Virus Y de la Papa (PVY) .....	7
1.5. Antecedentes regionales de virus en papa .....	9
1.6. Diagnóstico de virus por técnicas de serología. ....	9
1.7. Diagnóstico de virus por métodos moleculares. ....	10
2.1. Estrategias de manejo de enfermedades de la papa. ....	10
2.2. Utilización de semilla sana .....	11
2.3. Vectores transmisores de virus en papa. ....	12
MATERIALES Y METODOS .....	13
1.1. Muestreo. ....	13
1.2. Análisis de muestras. ....	13
1.2.1. Detección de virus mediante técnica de ELISA. ....	14
1.2.2. Detección de virus mediante RT-PCR. ....	15
1.3. Purificación de productos de PCR. ....	18
1.4. Secuenciación y construcción de árbol filogenético. ....	18
1.5. Validación. ....	19
2.1. Variedades seleccionadas. ....	20
2.2. Localidades seleccionadas. ....	21
2.3. Material reproductivo libre de virus. ....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
1.1. Síntomas asociados a virosis. ....	22
1.2. Virus detectados mediante la técnica de ELISA y RT-PCR. ....	24
1.3. Análisis bioinformático y construcción del árbol filogenético del clon NTN1. ....	24
1.4. Validación con el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. ....	26
1.5. Determinación de virosis entre localidades. ....	26
1.6. Estudio de la influencia varietal y del ambiente sobre la incidencia de virosis. ....	30
CONCLUSIONES .....	32
LITERATURA CITADA .....	33

## INDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Virus que infectan a la papa: abreviación, grupo y medio de dispersión. ....	5
Cuadro 2. Reactivos utilizados en la reacción de RT-PCR. ....	16
Cuadro 3. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.....	17
Cuadro 4. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.....	17
Cuadro 5. Variedades de papa seleccionadas en los diferentes muestreos durante los ciclos 2006–2007 y 2007-2008.....	20
Cuadro 6. Porcentaje de similitud del clon NTN1 en comparación con aislamientos de PVY <sup>NTN</sup> y PVY <sup>N:O</sup> de varias partes del mundo. ....	25
Cuadro 7. Análisis de $X^2$ de la frecuencia de muestras positivas a diferentes virus en 4 localidades del sur de Sonora, ciclo 2006/2007. ....	29
Cuadro 8. Análisis de $X^2$ de la frecuencia de muestras positivas a diferentes virus en 3 localidades del sur de Sonora, ciclo 2006/2007 (excluyendo CEVY-INIFAP). ....	29
Cuadro 9. Análisis de $X^2$ de la frecuencia de muestras positivas a virus en diferentes variedades en la localidad CEVY-INIFAP, ciclo 2007/2008.....	31
Cuadro 10. Análisis de $X^2$ de la frecuencia de muestras positivas a virus en la localidad CEVY-INIFAP, ciclo 2006/2007 y 2007/2008. ....	31



## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Síntomas asociados a muestras positivas al Virus Y de la Papa, variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY <sup>N</sup> ) en cultivos de papa en el sur de Sonora. ....	22
Figura 2. Síntomas asociados a muestras positivas a los Virus Y de la Papa, variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY <sup>N</sup> ) y variante Necrosis del Tubérculo de Papa (PVY <sup>NTN</sup> ) en cultivos de papa en el sur de Sonora. ....	23
Figura 3. Síntomas asociados a muestras positivas al Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) en cultivos de papa en el sur de Sonora. ....	23
Figura 4. Árbol filogenético del clon NTN1 mostrando la homología con once aislados del mundo publicado en la base de datos (NCBI). ....	26
Figura 5. Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en el Valle de Mayo, ciclo 2006/2007. ....	27
Figura 6. Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en Huatabampo, ciclo 2006/2007. ....	27
Figura 7. Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en el Valle del Yaqui, ciclo 2006/2007. ....	28
Figura 8. Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en el CEVY-INIFAP, ciclo 2006/2007. ....	28

## RESUMEN

Considerando que en el sur de Sonora se siembra un amplio rango de variedades de papa con heterogeneidad en cuanto a su respuesta a enfermedades, bajo un amplio espectro de manejo del cultivo; en el presente proyecto de investigación se plantean los siguientes objetivos: Identificación de enfermedades virales presentes en diferentes variedades de papa en el sur de Sonora, e identificación de algunos factores de importancia para el manejo de enfermedades virales en su cultivo.

Los resultados obtenidos de acuerdo a la metodología planteada, indican que se identificaron los Virus Y de la Papa (PVY), Virus Y de la Papa variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY<sup>N</sup>), Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) y se confirmó la presencia del Virus Y de la Papa variante Necrosis del Tubérculo de Papa (PVY<sup>NTN</sup>), en el cultivo de papa en el sur de Sonora. Así también, se evidencia la importancia de utilizar material propagativo sano para disminuir la frecuencia de infección de enfermedades virales en papa en el sur de Sonora.

## ABSTRACT

Considering that in south Sonora, a wide range of potato varieties with heterogeneity in their response to disease are planted under a wide range of crop management, in this research the following objectives were established: Identification of viral diseases present in different varieties of potato in south Sonora; identification of some factors of importance for the management of virus diseases in crop. The results obtained according to the proposed methodology, indicated that there were identified the Potato Virus Y (PVY), Potato Virus Y Tobacco Veinal Necrosis variant (PVY<sup>N</sup>), Tobacco Mottle Virus (TEV) and confirmed the presence of Potato Virus Y variant of Potato Tuber Necrosis (PVY<sup>NTN</sup>) in the potato in south Sonora. Also, it shows the importance of healthy propagative material used to reduce the frequency of viral infections in potato in south Sonora.

## INTRODUCCION

La papa es nativa de la cordillera andina de Sudamérica, donde ha servido como producto principal en la dieta del habitante nativo por siglos o milenios, habiéndose seleccionado muy diversos tipos. Evidencias recientes sugieren que la papa fue domesticada hace 10 000 años cerca del lago Titicaca en lo que hoy es la frontera entre Bolivia y Perú, donde actualmente existe una gran diversidad de especies silvestres (Ames de Icochea, 1980; Hooker, 1986; Stevenson, *et al.* 2004).

La papa es ahora cultivada en muchas partes del mundo bajo diversas condiciones climáticas, ha tenido un papel importante en la revolución industrial de muchos países de Europa y ha tenido el potencial para alimentar cientos de millones de personas en otras partes del mundo por su amplia adaptabilidad y altos rendimientos. La dispersión del cultivo de papa en el mundo, ha sido posible a través de avances en la investigación en mejoramiento, producción de semillas, manejo de plagas y enfermedades y en tecnología de producción así como en prácticas de postcosecha. Avances en programas de producción de sanidad de semillas han logrado algunos de los mayores contrastes en la producción de papa. Así, áreas bajo producción de papa y rendimiento por unidad de área se han duplicado en muchas partes de Asia (incluyendo India, Pakistán y China) y África durante las últimas dos décadas (Khurana y Garg, 1998).

En la actualidad la papa es la planta dicotiledónea más importante como fuente de alimentación humana; ocupa el cuarto lugar entre los principales cultivos alimenticios del mundo y es superada solamente por gramíneas como trigo, arroz y maíz. La producción alcanzó la cifra sin precedentes de 320 millones de toneladas en 2007. China es el principal país productor seguido por la Federación Rusa, India, Ucrania y los Estados Unidos. El consumo de papa se extiende considerablemente en el mundo en desarrollo, que hoy produce más de la mitad de la cosecha mundial, y donde la facilidad de cultivo y el gran contenido de energía de la papa la han convertido en valioso producto comercial para millones de agricultores (FAO, 2008).

El cultivo de papa en el estado de Sonora, se ha incrementado significativamente en los últimos años, pasando de 5,012 ha sembradas en el ciclo otoño-invierno 1999, a 10,296 ha para el ciclo otoño-invierno 2007 (SIAP, 2008). De esta superficie cultivada más del 90 % se concentra en el sur del estado, lo cual implica que para su producción además de los problemas técnicos y de comercialización, el cultivo se somete de manera natural al impacto de plagas y enfermedades, donde éstas últimas suelen ser ocasionadas por hongos, bacterias, virus y nematodos (Borbón y Armenta, 1996; Evans, 1993; DGSV, 2004).

Entre los virus más importantes que afectan al cultivo de papa, se ha reportado la presencia del Virus Y de la Papa (PVY), el cual es un potyvirus con un amplio rango de hospedantes y uno de los más importantes y frecuentes en el cultivo de papa a nivel mundial; este virus presenta tres diferentes variantes: PVY<sup>O</sup> (variante Común), PVY<sup>C</sup> (Línea Punteada), PVY<sup>N</sup> (Necrosis de la Nervadura del Tabaco), esta última comprende un aislamiento denominado PVY<sup>NTN</sup> (Necrosis del Tubérculo de la Papa); el cual puede reducir la calidad de la producción y del tubérculo de papa, se pueden diagnosticar a menudo por los patrones del mosaico en las hojas y malformaciones de la hoja y del tubérculo (Ames de Icochea, 1980; Nie and Singh, 2002; Stevenson, *et al.* 2004). Para México, la importancia de las variantes PVY<sup>N</sup> y PVY<sup>NTN</sup> radica en que afectan considerablemente la productividad y calidad del tubérculo en el cultivo de papa; así también por ser consideradas plagas reglamentadas y de importancia cuarentenaria para los países miembros de la NAPPO (SAGARPA, 1996; NAPPO, 2003).



