



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

**Tesina de Grado,
Licenciatura en Bioquímica**

**“COMPARACIÓN DE DOS
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO
VIROLÓGICO EN EL
PROGRAMA DE
CERTIFICACIÓN DE PAPA Y
VID”**

HÉCTOR LUIS OBERTI RIVAROLA

Orientadora: Dr. Vanessa Sosa

Co-Orientadora: Lic. Mariana Menoni

Laboratorio de Biología Molecular

Instituto Nacional de Semillas

Montevideo, Uruguay

2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a todas aquellas personas que están y estuvieron en esta etapa.

En primer lugar, agradecer a mi familia, apoyo incondicional para nunca bajar los brazos, sin ellos no podría haber realizado este sueño. Particularmente a mis padres que me vienen bancando desde hace 24 años.

A todos mis amigos, familia por elección.

A Mariana Menoni, fundamental para que esta tesis llegara a buen puerto, por brindarme siempre palabras positivas y permitirme aprender de su experiencia.

Al grupo del Laboratorio de Calidad de INASE, por el excelente clima de trabajo y hacer las horas de trabajo más amenas.

Vanessa Sosa, por darme esta oportunidad y abrirme las puertas de su laboratorio.

Finalmente, a INASE por el apoyo económico.

A todos, simplemente gracias.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	I
INDICE	II
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Virus.....	3
1.1.1 Definición.....	3
1.1.2 Transmisión en vegetales.....	4
1.2 Control y prevención de virus en cultivos.....	8
1.2.1 Control en Uruguay	11
1.3 Detección de virus en plantas.....	14
1.3.1 Identificación por síntomas.....	15
1.3.2 Técnicas serológicas.....	17
1.3.3 Hibridaciones sobre membrana.....	18
1.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
1.4 Virus que afectan la papa	21
1.4.1 PVY	21
1.5 Virus que afectan la vid.....	35
1.5.1 Virus GFLV	35
1.5.2 Virus GLRaV-3	51
2 OBJETIVOS	65
2.1 Objetivo general.....	65
2.2 Objetivos específicos	65
3 MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.1 Origen de las muestras analizadas.....	67
3.2 Muestreo.....	67
3.2.1 Papa.....	67

3.2.2 Vid	68
3.3 Métodos de diagnóstico.....	68
3.3.1 Prueba serológica DAS –ELISA	69
3.3.2 Pruebas Moleculares.....	71
3.3.3 Análisis estadístico Kappa.....	79
4 RESULTADOS Y DISCUSION	82
4.1 Análisis moleculares.....	82
4.1.1 Extracción de ARN	82
4.1.2 Detección basada en PCR	86
4.2 Determinación de Límite de Detección	100
4.3 Análisis Serológico	104
4.4 Comparación de ambos métodos mediante Test Kappa de Cohen 111	
4.5 Análisis de costos	115
5 CONCLUSIONES	117
6 PERSPECTIVAS	121
BIBLIOGRAFIA.....	126
ANEXO.....	146

RESUMEN

El diagnóstico y control de enfermedades es uno de los retos más importantes en los sistemas de producción de plantas cultivadas en el país, intentando con esto, evitar la propagación en futuros cultivos y aumentar así tanto cantidad como calidad del producto final. El Laboratorio de Calidad del Instituto Nacional de Semillas, como organismo regulador, realiza la detección de virus de importancia agronómica en los Programas de Certificación nacionales.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de tres virus en material de propagación vegetativo, uno en papa (PVY) y dos en vid (GFLV y GLRAV-3), mediante la técnica de RT-PCR, para luego comparar los resultados, costos y tiempo de realización con los de la técnica DAS-ELISA. A su vez se buscó determinar cuál es el mejor tejido del cual partir para la detección de PVY, GFLV y GLRAV-3 por RT-PCR, además de determinar cuál es la mejor época de muestreo en vid para la detección simultánea de los virus GLRAV-3 y GFLV.

Se probaron dos métodos de extracción de ARN (kit RNeasy Qiagen y método de Osmann y Rowhani), en diferentes tejidos de la papa (brotes, hojas, corteza) y vid (peciolo, hoja, floema), para

determinar cuáles son los más adecuados para el análisis por RT-PCR. Para cumplir con esto se ajustaron las condiciones de extracción de ARN y de RT-PCR para los virus mencionados. Ambos métodos de extracción empleados resultaron ser eficientes para la extracción de ARN en papa y únicamente el de Osmann y Rowhani en vid, siendo este el método de extracción recomendable en ambos cultivos por ser más económico. En el caso del virus PVY en papa se logró detectar el virus tanto en brote como en hoja. En cuanto a vid se detectaron los virus en todos los tejidos analizados y se pudo determinar que el mejor tejido para la detección conjunta de GFLV y GLRaV-3 por RT-PCR, es floema, y el periodo de muestreo puede realizarse tanto en diciembre como en abril.

Los resultados obtenidos pueden servir de base para la posterior utilización de la RT-PCR en el Programa de Certificación, por ser un método varios órdenes más sensibles que el DAS-ELISA, evitando así falsos negativos.

Palabras Clave: DAS-ELISA; RT-PCR; PVY; GFLV; GLRAV-3; papa; vid.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 VIRUS

1.1.1 DEFINICIÓN

Los virus son partículas infectivas y se consideran parásitos intracelulares obligados, ya que dependen de la maquinaria celular de sus anfitriones para reproducirse, y no son activos fuera de sus anfitriones. Además, no crecen o se someten a división y carecen de información genética que codifique para la maquinaria necesaria para la generación de energía metabólica o para la síntesis de proteínas, por lo que dependen absolutamente de la célula hospedera para sobrevivir (Stange, 2006). Se componen generalmente por ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple (ssRNA) y positiva y solo en algunos casos por ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena simple o doble. Los virus normalmente están encapsulados en una capa proteica o lipoproteica y no forman estructuras celulares (Agrios, 2002). Todos los tipos de organismos vivos, incluyendo animales, plantas, hongos y bacterias, son hospederos de los virus, pero la mayoría de los virus infectan sólo un tipo de hospedero (Gergerich y Dolja., 2006). Los comienzos de la virología vegetal se remontan a finales del siglo XIX,

cuando el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck y el científico ruso Dmitrii Iwanowski investigaban la causa de una misteriosa enfermedad del tabaco (Scholthof 2001). Estos investigadores, en forma independiente, describieron un agente inusual que causaba la enfermedad del mosaico en tabaco. Lo que distinguía a este agente de otros agentes causales de enfermedades era su tamaño mucho menor al de otros microorganismos. Este agente, posteriormente denominado “virus del mosaico del tabaco” (*Tobacco mosaic virus*, TMV), fue el primer virus en ser descrito (Zaitlin, 1998). Desde entonces, un gran número de diversos virus han sido descritos en plantas, animales, hongos y bacterias. El número actual de virus conocidos es cerca de 4.000, de los cuales cerca de 1.000 son virus vegetales (Gergerich y Dolja., 2006).