Considerando que en el sur de Sonora se siembra un amplio rango de variedades de papa con heterogeneidad en cuanto a su respuesta a las enfermedades, bajo un amplio espectro de manejo del cultivo; en el presente proyecto de investigación se plantean los siguientes:

#### Objetivos:

Identificación de enfermedades virales presentes en diferentes variedades de papa en el sur de Sonora.

Identificación de algunos factores de importancia para el manejo de enfermedades virales en el cultivo de papa, en el sur de Sonora.

#### Hipótesis:

No existe el virus Y variante Necrosis del Tubérculo de Papa PVY<sup>NTN</sup>; en el cultivo de papa en el sur de Sonora.

La variedad, la localidad y la sanidad del material propagativo no influyen en la incidencia de enfermedades virales en papa en el sur de Sonora.



## LITERATURA REVISADA

### 1. Identificación de virus.

#### 1.1. Generalidades de los virus fitopatógenos.

Los virus son entidades simples y acelulares formadas por una o más moléculas de ADN o de ARN rodeadas por una cubierta de proteínas que, en ocasiones, también contiene otras sustancias como lípidos e hidratos de carbono. Solamente pueden multiplicarse en el interior de células vivas, es decir, son parásitos intracelulares obligados y tienen la habilidad de causar enfermedades. Los virus difieren grandemente de todos los otros patógenos de las plantas no solamente en tamaño y forma, sino también en la simplicidad de su constitución química y estructura física; métodos de infección; multiplicación y translocación dentro del hospedante; diseminación y síntomas que ocasionan en el hospedante (Prescott, 2002; Agrios, 2005).

#### 1.2. Virus de la papa

El cultivo de papa es hospedante de más de dos docenas de virus (Cuadro 1) bajo condiciones naturales de ocurrencia mundial. Debido al modo vegetativo de propagación del cultivo, la infección de virus se incrementa en incidencia e intensidad con sucesivas plantaciones de la misma población infectada, lo cual finalmente conduce a un estado referido como degeneración, cuando los rendimientos disminuyen casi a la mitad y el cultivo no es redituable. La obtención de semilla de papa sana es un factor limitante mayor y es mitigado mediante la adopción de sistemas organizados, los cuales incluyen la selección de clones libres de virus y su multiplicación de tal manera que se prevenga su reinfección. Este sistema ha sido apoyado por resultados de investigación en los campos del mejoramiento, detección de virus, manejo de plagas y enfermedades, etc. (Berger, 1997; Khurana y Garg, 1998; Slack y Singh, 1998).

**Cuadro 1.** Virus que infectan a la papa: abreviación, grupo y medio de dispersión.

Nombre	Abreviación	Grupo	Vector/Dispersión
Virus Mosaico de la Alfalfa	AIMV	Grupo AIMV	Áfidos
Virus Latente Andino de la Papa	APLV	Tymovirus	Escarabajos/me- canica/semilla
Virus Moteado Andino de la Papa	APMV	Comovirus	Escarabajos/me- canica/semilla
Virus Arrugamiento de la Remolacha	BCTV	Geminivirus	Chicharrita
Virus Mosaico del Pepino	CMV	Cucumovirus	Áfidos
Virus Mosaico Aucuba de la Papa	PAMV	Potexvirus	Áfidos/mecánica
Virus Mosaico Deforme de la Papa	PDMV	Geminivirus (?)	Mosquita blanca (?)
Virus Hoja Enrollada de la Papa	PLRV	Luteovirus	Áfidos
Virus "Mop Top" de la Papa	PMTV	Tobavirus	Hongos
Virus A de la Papa	PVA	Potyvirus	Áfidos
Virus M de la Papa	PVM	Carlavirus	Áfidos/mecánica
Virus S de la Papa	PVS	Carlavirus	Áfidos/mecánica
Virus T de la Papa	PVT	Capilloviruses	Semilla/mecánica
Virus V de la Papa	PVV	Potyvirus	Áfidos
Virus X de la Papa	PVX	Potexvirus	Mecánica
Virus Y de la Papa	PVY	Potyvirus	Áfidos
Viroide Tubérculo Fusiforme de la Papa	PSTVd	Grupo PSTVd	Mecánica/semilla
Virus Enanismo Amarillo de la Papa	PYDV	Rhabdovirus	Chicharrita

Virus Nervadura Amarilla de la Papa	PYVV	?	Mosquita Blanca
Virus rizado Foliar de las hojas de las Solanáceas	SALCV	Geminivirus	?
Virus Mosaico del Tabaco	TMV	Tobamovirus	Mecánica
Virus Necrosis del Tabaco	TNV	Necrovirus	Nematodos
Virus Cascabelero del Tabaco	TRV	Tobravirus	Nematodos
Virus Mancha Anular del Tabaco	TRSV	Nepovirus	Nematodos
Virus Estriado del Tabaco	TSV	Glarvirus	Polen/trips
Virus Anillo Negro del Tomate	TBRV	Nepovirus	Nematodos
Virus Marchitez Manchada del Tomate	TSWV	Tospovirus	Trips

(Adaptado de Khurana y Garg, 1998; Slack y Singh, 1998).

### 1.3. Virus cuarentenados para México

La Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO), en la Norma Regional sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF) No. 3, "Requisitos para la importación de papa hacia un país miembro de la NAPPO", para prevenir la introducción de plagas cuarentenarias hacia la región de la NAPPO, establece los requisitos para el comercio de papa entre los tres países miembros de la NAPPO, entre cada país miembro de la NAPPO y los países con los cuales mantienen relaciones comerciales fuera de la región de la NAPPO; menciona como plagas reglamentadas a los siguientes virus: Virus Latente Andino de la Papa (APLV), Virus Moteado Andino (APMoV), Arracacha Virus B-Oca Strain (AVB-O), Virus Rizado Apical de la Remolacha (BCTV), Mosaico Deformante de la Papa (Brasil) (PDMV), Virus T de la Papa (PVT), Virus U de la Papa



(PVU), Virus V de la Papa (PVV), Virus Y de la Papa variante Y<sup>C</sup> (PVY<sup>C</sup>), Amarillamiento de las Nervaduras (PYVV), Mancha Anular del Tabaco, Estriado del Tabaco Variedad Papa, Marchitez Manchada del Tomate, Enrollamiento de la Hoja (PLRV), Virus A de la Papa (PVA), Virus S de la Papa (PVS), Virus X de la Papa (PVX), Virus Y de la Papa variante Y<sup>0</sup> (PVY<sup>0</sup>), Virus Cascabelero del Tabaco (TRV), Enanismo Amarillo de la Papa, Virus Mosaico Amarillo de la Papa y Virus Y de la Papa variante Y<sup>N</sup> (NAPPO, 2003).

La Norma Oficial Mexicana NOM-012-FITO-1996, por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la papa; menciona como productos de cuarentena absoluta, a los siguientes Virus: Virus Estriado del Tabaco, Virus Necrosis del Tabaco, Virus Latente Andino de la Papa, Virus Moteado Andino de la Papa, Mosaico Deformante de la Papa, Virus T de la Papa, Virus Enanismo Amarillo de la Papa, Virus Nervadura Amarilla, Virus Rayado Andino Cálico de la Papa, Virus Enanismo Rayado de la Alfalfa, Virus Anillo Negro del Tomate, Virus Marchitez Manchada del Tomate, Virus Y de la Papa variante Clorótica, Virus Y de la Papa variante Necrótica y el Virus Arrugamiento de la Remolacha (SAGARPA, 1996).

#### 1.4. Virus Y de la Papa (PVY)

El Virus Y de la Papa (PVY) es uno de los virus más comunes, por lo que tiene una distribución mundial y es uno de los más importantes afectando la producción de papa. Este virus presenta tres variantes bien identificadas: PVY<sup>0</sup> (variante Común), PVY<sup>C</sup> (Línea Punteada) y PVY<sup>N</sup> (Necrosis de la Nervadura del Tabaco), esta última comprende un aislamiento denominado PVY<sup>NTN</sup> (Necrosis del Tubérculo de la Papa); el cual puede reducir la calidad de la producción. PVY está presente en todo el mundo. PVY<sup>C</sup> está presente en Australia, Ecuador, Europa, América del Norte, América del Sur y Nueva Zelanda. PVY<sup>N</sup> está presente en África, Europa, Nueva Zelanda y América del Sur (Argentina, Chile, Colombia y Perú) y en brotes aislados en América del Norte. PVY<sup>NTN</sup>, un subgrupo de PVY<sup>N</sup> ha sido registrado en Europa (Alemania, Austria, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Francia, Hungría, Italia, Países Bajos, Reino Unido y la antigua Yugoslavia), Israel y el Líbano (Ames de Icochea, 1980; Jeffries, 1998; Stevenson, *et al.* 2004).

El PVY es el miembro tipo de la familia *Potyviridae*, el más grande y tal vez más importante grupo de virus en plantas. Esta familia incluye aproximadamente 180 miembros, los cuales causan pérdidas significativas en cultivos agrícolas, forrajes, hortícolas y ornamentales. Los virus de esta familia tienen un genoma de ARN de aproximadamente 9.5 kb, formando partículas flexibles helicoidales de 700-900 nm de longitud y 11 nm de ancho (Ames de Icochea, 1980; Stevenson, *et al.* 2004).

Los síntomas en papa varían ampliamente con la variante del virus y la variedad del cultivo. En general tanto el PVY<sup>O</sup> como el PVY<sup>C</sup> inducen síntomas mucho más severos que el PVY<sup>N</sup>, el cual produce un mosaico impreciso en las plantas con infección primaria, al igual que en plantas provenientes de tubérculos infectados (infección secundaria); cuando la infección se produce tardíamente, el follaje puede no presentar síntomas, pero los tubérculos de tales plantas pueden llevar consigo la enfermedad. Los síntomas primarios de PVY<sup>O</sup>, dependiendo de la variedad, se manifiestan en forma de necrosis, mosaico o amarillamiento de los folíolos, decaimiento de las hojas y a veces muerte prematura; las plantas con infección secundaria para PVY<sup>O</sup> son enanas, de hojas encarrujadas y moteadas; a veces se produce necrosis en el follaje y en los tallos; el mosaico de las hojas puede enmascarse a temperaturas muy bajas (10 °C), o muy altas (25 °C), pero a altas temperaturas la enfermedad es identificada por el encarrujamiento y rugosidad del follaje. En algunas variedades el PVY<sup>C</sup> provoca rayado fino y las plantas infectadas se quedan enanas y mueren prematuramente; existe generalmente una correlación entre los síntomas del follaje y del tubérculo, sin embargo, el mosaico suave comúnmente inducido por la variante PVY<sup>N</sup> no va acompañado por síntomas en los tubérculos. Las variedades que a la infección con PVY<sup>O</sup> reaccionan con necrosis en el follaje, muestran a veces anillos de color castaño claro en la piel de los tubérculos. En algunas variedades, la variante PVY<sup>C</sup> puede inducir necrosis interna y externa del tubérculo. Las infecciones primarias con PVY<sup>NTN</sup> causan un mosaico intervenal y rugosidad en las hojas y áreas necróticas anilladas en los tubérculos; plantas con infección secundaria presentan un mosaico distinto en las hojas y desarrollan una severa necrosis en los tallos y venas, la característica definitiva de la variante es su habilidad para producir una necrosis severa en follaje y en tubérculos de papa (Ames de Icochea, 1980; Stevenson, *et al.* 2004).



### 1.5. Antecedentes regionales de virus en papa

En investigaciones realizadas en el Valle del Mayo, durante el periodo de 1994 a 1998, se colectaron muestras de malezas cercanas a los cultivos de chile, papa, tomate y tomatillo. Las muestras fueron procesadas con la prueba de ELISA, en las cuales se encontraron los virus: Virus Mosaico del Tabaco (TMV), Virus Jaspeado del Tabaco (TEV), Virus Mancha Anular del Tabaco (TRSV), Virus Mosaico del Pepino (CMV), Virus Mosaico de la Alfalfa (AIMV), Virus Y de la Papa (PVY), Virus Marchitez Manchada del Tomate (TSWV) y Virus Moteado Leve del Chile (PMMV) (Ramírez, 2000).

En el Valle del Mayo, durante el otoño-invierno de 1997, los virus más comunes en el cultivo de papa fueron: Virus Mosaico del Tomate (ToMV) y Virus Enrollamiento de la Hoja de Papa (PLRV); estando presentes también el Virus Mosaico del Tabaco (TMV), Virus Jaspeado del Tabaco (TEV), Virus Mosaico del Pepino (CMV), Virus Mosaico de la Alfalfa (AIMV), Virus Marchitez Manchada del Tomate (ToSWV) y Virus Moteado Leve del Chile (PMMV) (Ramírez, 1999).

### 1.6. Diagnóstico de virus por técnicas de serología.

La prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas o ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), es un método confiable y rápido para la detección de agentes fitopatógenos, ya que hace posible la detección de cantidades muy pequeñas de estos agentes en órganos de plantas y además permite estimar la concentración de los fitopatógenos en el tejido enfermo (Cruz y Frías, 1997).

Las pruebas de ELISA, se basan en la interacción específica de un antígeno (patógeno) y un anticuerpo. Estas técnicas han sido de gran utilidad en la detección de patógenos de vegetales, ya sea en tejido, suelo o agua, con la posibilidad de hacer pruebas cuantitativas. La técnica de ELISA también se usa en el control de calidad de la producción de semilla de papa en los grandes países productores (Canadá y Holanda) para la detección de los principales virus y bacterias, en las categorías de semilla genética y básica o de fundación (SOMEFI, 2006).



### 1.7. Diagnóstico de virus por métodos moleculares.

Las técnicas moleculares son herramientas poderosas en la detección oportuna y específica de patógenos de plantas, presentando ventajas especiales en microorganismos difíciles de cultivar, difíciles de identificar después de ser cultivados o presentes en bajas cantidades (Flores, *et al.* 2000). Las técnicas de diagnóstico molecular se apoyan en su gran mayoría en el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Actualmente se han desarrollado técnicas alternativas o complementarias de PCR básico o simple, como Nested PCR, Hot-Star PCR, Touch Down PCR, PCR inverso, RAPD, RACE, DD-PCR, PCR múltiple, PCR cuantitativo, PCR *in situ*, PCR asimétrico y RT-PCR (Reversa Transcriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta última ha demostrado ser potente principalmente para el diagnóstico y detección en virus de ARN. El procedimiento de RT-PCR consta de tres pasos: desnaturalización del ARN e hibridación del primer complementario, síntesis del cADN y amplificación por PCR (SOMEFI, 2006).

Hu, *et al.* (1995), evaluaron tres métodos para detecciones virales; transcripción reversa-PCR (RT-PCR), hibridación y ELISA, determinando que la transcripción reversa-PCR fue el más eficiente.

Nie and Singh (2002), por medio de la RT-PCR determinaron métodos para la diferenciación de aislamientos de PVY<sup>N</sup> y PVY<sup>NTN</sup> de la Unión Europea y América del Norte para agruparlos geográficamente, sobre la base de variación de la secuencia en P1 y 5'-UTR del genoma de PVY

## 2. Manejo de enfermedades virales.

### 2.1. Estrategias de manejo de enfermedades de la papa.

En los países desarrollados las enfermedades ocasionadas por virus en papa son una de las mayores causas de bajo rendimiento y su control requiere el desarrollo de tecnologías apropiadas para la región. Todos los métodos de control de virus solamente podrían ser posibles y efectivos cuando dos aspectos fundamentales en virología son considerados: el desarrollo de métodos de detección de virus económicos, simples y sensibles, y la identificación de todos los virus de la región (Salazar, 1997).

La coordinación de múltiples estrategias para el control de las enfermedades es llamada manejo integrado de enfermedades, entre las que se incluyen. Hospedantes resistentes, que es la capacidad genética de la planta a sobreponerse completamente o parcialmente al efecto de un patógeno plaga o daño por factores del medio ambiente. Exclusión, es el proceso de reducir la exposición de las plantas a los patógenos previniendo o minimizando la introducción de patógenos hacia los sitios de producción del cultivo. Protección, que involucra el uso de controles químicos, biológicos o prácticas culturales que interfieren con los procesos de infección o minimizan el desarrollo de enfermedades (Stevenson, *et al.* 2004).

## 2.2. Utilización de semilla sana

Una de las principales estrategias del manejo integrado de enfermedades, es la utilización de materiales de propagación vegetativa libre de patógenos, como en el caso de ciertos cultivos como la papa que han desarrollado programas complejos de inspección, pruebas y certificación sanitarias para producir papas para siembra libre de patógenos. En todos los estados productores de papa para siembra debe cumplirse con cierto grado de tolerancia máxima permisible, la cual va a variar ligeramente ante las diferentes enfermedades (Agrios, 2005).

Uno de los principales factores que determinan la buena productividad del cultivo de papa es la calidad del tubérculo-semilla. Sin embargo, este cultivo se ve afectado por plagas y enfermedades que pueden ocasionar serias pérdidas. Se conocen más de 20 virus que infectan a la papa y muchos de ellos pueden ocasionar severas pérdidas en el rendimiento. Estos pueden ser diseminados mediante el uso de tubérculos-semillas infectados, por contacto con plantas infectadas, mediante el uso de herramientas contaminadas o por vectores como insectos, nematodos y hongos (Cañedo, 1997).