1.1.2 TRANSMISIÓN EN VEGETALES

Los virus fitopatógenos pueden transmitirse de planta a planta mediante diversas formas como son la propagación vegetativa, transmisión mecánica, vectores, o por medio de semillas y polen (Agrios, 2002; Hull, 2002; Madigan et al., 2006).

La transmisión por propagación vegetativa, es la forma más importante de transmisión y diseminación de virus en cultivos como papa, frutilla, raíces, tubérculos tropicales, plátano, piña y árboles

frutales injertados. En los cultivos injertados, el virus pasa del portainjerto al injerto o viceversa, por lo que representa un mecanismo eficaz en plantas indicadoras y su utilización en programas de certificación. Esta estrategia se utiliza para verificar la presencia de virus en materiales que se pretenden usar como fuente de yemas para la propagación vegetativa. Es importante mencionar que la mayoría de los virus se transportan en forma sistémica en la planta (a través de los vasos conductores de la planta), lo que lleva a que los órganos vegetativos usados para la propagación se infecten fácilmente con virus (Arauz, 1998).

La transmisión mecánica es la manera por la cual los virus se diseminan mediante el roce directo entre plantas o por el contacto entre la savia de una planta enferma y la de una planta sana. No es la forma más común ni importante de transmisión. A través de la savia solo puede ocurrir entre dos plantas estrechamente espaciadas y con la ayuda del viento, que puede causar una severa fricción y una consecuente lesión de plantas adyacentes, ocasionando de este modo, el intercambio de sus respectivas savias. A nivel de campo e invernadero, la planta puede ser mecánicamente dañada y de este modo, la savia de la planta infectada puede adherirse a las manos, a la maquinaria o a las herramientas. En consecuencia, el virus puede ser rápidamente transmitido y diseminado. (Agrios, 2002).

La transmisión por vectores es la forma más común y eficiente de transmisión de virus en la naturaleza y se da por medio de organismos vectores. Un organismo se considera un vector si es capaz de transportar el virus internamente de una planta a otra y su transmisión resulta de la alimentación del organismo en la planta. Así el concepto excluye el contacto casual, en el cual el virus puede ser llevado externamente y transmitido en forma mecánica (Arauz, 1998). La transmisión por vectores es llevado a cabo por insectos de 7 de los 32 órdenes de la clase *Insecta*, siendo los del orden *Hemiptera*, con piezas bucales para chupar, los que tienen más éxito como vectores (Racchah, 2009).

Diferentes modos de transmisión del virus se han caracterizado dependiendo del tiempo de retención, los sitios de retención, y la internalización de viriones por vectores. Los virus no persistentes son retenidos por sus vectores durante menos de unas pocas horas, mientras que los virus semipersistentes son retenidos durante días, semanas o incluso años. Los virus persistentes, una vez adquiridos de plantas infectadas, se asocian con el vector durante el resto de su vida (Gray y Banerjee, 1999).

La transmisión de los virus puede dividirse también de acuerdo con el comportamiento del virus dentro del vector (Arauz, 1998). La transmisión exitosa de virus persistentes requiere una internalización de los virus ingeridos que se transportan activamente a través de varias membranas celulares. Así, se encuentran en la cavidad corporal de sus vectores, y son retenidos por estos luego de la muda. En última instancia, deben asociarse con el sistema salival del vector para ser transmitido a un nuevo hospedero. Los virus persistentes se denominan circulantes. Pueden dividirse adicionalmente en materiales de propagación (virus que se replican en sus vectores artrópodos además de sus hospedadores vegetales), y virus no propagativos (virus que se replican sólo en la planta hospedera, pero no en sus vectores) (Gray y Banerjee, 1999). Los virus no persistentes y semipersistentes por su parte, se retienen en las partes bucales de artrópodos o al revestimiento de la cutícula del aparato de alimentación de sus vectores de nematodos (Arauz, 1998). Los virus adquiridos se pierden en cada muda, ya que la cutícula, incluyendo el revestimiento de las partes bucales y el intestino anterior, se desprende durante la muda. Colectivamente, los virus no persistentes y semipersistentes se denominan no circulatorios porque no están internalizados por sus vectores (no entran en la cavidad corporal, ya que no cruzan las membranas celulares del vector) (Gray y Banerjee, 1999)

1.2 CONTROL Y PREVENCIÓN DE VIRUS EN CULTIVOS

En la práctica es imposible erradicar los virus de aquellas plantas infectadas, debido a que en la actualidad no existen agroquímicos que tengan un efecto terapéutico sin dañar a la planta, por lo que la lucha contra estos patógenos tiene un carácter esencialmente preventivo (Messiaen, 1995).

El manejo de una enfermedad viral es más difícil cuando el virus es transmitido por vectores; es por eso que el conocimiento del vector (dispersión temporal, patrón de migración y hábitos alimenticios, principalmente), del virus y de la planta hospedera, así como el efecto de las condiciones ambientales sobre la interacción de estos componentes, son esenciales para determinar las estrategias de control más apropiadas. Para combatir una enfermedad, la mayoría de las veces es necesario la combinación de medidas de control y prevención, que en conjunto, son referidas como manejo integrado (Rodríguez, 1992; Chellemi et al., 1994).

El principal método de manejo de enfermedades en los cultivos ha sido el control químico; sin embargo, los problemas de contaminación ambiental derivados de su uso han impactado negativamente en la biodiversidad de los agroecosistemas, además de generar riesgos de

seguridad y salud pública (Zavaleta, 1999), por lo que surge la necesidad de usar y aplicar métodos alternativos.

Dentro de los métodos preventivos, los de mayor importancia en los cultivos que se realiza propagación vegetativa, son las técnicas de diagnóstico para seleccionar material de propagación libre de virus, que garantice una adecuada conservación del mismo. La principal fuente de diseminación de las virosis es el material asintomático (Arias et al., 2003); así la dispersión de los virus se produce sobre todo por el injerto y la propagación vegetativa de material infectado. Todo ello conlleva al empleo de tests o análisis que garanticen la sanidad de dicho material. (Zdunic et al., 2012). Otra forma para mitigar daños y contaminación es eliminar plantas enfermas con síntomas durante las primeras etapas del cultivo, reduciendo así los riesgos de infecciones secundarias dentro del campo.

El monitoreo de áfidos mediante trampas es importante para saber cuándo empieza la migración y establecimiento de estos vectores y poder iniciar su control. En ciertos casos también es útil el uso de barreras vegetales, especialmente cuando las poblaciones de áfidos son bajas (Ferrerres, 2000). A escala regional se deben adoptar medidas fitosanitarias para evitar que se dejen abandonados cultivos aledaños, en los cuales los áfidos se pueden multiplicar en forma indiscriminada.

La utilización de nuevas tecnologías para el control de virus ha sido muy útil, por ejemplo, la utilización de plántulas propagadas *in vitro* libres de patógenos o el uso de variedades resistentes (Rodríguez, 2003). Los organismos genéticamente modificados (OGM) son otra forma de controlar y mitigar la incidencia, aunque no en todos los cultivos se ha logrado una resistencia para sus principales virus.

Particularmente, para el virus GLRaV-3 que infecta la vid no se ha encontrado variedades resistentes ni se ha logrado crear variedades resistentes (Pietersen 2004), aunque hoy en día se utiliza pie americano en los injertos que es tolerante al virus y lo mantiene latente (Oliver y Fuchs, 2011). En cuanto al virus GFLV, que también infecta la vid, se encuentra resistencia varietal, utilizándose la vid *Muscadinia rotundifolia* para cruzamientos confiriendo, resistencia a transmisión y alimentación de nematodos. A su vez, se ha descubierto un plásmido vector llamado "*GFLV silencing construct*" que confiere resistencia y saneamiento al virus a las células vegetales transformadas con dicho plásmido vector (Valat et al.; 2006).

En papa se conocen genes que le confieren resistencia al virus PVY, presentes en ciertas variedades de papas como *Solanum tuberosum* sp andigena (Galvez, et al. 1990) y en cultivares S.

tuberosum sp *tuberosum* derivados de *Solanum stoloniferum* (Ross; 1952). En Argentina se encuentra en fase de evaluación de siembra una variedad de papa genéticamente modificada con resistencia al virus.

A su vez, los programas de certificación juegan un papel esencial en la prevención, ya que se intenta limitar la introducción y distribución de material de propagación infectado en un país o región. Es mediante estos programas que se permite poner a disposición de los sectores productivos materiales que cumplan con estándares de calidad genéticos y sanitarios establecidos, permitiendo alcanzar niveles de productividad y adecuación a las exigencias de los mercados que garanticen su competitividad y sostenibilidad.

1.2.1 CONTROL EN URUGUAY

En Uruguay, la Ley 16.811 de febrero de 1997 establece que INASE (Instituto Nacional de Semillas) es el encargado de proponer el dictado de normas sobre producción, certificación, comercialización, exportación e importación de semillas así como sobre la protección de las creaciones y los descubrimientos fitogenéticos. Además, aclara que las semillas que se produzcan, comercialicen o se transporten dentro del país serán caracterizadas como certificadas o comerciales. Las mismas se definirán y se ajustarán en cuanto a su producción,

comercialización y normas de calidad de acuerdo a la reglamentación que dicte el Poder Ejecutivo. Sólo se pueden comercializar lotes de semillas producidos en el país que previamente hayan sido analizados por laboratorios habilitados u oficiales de análisis de semillas y cuyos resultados de análisis demuestren que cumplen con los estándares de calidad vigentes.

El Decreto 438/004 de diciembre de 2004 establece que el Estándar Específico: es un documento propuesto por la Junta Directiva del Instituto Nacional de Semillas, aprobado explícita o tácitamente por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) en el que se establecen las características y requisitos que deben cumplir las semillas y/o los procesos asociados a su producción, comercialización, etc. en relación con lo establecido en la ley N° 16.811 y sus modificaciones, en el presente decreto y demás normas reglamentarias y en los compromisos internacionales y regionales suscritos por el país en la materia.

Existen Estándares Específicos para diversas especies cultivadas en el país, entre ellas vid y papa. El Estándar Específico de material de propagación de papa se aplica para la producción de todo lote de semilla de la especie *Solanum tuberosum* y entró en vigencia en el año 2010. Mientras que el de vid se aplica para la producción de yemas,

estacas, barbados y plantas del género *Vitis* y entró en vigencia en el año 2006.

En los Estándares se especifican diferentes tipos de Bloques de Producción (conjunto de parcelas instaladas con materiales de una misma clase y categoría) considerados en el Esquema de Producción, en los que cada uno debe cumplir los requisitos establecidos en cuanto a condición fitosanitaria, identidad genética y otros aspectos de calidad del material de propagación.

La sección de Análisis Viroológico del Laboratorio de calidad de INASE analiza la calidad sanitaria de los materiales de propagación vegetativa, apoyando de esta manera al programa de certificación. Una vez que el Laboratorio reporta el porcentaje de los distintos virus detectados, los técnicos de Certificación verifican en el Estándar de Producción y Comercialización que los resultados se encuentren dentro de los niveles de tolerancia establecidos. Dependiendo del estado sanitario del material, éste podrá ser recategorizado o podrá perder la calidad como semilla y destinarse a consumo.

Actualmente en INASE se realizan aproximadamente 3000 análisis de vid al año y unos 5000 de papa. Según datos obtenidos de las bases de datos de INASE, la prevalencia del GLRaV-3 y GFLV

entre los años 2012 y 2015 fue de 2,06 y 0,36 en el Banco de Yemas (11662 muestras analizadas) y 2,05 y 0,12 en Plantas Prontas (1662 muestras analizadas). En papa de las 46325 muestras analizadas entre 2012 y 2015 hubo una prevalencia del virus PVY de 0,3.