Una enfermedad viral se considera importante cuando los virus pueden llegar a ocasionar reducciones significativas en los rendimientos, entre los virus de papa que causan reducciones significativas tenemos al PLRV, PVY, PVX, etc.; cuando la distribución es más amplia, tal es el caso del PLRV, PVY, PVX y PVS que tienen distribución mundial, cuando un virus se disemina rápidamente y esta tiene relación directa con la forma de transmisión y la dinámica de sus vectores. No existe producto químico que controle a los virus; por consiguiente la prevención constituye el único

método efectivo de control, esto significa que el manejo de materiales libres de virus demandan gastos económicos significativos (Barrera, 1997).

### 2.3. Vectores transmisores de virus en papa.

Entre los principales insectos transmisores de virus se encuentran los áfidos, los cuales están adaptados tanto morfológicamente como su comportamiento a su forma de transmisión. El principal vector o transmisor de las enfermedades virosas de la papa es el pulgón verde de la papa o pulgón del durazno *Myzus persicae* Sulzer; también encontramos a los afidos *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Aphis gossypii* y *Aphis nasturtii*. Los áfidos pueden adquirir los virus durante los breves periodos en que prueban los tejidos epidérmicos de las plantas infectadas o cuando se alimentan de ellos. Solo toma unos segundos para que las partes bucales se contaminen y luego el áfido puede transmitir los virus inmediatamente a otras plantas (Cañedo, 1997).

Las variantes del Virus PVY causan enfermedades en muchas plantas de la familia *solanácea*, incluyendo a la papa, chile, tabaco y tomate; otras plantas de las familias *Chenopodiaceae* y *Leguminoseae* también son buenos hospederos. El Virus PVY puede ser transmitido mecánicamente entre plantas por el contacto del follaje y también de tubérculo a tubérculo; sin embargo la infección transmitida por áfidos es considerada el método más importante de transmisión natural en campo, principalmente por la presencia de áfidos alados que pueden transmitirlo a grandes distancias. El Virus PVY puede ser transmitido por más de 25 especies de áfidos, de los cuales *M. persicae* es uno de los vectores más eficientes; el virus es llevado en el estilete del insecto y transmitido en pocos segundos en forma no persistente después de alimentarse. La transmisión depende de una proteína viral (componente de ayuda) presente en el tejido de plantas infectadas; el inoculo del Virus PVY puede también ser introducido hacia los campos por medio de tubérculos infectados. El PVY es uno de los virus que causa más daño en papa, las pérdidas debido a la reducción del rendimiento y calidad pueden ser catastróficas, con pérdidas en campo que van del 10 al 80 %, la infección comúnmente conduce a reducciones significativas en la rentabilidad del cultivo de papa (Ames de Icochea, 1980; Stevenson, *et al.* 2004).



## MATERIALES Y METODOS

### 1. Para la identificación de virus

#### 1.1. Muestreo.

El muestreo se llevó a cabo en experimentos de cultivos de papa, sembrados a campo abierto, en las instalaciones del Campo Experimental Valle del Yaqui del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CEVY-INIFAP), localizado en el Block 910, Valle del Yaqui, Sonora, geográficamente ubicado en la zona sur del estado de Sonora, en el paralelo 27° 22' de latitud Norte y a 109° 53' de longitud Oeste del meridiano de Greenwich, sobre una altitud de aproximadamente 39 msnm. Se establecieron durante los ciclos agrícolas otoño-invierno 2006–2007 y 2007-2008, en un lote con las siguientes características: tipo de suelo arcilloso o barrial compactado, modalidad de siembra en surcos a 80 cm de distancia entre surcos, con riego por goteo y utilizando la metodología realizada por los productores de papa de la región.

Adicionalmente se tomaron muestras de plantas con síntomas asociados a virosis, de experimentos establecidos para evaluar factores de manejo en lotes de agricultores en los valles del Yaqui y Mayo.

El muestreo fue dirigido al follaje de papa que presentaba síntomas asociados a virosis; como hojas enrolladas, mosaicos, mosaicos rugosos, necrosis, enanismo, clorosis y moteados.

#### 1.2. Análisis de muestras.

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Patronato para la Investigación y Experimentación Agrícola del Estado de Sonora, A.C. (PIEAES, A.C.), mediante el protocolo PO-LB-30 Técnica de ELISA validado por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF/DGSV/SENASICA/SAGARPA).

### 1.2.1. Detección de virus mediante técnica de ELISA.

Las muestras con síntomas de virosis fueron analizadas para el Virus Y de la Papa (PVY), Virus Y de la Papa variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY<sup>N</sup>), Virus Jaspeado del Tabaco (TEV), Virus Enrollamiento de la Hoja de Papa (PLRV) y Virus Mosaico del Pepino (CMV).

Esta técnica se realizó con el paquete de reactivos de la marca AGDIA<sup>®</sup>. Se realizó bajo la metodología siguiente:

- Se pesaron 200 mg de muestra y se colocaron en un mortero, se agregaron 2 ml de solución amortiguadora de extracción. Se maceró la muestra en el mortero con la ayuda del pistilo.
- Identificamos la muestra y el tipo de análisis a realizar en el formato FT-LB-27 de técnica de ELISA, indicando la ubicación de los controles positivo, negativo y blanco, así como la ubicación de la muestra en la placa de ELISA.
- Se colocaron 100 µl de la muestra y de los controles correspondientes, en los pocitos sensibilizados con el virus o patógeno a identificar, en la placa de ELISA.
- Se incubó la placa toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.
- Se lavó la placa eliminando el contenido de la misma con un giro de 180° en forma rápida, enérgica y con paro brusco; añadimos solución amortiguadora de lavado y se dejó reposar 2 minutos; se eliminó la solución amortiguadora de lavado y se colocó la placa boca abajo sobre papel secante o absorbente y se golpeó firmemente sobre el papel para eliminar el exceso de líquido; se repitió ocho veces el procedimiento de lavado de la placa.
- Se adicionó la enzima conjugada; se preparó 15 minutos antes de que termine la incubación y se agregó 100 µl en el pocito correspondiente.
- Se incubó la placa con la enzima conjugada dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Se lavó la placa eliminando el contenido de la misma con un giro de 180° en forma rápida, enérgica y con paro brusco; se añadió solución amortiguadora de

lavado y se dejó reposar 2 minutos; se eliminó la solución amortiguadora de lavado y se colocó la placa boca abajo sobre papel secante o absorbente y se golpeó firmemente sobre el papel para eliminar el exceso de líquido; se repitió ocho veces el procedimiento de lavado de la placa.

- Se adicionó 100 µl de solución amortiguadora del substrato de la enzima.
- Se incubó la placa con el substrato de la enzima en cámara húmeda a temperatura ambiente y bajo condiciones de oscuridad.
- Se realizó la lectura de la placa a los 15, 30 y 60 minutos en un lector MULTISKAN EX, Thermo, ELECTRON CORPORATION, TYPE 355, Serial RS-232 C, a una longitud de 405 nm.
- Se detuvo la reacción adicionando 50 µl de NaOH 3M en cada pocito.
- La reacción se consideró como positiva (presencia del fitopatógeno) cuando la lectura de densidad óptica fue igual o mayor a tres veces la media del testigo negativo.

#### 1.2.2. Detección de virus mediante RT-PCR.

Muestras positivas al Virus Y variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY<sup>N</sup>) por medio de la técnica de ELISA, fueron corroboradas para la variante Necrosis del Tubérculo de Papa (PVY<sup>NTN</sup>); mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Reversa Transcriptasa (RT-PCR).

Primeramente se realizó extracción de ARN bajo la metodología siguiente:

- En un mortero estéril se maceraron 100 mg de tejido con 1000 µl de Trizol<sup>®</sup> hasta homogenizar la mezcla y se pasó a un tubo estéril de 1.5 ml.
- Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 30 segundos.
- Se centrifugó a 14000 rpm por un tiempo de 10 minutos a 4 °C.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y estéril.
- Se agregaron 500 µl de isopropanol.
- Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 14000 rpm por un tiempo de 10 minutos a 4 °C.



- Se decantó el sobrenadante y se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 75%.
- Se centrifugó a 5000 rpm por un tiempo de 4 minutos, a 4 °C.
- Se decantó y se dejó secar aproximadamente 3 minutos en una sanita, a temperatura ambiente.
- Se resuspendió el ARN en 50  $\mu\text{l}$  de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.1mM) y se almacenó a -20°C.
- Se verificó la calidad de ARN de la muestra mediante espectrofotometría.

Posteriormente se realizó la RT-PCR bajo la metodología siguiente:

- Se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de ARN de la muestra en tubos de microcentrifuga de 200  $\mu\text{l}$  y se incubaron en un termociclador Eppendorf, Mastercycler, eppgradients, No. 5345 017118, a una temperatura de 65 °C durante 5 minutos.
- Posteriormente se pusieron en hielo por 5 minutos, mientras se preparó la mezcla de reacción para RT como se indica en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Reactivos utilizados en la reacción de RT-PCR.