. En cuanto a la incidencia de los virus por fuera del programa se cuenta únicamente con datos de 1983 en un estudio realizado por Crisci y Vilaro en donde se estimó que en primavera se llegó hasta un 80% de infección con el virus PVY en papa, fundamentalmente asociado a la variedad Red Pontiac.

1.3 DETECCIÓN DE VIRUS EN PLANTAS

Las técnicas de detección de virus y patógenos subvirales (como viriones y virus satélites) en plantas son muy importantes por diversos motivos (Chu et al., 1989 b; Húlí y Al-Hakim, 1988): para realizar estudios epidemiológicos, para la evaluación de resistencia en plantas de programas de mejoramiento genético, para comprobar el estado sanitario de las semillas y material vegetal en estaciones de cuarentena y certificación, para la identificación y diagnóstico de nuevos patógenos (Hamilton et al., 1981; Matthews, 1991). Por tal razón, es necesario establecer técnicas de diagnóstico altamente eficientes, rápidas y económicas para el estudio de la epidemiología de la enfermedad viral,

evaluar la eficiencia de los métodos de manejo o para garantizar que las plantas y las semillas están libres de virus (Astier et al., 2007).

Tradicionalmente, el diagnóstico de las enfermedades de plantas se ha llevado a cabo por el reconocimiento de síntomas característicos presentados por plantas enfermas y sobre determinadas plantas hospederas tras inoculación mecánica, injerto o a través de vectores del patógeno. Aunque no son métodos muy precisos, se utilizan por ser un método que da una información importante (sobre todo en frutales) e incluso crucial en algunos casos, como en el estudio de patotipos (Hamilton et al., 1981; Matthews, 1991). Se utilizan microscopios electrónicos de barrido y de transmisión para visualizar partículas víricas (Collier et al., 1998), aunque no se utiliza de forma rutinaria, es indispensable para los estudios estructurales, especialmente con la ayuda de la inmunoelectromicroscopía (Milne, 1984). Actualmente entre los métodos más utilizados están los que detectan las proteínas virales (técnicas serológicas) y los que detectan los ácidos nucleicos virales (hibridación con sondas de ADNc o ARNc, y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR) (Lava Kumar, 2009).

1.3.1 IDENTIFICACIÓN POR SÍNTOMAS

Cuando los virus infectan las plantas, pueden o no inducir síntomas. Si los síntomas son producidos en las plantas infectadas,

éstos pueden tener un valor en el diagnóstico (Salazar, 1995). Los síntomas asociados a enfermedades virales incluyen principalmente cambios en la pigmentación normal de las plantas (mosaicos, amarillamientos, grabados), cambios en el crecimiento (enanismos), necrosis de tejidos, deformaciones y reducción en el rendimiento. Las observaciones de la planta en su conjunto y el contexto en que ocurren dichos cambios y su análisis, constituyen los primeros pasos para el diagnóstico de virus (Astier et al., 2007). Algunos géneros vegetales, tales como *Nicotiana* (tabaco) y *Chenopodium* (quinoa) son hospedantes de un gran número de virus. Debido a que estas plantas tienen respuestas consistentes y distintivas a las infecciones virales en condiciones de invernáculo, es común usarlas como plantas indicadoras (Walkey 1991). La sintomatología es la fuente primaria en la descripción de las enfermedades virales. El nombre del virus es principalmente tomado sobre la base del síntoma que causa en la planta en la cual fue identificado por primera vez (Astier et al., 2007). Sin embargo la identificación de virus fitopatógenos por sintomatología no siempre es confiable, debido a que los síntomas se pueden confundir con desórdenes nutricionales (Méndez-Lozano et al., 2002).

A nivel celular también se pueden determinar síntomas, siendo en algunos casos útiles para identificar un género taxonómico particular (ej: *Potyvirus*, *Carlavirus*, *Comovirus*, *Tobamovirus*). Esta técnica, sin

embargo, requiere cierto nivel de experiencia aunque no requiere de equipos sofisticados. El tipo de tinción empleado para diferenciar los síntomas también es determinante en la identificación del grupo viral (Gil Ramirez, 2010)

1.3.2 TÉCNICAS SEROLÓGICAS.

El ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es tradicionalmente el método utilizado para la detección e identificación rutinaria de virus vegetales en diferentes hospederos, por ser fiable, relativamente rápido, sensible, y fácilmente aplicable a gran número de muestras (Clark y Bar-Joseph, 1984; Torrance y Janes, 1981, Cambra et al, 2011). Hay muchas variantes de la técnica de ELISA, pero los más comunes son: ELISA-DAS (Double Antibody Sandwich – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Clark y Adama, 1977), ELISA indirecto (Rybicki y von Wechmar, 1981; Koenig, 1981), ELISA indirecto TAS (triple antibody sandwich) (Bar Joseph y Malkinson, 1980; van Regenmortel y Burckard, 1980; Barbara y Clark, 1982) y ELISA directo (Roit et al. 2003).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales ha supuesto un gran avance en la fiabilidad, especificidad y facilidad de interpretación de los resultados de las técnicas serológicas.

En la interpretación de resultados con el ensayo ELISA es muy importante determinar qué se considera como respuesta positiva y que como respuesta negativa, lo que se puede abordar de varias maneras. En algunos casos se considera un resultado positivo cuando se obtiene una absorbancia dos o tres veces la media de las absorbancias obtenidas con las muestras negativas, otras cuando se obtiene la media más 2 o 3 veces la desviación estándar si hay disponible un número elevado de referencias, o incluso otras arbitrariamente cuando presenta una absorbancia determinada (Tijssen, 1985) La selección de este criterio es importante para minimizar las respuestas falsas. Este valor puede moverse hacia arriba o hacia abajo para incurrir más en el error tipo I (falsos positivos) o tipo II (falsos negativos), dependiendo en qué ajuste tenga consecuencias menos graves.

EL ELISA-DAS es muy sensible, pero necesita la preparación de un conjugado para cada virus a evaluar. Esta técnica indirecta consiste en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno seguida de la adición de los antígenos, los cuales reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa. Para formar el sándwich se agregan nuevamente anticuerpos ligados con enzimas que se adhieren a los antígenos capturados en la placa (Cruz y Frías, 1997).

1.3.3 HIBRIDACIONES SOBRE MEMBRANA.

Esta técnica molecular se basa en la capacidad de apareamiento específico entre dos cadenas sencillas de ARN, ADN o ARN – ADN que tengan secuencias complementarias formando una estructura de doble cadena más estable. La síntesis de una molécula de ADN o ARN monocatenario complementaria al genoma del virus (sonda) marcada con isótopos radioactivos (como el ^{32}P) o con marcajes no-radioactivos (como la digoxigenina o fluoróforos) y su posterior hibridación con ácidos nucleicos (*dot-blot*) de la planta, fijados en un soporte sólido (generalmente una membrana) permite detectar la presencia del virus (Dietzgen et al. 1994, Galipienso et al. 2004, Harper y Creamer. 1995, Liu et al. 2007, Más et al., 1993). Una modalidad consiste en fijar improntas de cortes transversales de tejido vegetal, que evitan el procesamiento de las muestras y suponen un ahorro de tiempo y dinero (Narváez et al., 2000, Rubio et al., 2003).

El uso de la técnica de hibridación molecular no se ha extendido mucho, debido principalmente a ser más laboriosa que el análisis de ELISA, aunque necesita menos muestra que esta (100 μl contra 1-10 μl) (Chu et al., 1989) y puede detectar satélites y tiroides que carecen de proteínas estructurales.

1.3.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, mediante el cual se puede replicar específicamente un segmento determinado de ADN a través de dos oligonucleótidos cebadores que flanquean este fragmento, y ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del ADN, anillado de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de los cebadores anillados mediante una ADN polimerasa termoestable. Dado que los productos de extensión son a su vez complementarios a los cebadores, en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN sintetizada en el ciclo anterior, de forma que hay una amplificación exponencial del fragmento (Innis et al., 1990). La tecnología de la PCR ya ha sido aplicada al estudio y la detección de virus ADN de plantas (Rybicki y Hughes, 1990). Sin embargo, la mayoría de los virus y patógenos subvirales tienen un genoma ARN (Matthews, 1991), y para su detección se han aplicado varios métodos que combinan la transcripción inversa y la PCR (RT-PCR) (Kawasaki, 1990).

Para evitar las extracciones de los ácidos nucleicos Wetzell et al. (1991) y Borja y Ponz (1992) llevaron a cabo la RT-PCR directamente del macerado vegetal de plantas. La alta sensibilidad (normalmente varios órdenes de magnitud mayores que la técnica ELISA) de esta técnica le da una ventaja sobre todo en el diagnóstico de patógenos que se presentan en bajas concentraciones, como puede ser en la

certificación de semillas, detección de virus y viroides en plantas leñosas, virus limitados al floema que se encuentran en bajo título en las plantas, etc. (Chu et al., 1989).

Otro ejemplo de técnica molecular que además combina pasos de las serológicas es la de PCR-Inmunocaptura (IC-PCR). Ésta metodología combina el reconocimiento del virus con el uso de anticuerpos específicos y la amplificación por PCR. La reacción antígeno- anticuerpo, constituye la primera fase, en la cual se reducen el riesgo de contaminación con inhibidores presentes en el tejido de la planta, al obtenerse el virus fijado a las placas de poliestireno. Luego, en condiciones alcalinas y en presencia de un detergente se libera el ARN o ADN viral para ser amplificado posteriormente mediante RT-PCR o PCR convencional (Webseter et al., 2004; Shcherbakova, 2007).

1.4 VIRUS QUE AFECTAN LA PAPA

1.4.1 PVY

1.4.1.1 TAXONOMÍA

El *Potato virus Y* (PVY) forma parte del género *Potyvirus*, perteneciente a la mayor familia taxonómica de virus conocidos para

plantas, con unas 170 especies formalmente reconocidos por el ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2010), llamada *Potyviridae*. Se clasifican como virus de tipo IV en el marco del sistema de clasificación de Baltimore. El virión no está envuelto y es filamentoso. Su genoma es de ARN lineal de sentido positivo (ssARN) y su tamaño ronda los 9000-12000nt. Se replica en el citoplasma de la célula hospedera. Las partículas virales tienen una longitud de 680 a 900 nm y están rodeadas con múltiples copias de una sola proteína de 30-47 kDa. El ARN genómico de los *Potyvirus* funciona como un ARN mensajero. (Smith et al. 1988, Burrows et al. 2005).

Los Potyvirus se caracterizan por ser virus transmitidos por pulgones y poseen una característica general compartida con todos los de su familia de formar inclusiones cilíndricas en forma de aspas de molino (del inglés “*pinwheels*”) en el citoplasma de las células infectadas (Rubio-Huertos y López-Abella, 1966). La morfología de estas inclusiones, variable según los virus, constituye uno de los criterios taxonómicos empleados para su clasificación (Shukla et al., 1989; Ward y Shukla, 1991).

1.4.1.2 DESCRIPCIÓN

1.4.1.2.1 ESTRUCTURA VIRAL

La morfología del virus consiste en una cápside no envuelta, elongada con simetría helicoidal monopartita y flexuosa, una longitud de 684 nm a 730 nm, diámetro de 11 nm y un canal axial de 2-3 nm (Ogawa et al., 2008). La proteína de la cápside (CP) es el principal componente del virión con aproximadamente 2000 unidades monoméricas (Urcuqui-Inchima et al., 2001). El contenido de proteína en la partícula es de aproximadamente 94%. Sólo dos proteínas, VPg y proteína de cubierta (CP), se detectan en las partículas virales. Ni lípidos u otros componentes se han detectado en las partículas (**Figura 1.1**)