Reactivos	Cantidad
Agua MQ	5.0 $\mu\text{l}$
Solución amortiguadora RT 5X	4.0 $\mu\text{l}$
DNTPs 10 mM	0.5 $\mu\text{l}$
Iniciador 1 10 pmoles/ $\mu\text{l}$	2.0 $\mu\text{l}$
DTT10X	2.0 $\mu\text{l}$
RNasa Out 40 U/ $\mu\text{l}$	1.0 $\mu\text{l}$
Reversa transcriptasa 200U/ $\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{l}$
ARN de la muestra	5.0 $\mu\text{l}$
Volumen total	20.0 $\mu\text{l}$

- Se pusieron en el termociclador para sintetizar cADN bajo las siguientes condiciones: 42 °C 1 hora, 94 °C 5 minutos.
- Se sacaron los tubos y se pusieron en hielo, se preparó la mezcla de reacción para PCR como se indica en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Reactivos utilizados en la reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad
H <sub>2</sub> O MQ	11.5 $\mu$ l
solución amortiguadora 10X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 Mm	1.0 $\mu$ l
dNTP's 10 Mm	0.5 $\mu$ l
Iniciador 1 10 pmol/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
Iniciador 2 10 pmol/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
taq Polimerasa 5 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
cADN de la muestra	5.0 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

- Los iniciadores utilizados fueron: iniciador 1 A 5'CATTTgTgCCCAATTgCC3', iniciador 2 S4 5'ggTgAAgCTAATCATgTCAAC3'.
- Se colocaron los tubos en el termociclador, previamente programado de acuerdo a las condiciones de temperatura indicadas en el Cuadro 4.
- Finalizado el programa del termociclador se retiraron los tubos y se almacenaron a -20 °C hasta que se efectuó la electroforesis.

**Cuadro 4.** Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Condiciones de temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 94°C	2 min	1
Desnaturalización 94°C	1 min	35
Alineamiento 55°C	1 min	35
Extensión 72°C	1 min	35
Extensión final 72°C	10 min	1
Temperatura final 6°C	$\infty$	

Finalmente se realizó la electroforesis bajo la metodología siguiente:

- Se disolvió agarosa a una concentración de 1.2 % en solución amortiguadora SB 1X, y se calentó en un horno de microondas hasta su completa disolución.
- Se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50 °C y se vació en un molde dentro de la cámara de electroforesis para realizar el gel de agarosa.
- Cuando se polimerizó el gel se añadió a la cámara de electroforesis solución amortiguadora SB 1X hasta que cubrió completamente el gel.
- Se mezclaron 12 µl de ADN de la muestra, producto de la RT-PCR con 03 µl de solución amortiguadora de carga naranja G (2.5 mg/ml colorante naranja G, 5 mM EDTA y 30% glicerol).
- Se cargó la muestra (mezcla) dentro de los pozos del gel de agarosa, también en otro pozo se cargaron 3 µl de un marcador de peso molecular de referencia de 100 pares de bases.
- Se realizó la electroforesis a 180 voltios por un tiempo de 45 minutos.
- Terminada la electroforesis se pasó el gel a un recipiente con bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/L durante un tiempo de 10 minutos.
- Finalmente se pasó el gel al transluminador con luz ultravioleta y se fotodocumentó el fragmento amplificado.

### 1.3. Purificación de productos de PCR.

Los fragmentos de ADN amplificados del RT-PCR fueron cortados del gel de agarosa y purificados, utilizando el paquete de reactivos High Pure PCR product purification (PROMEGA®); y ligados al vector pGEM-T-Easy vector (PROMEGA®), siguiendo el protocolo original del fabricante. Posteriormente se realizó la digestión del plásmido con *Escherichia coli* RI (INVITROGEN®) para verificar si se encontraban los fragmentos amplificados inicialmente insertados.

### 1.4. Secuenciación y construcción de árbol filogenético

Los fragmentos clonados en *E. coli* fueron secuenciados en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Irapuato (CINVESTAV/IPN).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los datos reportados en el The National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la herramienta BLAST (Block Local alignment Search) (Altschul, *et al.* 1994) que proporciona los porcentajes de homología y similitud que existe entre secuencias blanco obtenidas y las secuencias de la base de datos del NCBI. Así mismo se realizaron los árboles filogenéticos mediante el programa bioinformático MEGA 3.1.

#### 1.5. Validación.

Tubérculos de papa, de plantas muestreadas y que fueron corroborados como positivos a la variante Necrosis del Tubérculo de Papa (PVY<sup>NTN</sup>) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Reversa Transcriptasa (RT-PCR); fueron enviados para su validación al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal (CNRF/DGSV/SENASICA/SAGARPA).

## 2. Para la evaluación de factores de manejo.

### 2.1. Variedades seleccionadas.

Considerando que en el sur de Sonora se siembra un amplio rango de variedades de papa, en el presente trabajo de investigación durante los ciclos otoño-invierno 2006–2007 y 2007-2008, se seleccionaron (Cuadro 5) las más utilizadas por los productores de la región, así como algunas de reciente introducción.

**Cuadro 5.** Variedades de papa seleccionadas en los diferentes muestreos durante los ciclos 2006–2007 y 2007-2008.

Variedad	Ciclo 2006-2007				Ciclo 2007-2008	
	CEVY	Yaqui	Mayo	Huatabampo	CEVY	CEMAY
Vivaldi	si	si	si	si	-	si
Atlantic	si	si	si	si	-	si
Lady	si	si	si	si	-	si
Christl						
Princess	si	si	si	si	-	si
Satina	si	si	si	si	si	si
Milva	si	si	si	si	-	si
Adora	-	si	si	si	-	si
Fianna	-	si	si	si	si	si
Gigant	-	si	si	si	-	si
Caesar	-	si	si	si	-	si
Fabula	-	si	si	si	-	si
Alpha	-	si	si	si	si	si
Inova	si	-	-	-	-	-
Biogold	si	-	-	-	-	-
Exempla	si	-	-	-	-	-
FL-867	-	-	-	-	si	-



## 2.2. Localidades seleccionadas.

En el ciclo agrícola otoño-invierno 2006–2007, se seleccionaron diferentes localidades del sur de Sonora para la toma de muestras. Una de ellas fue el experimento para evaluar factores de manejo establecido en el Block 910, Campo Experimental Valle del Yaqui (CEVY-INIFAP); se sembró un surco de 25 m de longitud de cada variedad, el día 20 de diciembre del 2006. Otras localidades fueron la del Block 1712 del Valle del Yaqui; la del predio “Sapomora” municipio de Navojoa, y la del predio “El Alamito 3 Carlos” municipio de Huatabampo donde se habían establecido 12 variedades en viveros de observación. En el primero de ellos, las variedades se sembraron en surcos de 50 m de longitud por variedad, el día 19 de diciembre del 2006; en el segundo se tenían sembradas en 12 surcos (uno por variedad) de 100 m de longitud, establecidas el día 15 de diciembre del 2006, y en el último, en surcos de 400 m de longitud por variedad, sembradas el día 21 de diciembre del 2006.

En el ciclo otoño-invierno 2007-2008, se seleccionaron dos localidades del sur de Sonora para el establecimiento del experimento. Una localidad fue en el Block 910, Campo Experimental Valle del Yaqui (CEVY-INIFAP); parcelas de cuatro surcos de 5 m de longitud de cada variedad, con dos repeticiones, sembradas el día 19 de diciembre del 2007. Otra en el Campo Experimental Valle del Mayo (CEMAY-INIFAP); surcos de 50 m de longitud de cada variedad, sembradas el día 20 de diciembre del 2007.

## 2.3. Material reproductivo libre de virus.

En el ciclo agrícola otoño-invierno 2006–2007, se utilizó material certificado libre de virus para el experimento establecido en el Block 910, Campo Experimental Valle del Yaqui (CEVY-INIFAP). Para las otras localidades no se determinó la sanidad del material propagativo.

En el ciclo agrícola otoño-invierno 2007–2008, se utilizó material certificado libre de virus para el experimento establecido en el Block 910, Campo Experimental Valle del Yaqui (CEVY-INIFAP). Para la otra localidad no se determinó la sanidad del material propagativo.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Identificación de los virus.

#### 1.1. Síntomas asociados a virosis.

En los predios donde se realizó el muestreo dirigido al follaje de papa con síntomas de virosis, los síntomas más comunes encontrados fueron: mosaico rugoso, necrosis, enanismo y clorosis (Figuras 1, 2 y 3).



**Figura 1.** Síntomas asociados a muestras positivas al Virus Y de la Papa, variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY<sup>N</sup>) en cultivos de papa en el sur de Sonora.



**Figura 2.** Síntomas asociados a muestras positivas a los Virus Y de la Papa, variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY<sup>N</sup>) y variante Necrosis del Tubérculo de Papa (PVY<sup>NTN</sup>) en cultivos de papa en el sur de Sonora.



**Figura 3.** Síntomas asociados a muestras positivas al Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) en cultivos de papa en el sur de Sonora.