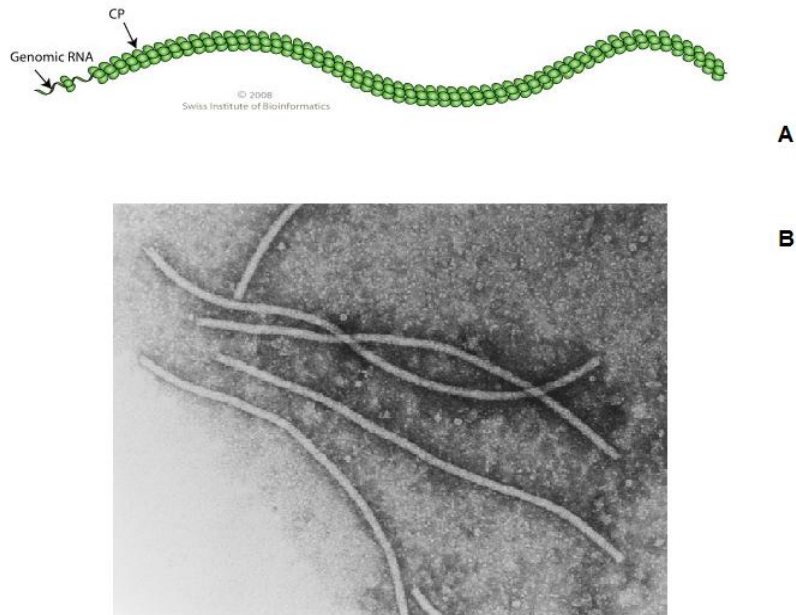


Figura 1.1. A. Esquema del virus PVY, con su forma filamentosa, y su ARN rodeado por su proteína CP en forma helicoidal simétrica (Extraída y modificada de http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/50.html) B. Micrografía Electrónica del Virus PVY (ICTV, 2004).

1.4.1.2.2 GENOMA VIRAL

El genoma del virus PVY consta de aproximadamente 9.7 kb y contiene un único ORF (*Open Reading Frame*, por sus siglas en inglés) que se traduce en una poliproteína de aproximadamente 350 kDa, flanqueado por regiones no codificantes (Riechmann et al., 1992) El procesamiento de esta poliproteína da lugar a nueve productos proteicos, que nombrados a partir del extremo amino terminal, son: P1

de 28 a 34 kDa, con actividad proteasa, Factor de transmisión (HC-Pro) de 48 a 58 kDa de peso aparente (proteína multifuncional) (Maia et al., 1996), P3, de 37 a 42 kDa, Proteína de las inclusiones cilíndricas (CI), de 70 kDa (responsable de la formación de las inclusiones citoplasmáticas), 6k2, (capacidad de anclaje a membranas) Proteína "a" de las inclusiones nucleares (NIa), de 49 a 52 kDa (forma inclusiones nucleares) (Restrepo, 1990) Proteína "b" de las inclusiones nucleares (NIb) de 56-58 kDa (forman parte de las inclusiones nucleares y es la ARN polimerasa dependiente de ARN, responsable de la replicación viral (Domier et al., 1987; Martín y García, 1991; Hong y Hunt, 1996), Proteína de la cápside (CP), de 30 a 37 kDa, que está encargada principalmente de encapsidar el ARN viral.

El procesamiento de la poliproteína como en todos los *Potyvirus* implica tres proteinasas: NIa, HC y P3. La síntesis de ARN se cree que ocurre en el citoplasma y todo el genoma es copiado. El complejo de replicación comprende las proteínas NIb, IC y VPg y posiblemente implica las proteínas 6K1 y 6K2. La proteína NIb se cree que es la ARN polimerasa dependiente de ARN, ya que contiene el motivo de secuencia consenso (GDD) que se encuentra en ARN polimerasas dependientes de ARN virales (Robaglia et al., 1989). Además como en todos los *Potyvirus*, dos proteínas (HC y CP), son necesarios para la transmisión por áfidos del PVY. Dentro de las regiones que determinan la variabilidad del virus o mejor, del complejo

viral, se ha determinado que las regiones 5´NTR (Región no traducible del 5´) y de la proteína P1, corresponden a las secuencias más variables en el género *Potyvirus*, siendo responsable hasta de un 28% de la variabilidad total existente entre los grupos O y N (Marie-Jeanne-Tordo et al., 1995; Ward et al., 1995). Por otra parte, las regiones NIb y 3´-NTR, constituyen puntos de variación y recombinación, y pueden servir para diferenciar las razas o patotipos del virus a partir del estudio de sus secuencias (Kogovsek et al., 2008).

Existen varias cepas del virus PVY, que se han clasificado en cuatro variantes o grupos basados en sus características serológicas y síntomas producidos en la papa, el tabaco y en *Physalis floridana* (Sutic et al., 1999), y que además tienen diferencias en su genoma. Existe: PVY⁰ (raza común); PVY^N (raza necrótica) y PVY^C (raza que causa estriados puntiformes) (Singh et al., 2008). Esta última raza, se divide a su vez en dos genotipos principales denominados PVY^{C1} y PVY^{C2} (Blanco-Urgoiti et al., 1998). Posteriormente, se identificó la raza PVY^Z por sus diferencias en patogenicidad sobre un grupo de plantas diferenciales de papa (Singh et al., 2008).

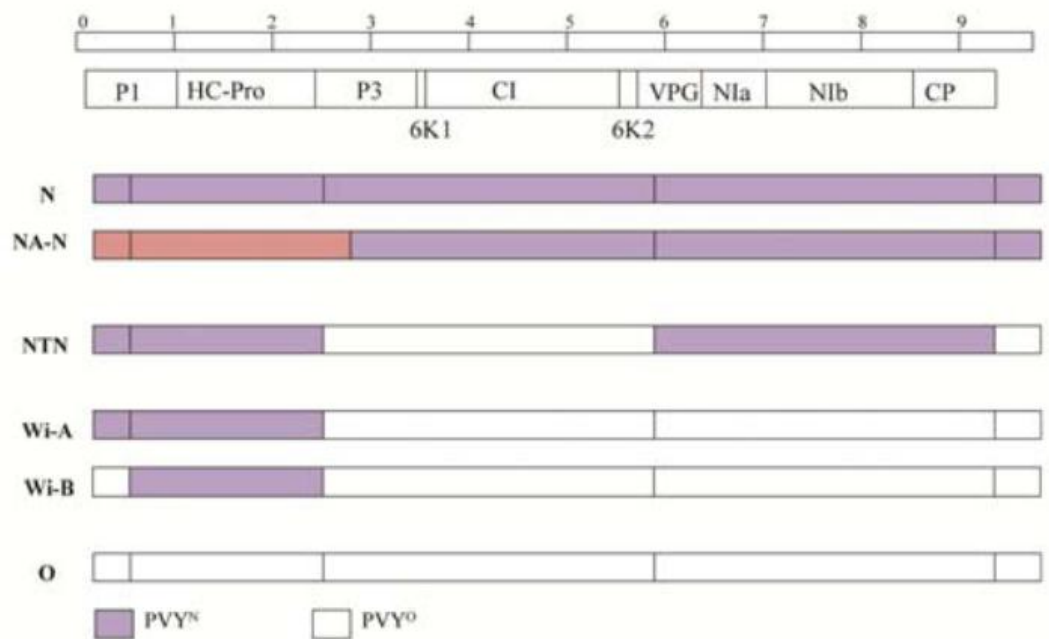


Figura 1.2 Organización del genoma de PVY y sus recombinantes más comunes. N es la cepa Necrótica, O es la cepa común, las cuales son considerados los genotipos parentales de las cepas NTN, NA-N (forma Necrótica de Norteamérica), N-Wi A y B. (Gray et al., 2010)

La secuencia completa del genoma es conocida para varias cepas de los grupos PVY^O y PVY^N y presentan una diferencia del 8% en homología de secuencia de todo el genoma de 9.7Kb. Las infecciones mixtas de las cepas comunes y las cepas necróticas son frecuentes, permitiendo que los genomas puedan mezclarse, produciendo cepas híbridas (es decir, PVY^{N:O} y PVY^{NTN}) con segmentos de PVY^O y secuencias PVY^N empalmados en sus genomas (**Figura 1.2**). Los tres recombinantes mejor estudiados son: PVY^{NTN}, que contiene de tres a

cuatro uniones recombinantes, PVY^{N:O} y PVY^{N-Wi}, que tienen una o dos uniones recombinantes, respectivamente (Glais et al., 2002; Nie et al. 2004, Singh et al. 2008).

1.4.1.3 CITOPATOLOGÍA

La citopatología de este virus se caracteriza por Inclusiones citoplasmáticas en forma de molinillos (“Pinwheels”) en el tejido infectado sistémicamente (Edwardson, 1966). Se componen de placas en forma de ruedas, que son fáciles de ver en los preparativos de la hoja por inmersión y tienen estrías característicos con una separación de c. 5 nm.

1.4.1.4 HOSPEDEROS

El virus PVY Infecta al menos 60 variedades de plantas. Sobre todo de la familia *Solanaceae*, como tomate, tabaco, chile y berenjena y papa (Rosner et al., 2000; Romero et al., 2001; Echer-Costa, 2002; Thornberry, 1966), aunque también infecta a miembros de la subfamilia *Chenopodiaceae* y la familia *Leguminosae* (Thornberry, 1966). Las especies de plantas de diagnóstico para este virus son *Capsicum frutescens* cv, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* y *Solanum tuberosum* cv. (Benson y Hooker, 1960). *N. glutinosa* se puede utilizar como especie de propagación para

mantener el virus y *N. tabacum* cv. *Wisconsin Habana 425* es una buena fuente para la purificación de virus. Como especies de ensayo se puede utilizar *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, varias especies de *Lycium*, *Physalodes Nicandra*, *repanda Nicotiana*, *N. rustica*, *Physalis floridana*, *Solanum demissum 'Y'*.

1.4.1.5 SINTOMATOLOGÍA

La reducción en la producción de variedades sensibles a enfermedades virales puede ser de más del 50% (Spaar y Hamann, 1977), sin embargo, la mayoría de las variedades modernas tienen buenos niveles de resistencia y se siguen incorporando genes que otorgan una resistencia extrema (Mendoza et al., 1989; Dalla Rizza et al., 2006). Los síntomas en papa varían dependiendo de la variante del virus, la variedad de papa cultivada y la temperatura del ambiente (Nolte et al., 2004). Además, las interacciones con otros virus, originan desde clorosis muy suaves hasta necrosis severas y muerte de la planta afectada, daños en el tubérculo así como también mosaicos, moteados y manchas anulares. A temperaturas bajas los síntomas en papa tienden a enmascarse pero en todos los casos hay una disminución del crecimiento. Los síntomas son más uniformes y claros

en toda la planta de papa cuando ésta proviene de tubérculos-semilla infectados. (Stevenson et al., 2001; Jones et al., 2003)

En papa las infecciones primarias de PVY⁰ no causan síntomas de importancia, sobre todo si la transmisión por pulgones es tardía. Las infecciones secundarias de PVY⁰ dan lugar a plantas más pequeñas de lo normal, hojas rugosas, con mosaicos, moteadas y acartonadas y a veces necrosis en el follaje y tallos (Smith et al., 1992). El mosaico en las hojas puede ser enmascarado cuando se produce a altas temperaturas o cuando el abonado nitrogenado ha sido muy fuerte, pero la enfermedad se puede identificar por la rugosidad de la superficie y bordes de las hojas (Sutic et al., 1999).