### 1.2. Virus detectados mediante la técnica de ELISA y RT-PCR.

Los virus detectados por medio de la técnica de ELISA en las muestras procesadas fueron: Virus Y de la Papa (PVY), Virus Y de la Papa variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY<sup>N</sup>) y Virus Jaspeado del Tabaco (TEV). El virus detectado por medio de la técnica de RT-PCR, fue el Virus Y de la Papa variante Necrosis del Tubérculo de Papa (PVY<sup>NTN</sup>). Estos resultados concuerdan en parte con los reportados para el Valle del Mayo en el sur de Sonora por Ramírez (1999, 2000). Con estos resultados se rechaza la hipótesis nula planteada que: “No existe el Virus Y variante Necrosis del Tubérculo de Papa PVY<sup>NTN</sup>”; en el cultivo de papa en el sur de Sonora.

El Virus Enrollamiento de la Hoja de Papa (PLRV) y Virus Mosaico del Pepino (CMV) no fueron detectados en las muestras analizadas. Aquí cabe hacer la aclaración que la mayoría de las muestras procesadas presentaban alguna sintomatología asociada a virosis, por lo que existe la posibilidad que estén otros virus presentes en el cultivo de papa en el sur de Sonora, o también otros patógenos o deficiencias de nutrientes que estén ocasionando síntomas similares.

### 1.3. Análisis bioinformático y construcción del árbol filogenético del clon NTN1.

La secuencia de 379 pares de bases fue analizada en la base de datos del NCBI, se realizó el árbol filogenético (Figura 4) del clon NTN1 (obtenida del sur de Sonora) y se comparó con once aislamientos de diferentes regiones del mundo para realizar los múltiples alineamientos, se encontró una similitud de identidad del 100% con dos aislados de PVY<sup>NTN</sup> de Eslovenia, un 99% con aislado de PVY<sup>NTN</sup> de Alemania y Reino Unido y un 98% con reportes de aislados de PVY<sup>N:O</sup> de Estados Unidos y un 92 % de homología con aislados de PVY<sup>N</sup> reportados en Canadá (Cuadro 6 ). Aunque se encontró una alta homología con diferentes aislados del mundo, la presencia del virus podría deberse a importaciones de papa proveniente de Norteamérica, debido a la importación de tubérculo para semilla proveniente de esa región.

La diversidad y recombinación del Virus PVY es variada. En los cultivos de papa del sur de Sonora se encontraron PVY y PVY<sup>N</sup> mediante pruebas serológicas, mientras que con RT-PCR y la comparación y análisis de secuencias putativamente se encontró la presencia de PVY<sup>NTN</sup>. Esta información es inquietante por la agresividad de esta variante

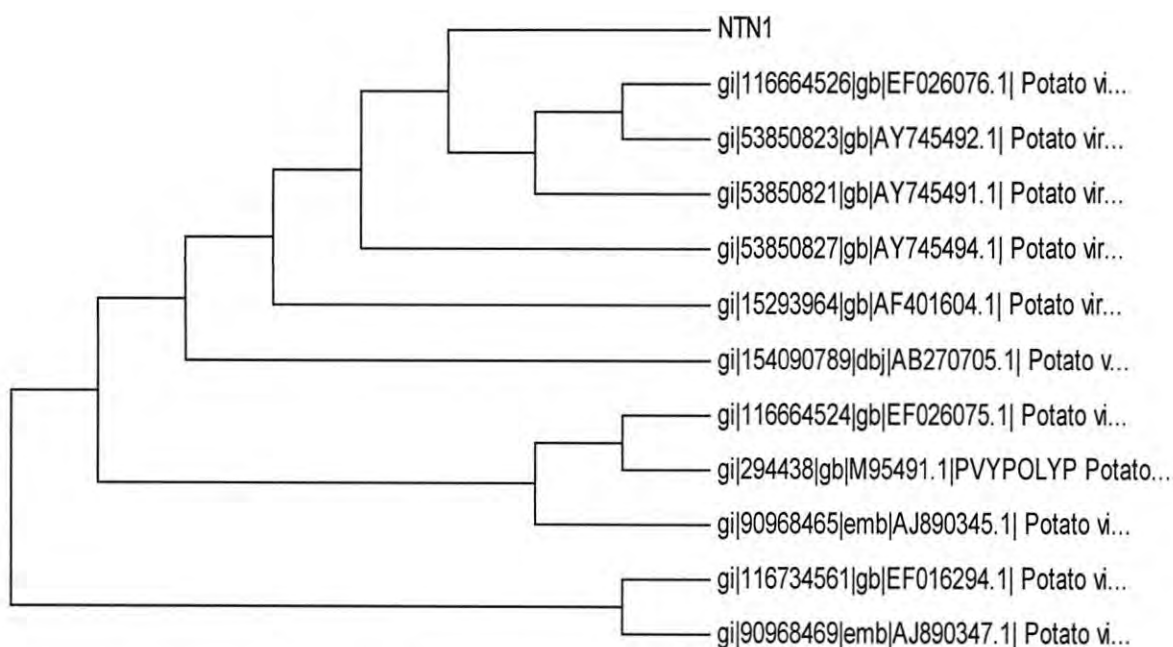
en otras regiones del mundo, sin embargo según comentarios personales de productores no se han visto afectados de manera significativa en la producción como se reporta en otros países.

Desde 1997 se han monitoreado embarques de semilla de papa provenientes de Canadá, en ese año de 172 embarques analizados, 16 fueron positivos a PVY y siete positivos a la variante necrótica; en 1998 dos de 23 muestras resultaron positivas a PVY<sup>N</sup> (Cruz, *et al.* 2002), y según reportes en 2004 en Nuevo León se han identificado algunas muestras positivas a PVY<sup>N</sup> (Guerrero, 2005). Otros investigadores reportan variantes PVY<sup>O</sup> y aislados de PVY<sup>N</sup> relacionados con PVY<sup>NTN</sup> en el Estado de Toluca (Ramírez, *et al.* 2009); y en Tapalpa, Jalisco en 2003-2004 se detectó la presencia de PVY<sup>N</sup> y algunos aislados relacionados con PVY<sup>NTN</sup> (Hernández, 2007). Estudios siguieron que la variante PVY<sup>NTN</sup> ha surgido de algunas recombinaciones naturales de PVY<sup>O</sup> o de PVY<sup>C</sup> con PVY<sup>N</sup>; esto se debe a la mezcla genética causada por la recombinación de subgrupos lo cual puede conducir a la aparición de nuevas cepas aisladas del virus, algunos de los cuales por lo tanto puede adquirir nuevas propiedades biológicas, como sucedió con el biotipo de PVY<sup>NTN</sup> (Revers, *et al.* 1996).

**Cuadro 6.** Porcentaje de similitud del clon NTN1 en comparación con aislamientos de PVY<sup>NTN</sup> y PVY<sup>N:O</sup> de varias partes del mundo.

Numero de acceso	Descripción	Similitud de Identidad
EF026075.1	Potato virus strain NTN, complete genome	100
AF401604.1	Potato virus Y SI 64 polyprotein gene, P1 protease región, partial	100
AB270705.1	Potato virus Y gene for polyprotein , complete cds, strain: N	99
AJ890347.1	Potato virus Y strain NTN gene for polyprotein, genetic RNA, iso	99
AJ890345.1	Potato virus Y strain NTN gene for polyprotein, genetic RNA, iso	99
M95491.1	Potato virus Y polyprotein gene, complete cds	99
EF016294.1	Potato virus Y strain NTN isolate v942490, complete genome	99
EF026076.1	Potato virus Y isolate N:O, complete genome	99
AY745494.1	Potato virus Y isolate N:O-Mb146, polyprotein gene, partial cds	99
AY745492.1	Potato virus Y isolate N:O-L56, complete genome	99





**Figura 4.** Árbol filogenético del clon NTN1 mostrando la homología con once aislados del mundo publicado en la base de datos (NCBI).

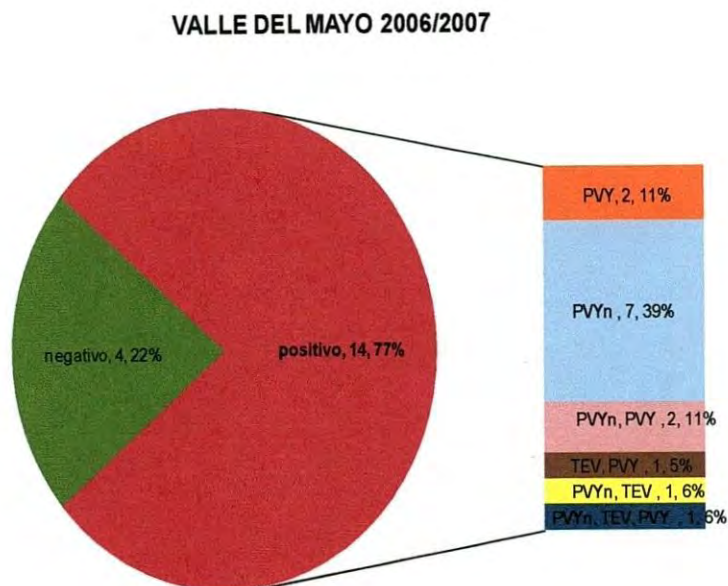
#### 1.4. Validación con el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Las muestras que fueron enviadas para su validación al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal (CNRF/DGSV/SENASICA/SAGARPA), fueron confirmadas y el diagnóstico fue: positivo al Virus Y variante Necrosis del Tubérculo de Papa (PVY<sup>NTN</sup>), mediante oficio No. BOO.01.04.01-11445 de fecha 16 de octubre del 2008. Estos resultados nos confirman la presencia del Virus PVY<sup>NTN</sup> variante necrosis del tubérculo de papa en el sur de Sonora, el cual es considerado de importancia cuarentenaria para México.

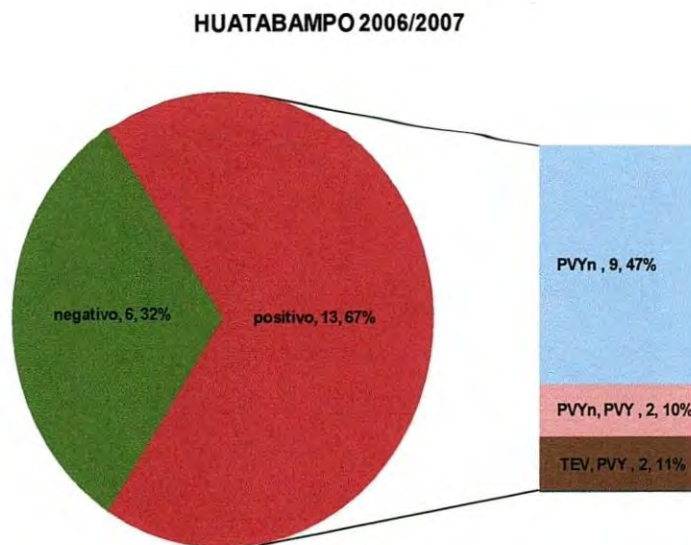
#### 1.5. Determinación de virosis entre localidades.

Los resultados de las muestras analizadas en el ciclo 2006/2007 de las localidades del Valle del Mayo, Valle del Yaqui, Huatabampo y CEVY-INIFAP se muestran en las figuras 5, 6, 7 y 8. Comparándolas, se observa una notoria diferencia de la frecuencia de muestras positivas registradas en el CEVY-INIFAP con respecto al resto de las localidades. Para determinar la significancia estadística de estas diferencias se realizó un

análisis de conteos (no paramétrico), mediante la prueba de ji cuadrada ( $\chi^2$ ), cuyos resultados se muestran en el Cuadro 7.

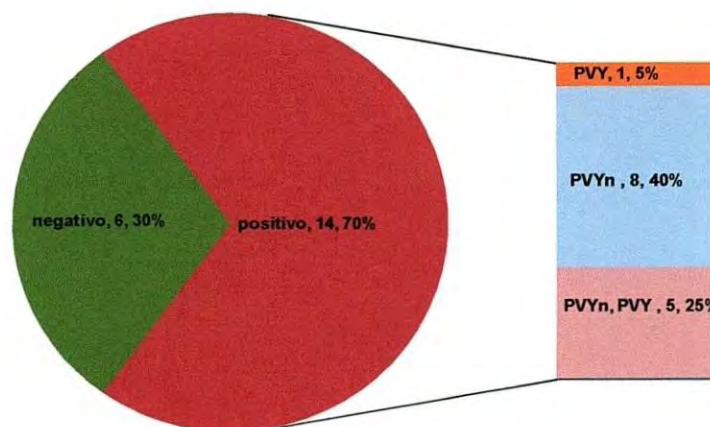


**Figura 5.** Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en el Valle de Mayo, ciclo 2006/2007.



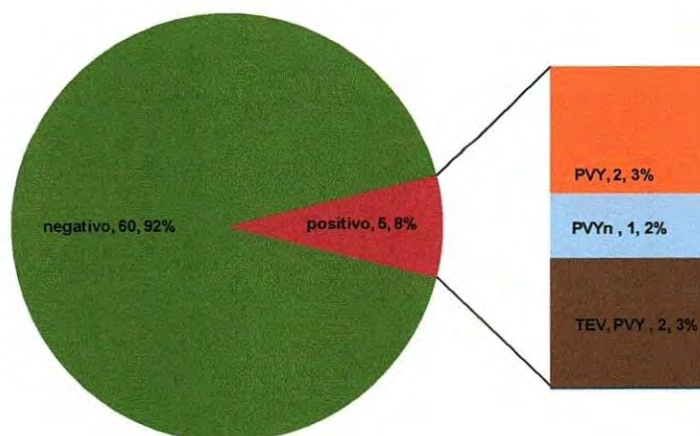
**Figura 6.** Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en Huatabampo, ciclo 2006/2007.

### VALLE DEL YAQUI 2006/2007



**Figura 7.** Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en el Valle del Yaqui, ciclo 2006/2007.

### CEVY-INIFAP 2006/2007



**Figura 8.** Porcentajes de muestras positivas y virus detectados en muestras analizadas de la localidad muestreada en el CEVY-INIFAP, ciclo 2006/2007.

**Cuadro 7.** Análisis de  $X^2$  de la frecuencia de muestras positivas a diferentes virus en 4 localidades del sur de Sonora, ciclo 2006/2007.

POSITIVOS	O	E	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
Valle del Mayo	14	7.54	6.46	41.72	5.53
Valle del Yaqui	14	6.79	7.21	52.03	7.67
Huatabampo	13	7.16	5.84	34.06	4.75
CEVY-INIFAP	5	24.51	-19.51	380.57	15.53
				$X^2 =$	33.48

El valor obtenido de ji cuadrada, 33.48, nos indica que la probabilidad de obtener una desviación tan grande o mayor a la observada, debida a la casualidad, es menor a 0.001 (considerando el valor de 16.268, para 3 grados de libertad), por lo que se rechaza la hipótesis nula de que las 4 localidades pertenecen a la misma población. Observando que la localidad CEVY-INIFAP fue la que contribuyó más al valor obtenido de  $X^2$ , se realizó nuevamente un análisis excluyendo dicha localidad (Cuadro 8), para probar la hipótesis nula de que las localidades de Valle del Mayo, Huatabampo y Valle del Yaqui pertenecen a la misma población. En él se observa una drástica reducción del valor de  $X^2$  a 0.13, indicando que la probabilidad de obtener una desviación tan grande o mayor a la registrada entre los valores observados y los esperados, debida a la casualidad, es mayor a 0.95 (considerando el valor de 0.352, para 3 grados de libertad), por lo que se acepta la hipótesis nula de que las 3 localidades pertenecen a la misma población.

**Cuadro 8.** Análisis de  $X^2$  de la frecuencia de muestras positivas a diferentes virus en 3 localidades del sur de Sonora, ciclo 2006/2007 (excluyendo CEVY-INIFAP).

POSITIVOS	O	E	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
Valle del Mayo	14	12.95	1.05	1.11	0.09
Valle del Yaqui	14	14.39	-0.39	0.15	0.01
Huatabampo	13	13.67	-0.67	0.44	0.03
				$X^2 =$	0.13



Considerando ambos análisis, y que el CEVY-INIFAP está dentro del Valle del Yaqui, se infiere que la diferencia entre esta localidad y el resto no es atribuible a su localización geográfica sino a algún otro factor. Comparando las características de los lotes establecidos en las cuatro localidades, es evidente que el origen del material reproductivo utilizado en cada localidad tuvo un papel determinante en los niveles de incidencia de plantas con síntomas, ya que la semilla utilizada en el CEVY-INIFAP fue material certificado como libre de virus, mientras que el material propagativo utilizado en el resto de las localidades fue producto de material producido por varias generaciones en la región, por lo que había estado expuesto a la infección durante varias generaciones. Por lo tanto, estos resultados se consideran evidencia de la importancia de utilizar material propagativo sano para disminuir la frecuencia de infección de enfermedades virales.

#### 1.6. Estudio de la influencia varietal y del ambiente sobre la incidencia de virosis.

Para probar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas en la susceptibilidad a virosis entre variedades, se analizaron los datos de las muestras procesadas durante el ciclo 2007/2008 en el CEVY-INIFAP (material certificado como libre de virus al inicio del experimento) realizando un análisis de conteos (no paramétrico), mediante la prueba de ji cuadrada ( $\chi^2$ ), cuyos resultados se muestran en el Cuadro 9.

En él se observa que el valor obtenido de ji cuadrada, 1.98, nos indica que la probabilidad de obtener una desviación tan grande o mayor a la observada entre las 4 variedades comparadas, debida a la casualidad, es mayor a 0.50 (considerando el valor de 2.366, para 3 grados de libertad), por lo que se sostiene la hipótesis al no detectarse diferencias significativas entre las variedades evaluadas.

**Cuadro 9.** Análisis de  $\chi^2$  de la frecuencia de muestras positivas a virus en diferentes variedades en la localidad CEVY-INIFAP, ciclo 2007/2008.

POSITIVOS	O	E	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
Alpha	7	4.5	2.5	6.25	1.38
Fianna	4	4.5	-0.5	0.25	0.05
FL-867	4	4.5	-0.5	0.25	0.05
Satina	4	4.5	-1.5	2.25	0.50
				$\chi^2 =$	1.98

Asumiendo que no existen diferencias significativas entre variedades, se realizó otro análisis de ji cuadrada agrupando los resultados de todas las variedades evaluadas durante los ciclos 2006/2007 para compararlos con los datos agrupados de todas las variedades evaluadas durante 2007/2008 en el CEVY, para evaluar la diferencia en incidencia entre años, la cual es atribuible a factores ambientales (bióticos y abióticos). Los resultados de la prueba de ji cuadrada ( $\chi^2$ ) se muestran en el Cuadro 10.

**Cuadro 10.** Análisis de  $\chi^2$  de la frecuencia de muestras positivas a virus en la localidad CEVY-INIFAP, ciclo 2006/2007 y 2007/2008.

POSITIVOS	O	E	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
2006/2007	60	46.24	13.76	189.33	4.09
2007/2008	18	25.61	-7.61	57.91	2.26
				$\chi^2 =$	6.35

En él se observa que el valor obtenido de ji cuadrada, 6.35, nos indica que la probabilidad de obtener una desviación tan grande o mayor a la observada, debida a la casualidad, es menor a 0.05 (considerando el valor de 3.841, para 1 grados de libertad), por lo que se rechaza la hipótesis nula de que no hay diferencias entre años. Se sugiere considerar el estudio de factores ambientales (bióticos y abióticos) en estudios subsecuentes para cuantificar su influencia sobre la incidencia de cada virus en particular.

## CONCLUSIONES

1. Se identificaron virus fitopatógenos del cultivo de papa en el sur de Sonora, mediante la técnica de ELISA y RT-PCR.
2. Se identificaron los Virus Y de la Papa (PVY), Virus Y de la Papa variante Necrosis de la Nervadura del Tabaco (PVY<sup>N</sup>) y Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) en el cultivo de papa en el sur de Sonora.
3. Se confirma la presencia del Virus Y de la Papa variante Necrosis del Tubérculo de la Papa (PVY<sup>NTN</sup>), en el cultivo de papa en el sur de Sonora, considerado de importancia cuarentenaria para México.
4. Se encontró de un 92 a 100% de homología del virus PVY<sup>NTN</sup> del sur de Sonora con diferentes aislados de Europa y Norteamérica.
5. Se evidencia la importancia de utilizar material propagativo sano para disminuir la frecuencia de infección de enfermedades virales en papa en el sur de Sonora.
6. Con el presente trabajo se establecen las bases para la caracterización de virus fitopatógenos que afectan al cultivo de papa en el sur de Sonora.

## LITERATURA CITADA

1. Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. ELSEVIER ACADEMIC PRESS. San Diego, California, United States of America. 297-724p.
2. Altschul, S.F.; M.S. Boguski; W. Gish, and J.C. Wootton. 1994. Issues in searching molecular sequence databases. Nature Genetics. (6):119-129.
3. Ames de Icochea, T. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Primera edición. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 10-166p.
4. Barrera, C. 1997. Características generales de los virus y la importancia de las enfermedades que causan. En: Hidalgo, O.A. Producción de tubérculos-semilla de papa. Primera edición. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. Fascículo 3.1.
5. Berger, H.P. 1997. Biotechnology and resistance to potato viruses. En: Zehnder, W.G.; M.L. Powelson; R.K. Jansson, and K.V. Raman. Advances in Potato Pest Biology and Management. First edition. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U. S. A. 535-555p.
6. Borbón, J.T. y C.M. Armenta. 1996. El cultivo de papa en el sur de Sonora. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Centro de Investigación Regional del Noroeste (INIFAP-CIRNO). Publicación Técnica Núm. 1.
7. Cañedo, V. 1997. Áfidos vectores de virus importantes en la producción de tubérculos-semillas. En: Hidalgo, O.A. Producción de tubérculos-semilla de papa. Primera edición. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. Fascículo 3.8.



8. Cruz, F.M. y G.A. Frías. 1997. Guía Ilustrada de la prueba de Inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. SAGAR. 19pp.
9. Cruz, F.M.; S.H. Lozoya, y G.A. Frías. 2002. Potyvirus Y de la Papa variante Necrótica (PVY<sup>N</sup>) en tubérculo semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) canadiense. Revista Mexicana de Fitopatología. 20:206-209.
10. DGSV. 2004. Dirección General de Sanidad Vegetal. Memorias curso taller: "Detección de Patógenos de Importancia Cuarentenaria y Regulados en Papa". Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México, D.F.
11. Evans, K.; J.M. Trudgill, and J.M. Webster. 1993. Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. First edition. CAB INTERNATIONAL. Wallingford, UK. 87p.
12. FAO. 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estadística. Producción Agrícola. <http://www.fao.org/corp/statistics/es/>. 23 de enero del 2009.
13. Flores, O.A.; J.P. Martínez, y J.D. Martínez. 2000. Nuevas Tecnologías en la Detección y el Análisis Genético de fitopatógenos. Curso precongreso: Introducción a la Fitopatología Molecular. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Puerto Vallarta, Jalisco. 13.
14. Guerrero, C.E. 2005. Detección del Virus Y de la papa y de la variante NTN (PVY<sup>NTN</sup>) mediante Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en cargamentos internacionales de papa y plantaciones comerciales del estado de Nuevo León. Marín, N.L. Facultad de Agronomía. UANL. Tesis de licenciatura. 35pp.

15. Hernández, C.M.; J.F. Gómez; I.G. López; M.S. Dimas, y I.G. Andrade. 2007. Detección serológica y molecular del Virus PVY<sup>N</sup> y su variante PVY<sup>NTN</sup> en papa (*Solanum tuberosum* L.) y hospedantes alternos en Tapalpa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 25:167-172.
16. Hooker, W.J. 1986. Compendium of Potato Diseases. Third printing. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 125pp.
17. Hu, J.S.; H.P. Li; K. Barry; M. Wang, and R. Jordan. 1995. Comparison of dot-blot, ELISA and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. Plant Disease. 79:902-906.
18. Jeffries, C.J. 1998. Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. FAO/IPGRI. No. 19, Potato. 177pp.
19. Khurana, M.P. and I.D. Garg. 1998. Present Status of Controlling Mechanically and Non-persistently Aphid-transmitted Potato Viruses. En: Haidi, A.; R.K. Khetarpal, and H. Koganezawa. Plant Virus Disease Control. First edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 593-615p.
20. NAPPO. 2003. Norma Regional Sobre Medidas Fitosanitarias No. 3, Requisitos para la importación de papa hacia un país miembro de la NAPPO. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). Ottawa, Canada. 52pp.
21. Nie, X. and R.P. Singh. 2002. Probable geographical grouping of PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>NTN</sup> based on sequence variation in P1 and 5-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY<sup>NTN</sup>. Journal of Virological Methods. 103:145-156.
22. Prescott, M.L.; P.J. Harley, and A.D. Klein. 2004. Microbiología. Quinta Edición. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. 1240pp.

23. Ramírez, J.A. 1999. Virus de solanáceas y cucurbitáceas cultivadas en el Valle del Mayo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste (INIFAP-CIRNO). Folleto Técnico No. 4.
24. Ramírez, J.A. 2000. Maleza: factor determinante de virosis en solanáceas en el Valle del Mayo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste (INIFAP-CIRNO). Folleto Técnico No. 6.
25. Ramírez, V.R.; K. Aviña; G.A. Frías; R.L. Silva, and J.P. Martínez. 2009. Presence of necrotic strains of Potato virus Y in Mexican potatoes. *Virology Journal* 2009, 6:48.
26. Revers, F.; O. Le Gall; T. Candresse; M. Le Romancer, and J. Dunez. 1996. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*. 77:1953-1965.
27. SAGARPA. 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-012-FITO-1996. Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la papa. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. D.F.
28. SIAP. 2008. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>. 13 de Agosto de 2009.
29. Salazar, F.L. 1997. Virus detection and management in developing countries. En: Zehnder, W.G.; M.L. Powelson; R.K. Jansson, and K.V. Raman. *Advances in*

- Potato Pest Biology and Management. First edition. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U. S. A. 643-651p.
30. Slack, S.A. and R.P. Singh. 1998. Control of Viruses Affecting Potatoes Through Seed Potato Certification Programs. En: Haidi, A.; R.K. Khetarpal, and H. Koganezawa. Plant Virus Disease Control. First edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 249-260p.
  31. SOMEFI. 2006. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Curso de aprobación, renovación y capacitación para signatarios de laboratorios en diagnostico fitosanitario. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.
  32. Stevenson, R. W.; R. Loria; D.G. Franc, and P.D. Weingartner. 2004. Compendium of Potato Diseases. Second printing. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 106pp.