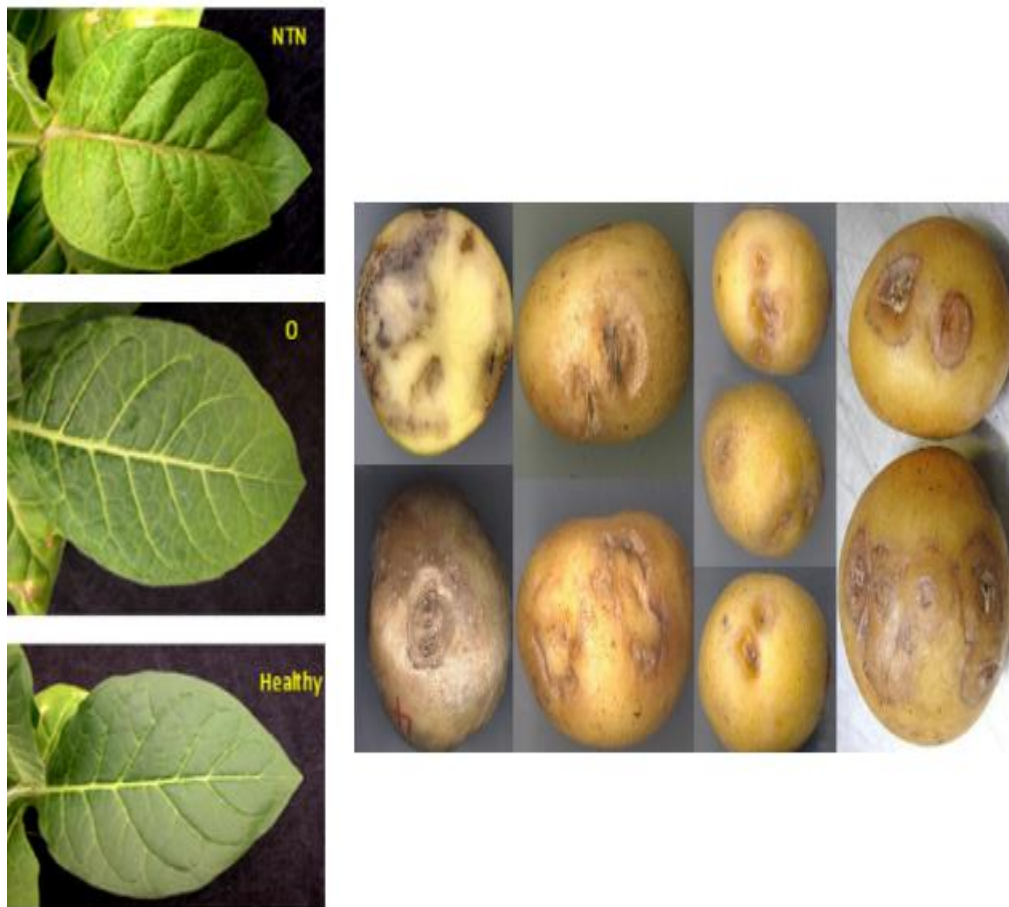


Figura 1.3. Principales síntomas causados por distintas cepas de PVY en hojas y tubérculo de papa (Hu et al. 2008).

Los nervios del envés de las hojas más bajas de la planta afectada suelen presentar zonas necróticas que parecen líneas negras. En general, las plantas afectadas se observan como atrofiadas y mueren prematuramente. En los tubérculos, el único síntoma es la

reducción de su tamaño debido a los daños sufridos por la vegetación (Sutic et al., 1999).

Muchas de las variedades cultivadas poseen el gen *nytr*, que confiere hipersensibilidad a la cepa PVY⁰ (Kennebec, Désirée). En este caso, la necrosis de las venas en infección primaria (transmisión por pulgón) evoluciona a un fuerte mosaico rugoso con manchas necróticas en las hojas nuevas. Aparecen estrías necróticas a lo largo del tallo y las hojas bajas y medias se marchitan y caen, quedando sólo un penacho en el ápice (“palmeado”) y la planta muere prematuramente. En infección secundaria (planta procedente del tubérculo infectado) presenta mosaico necrótico y estriado desde que nace, muriendo la planta en pocas semanas (Legorburu, 2000).

En la variante PVY^N, la transmisión por pulgón produce necrosis de las venas visibles en el envés de las hojas de papa ya formadas, que evoluciona a un mosaico rugoso en las hojas nuevas. La planta procedente del tubérculo infectado presenta un porte menor del normal, con mosaico rugoso y acortamiento del ciclo vegetativo. La gravedad del mosaico rugoso es variable, presentando sólo rugosidad con temperaturas altas. Puede ser prácticamente asintomático en variedades tolerantes como la Baraka (SEF, 2015)

PVY^{N-W} y PVY^{NTN}, son cepas diferentes de las cepas parentales, serológicamente concuerdan con PVY^O, sin embargo, inducen síntomas de necrosis venal sistémica como PVY^N en plantas de tabaco. PVY^{NTN} además de los síntomas típicos de PVY sobre la vegetación, es la única cepa que produce síntomas en tubérculo de papa (Smith et al., 1988; Blanchard et al., 2008). Al inicio de la infección se presenta con anillos circulares de color marrón que sobresalen sobre la piel; posteriormente estas zonas se deprimen (al morir las células que las forman) y a medida que van muriendo células hacia el interior del tubérculo, se va acentuando la depresión y el tejido muerto va tomando apariencia corchosa, llegando a producirse grietas al romperse la piel (Alonso, 2002).

Los aislados PVY^{N-W} inducen mosaico leve en las hojas de papa (Blanchard et al., 2008).

Las cepas PVY^C causan en papa, como síntomas primarios y secundarios, moteado, arrugado y bandeado necrótico de las venas. También puede aparecer necrosis en los tubérculos.

Los síntomas por sí solos no pueden distinguir estas cepas de virus, ya que los síntomas varían con la edad, momento de la infección, la temperatura y la genética tanto del virus y como del huésped de la

planta. Cepas PVY pueden interactuar con otros virus de la papa como el virus de la patata X (PVX) y el virus de la Papa A (PVA) para dar lugar a pérdidas más importantes. Algunas variedades de papa o tabaco rara vez muestran síntomas, pero pueden portar el virus y servir como reservorio para la transmisión por áfidos (Burrows et al., 2005).

1.4.1.6 TRANSMISIÓN

El PVY es transmitido por al menos 100 especies de áfidos, siendo *Myzus persicae* la más eficiente (Verbeek et al., 2010). También es transmitido por medios mecánicos y por tubérculos infectados, principal mecanismo de propagación agrícola de la papa (Karasev y Gray, 2013).

La transmisión de PVY y de otros *Potyvirus*, como el PVA, se realiza con ayuda de un coadyudante presente en la savia de la planta infectada (Thornbury y Pirone, 1983). Los áfidos transmiten el virus de forma no persistente, siendo esta, aquella que se ve favorecida por tiempos de adquisición cortos y ayuno previo. El vector retiene los virus en forma infectiva por períodos breves, de minutos a horas. El virus puede adquirirse en períodos de alimentación tan cortos como 14 a 20 segundos e inocularlo posteriormente en un lapso de tiempo similar. Normalmente los áfidos pierden el virus durante el período de

inoculación, permaneciendo infectivos entre 1 minuto y 1 hora (Spaar y Hamann, 1977; Martínez-García et al., 2001), por lo que necesitan adquirirlo nuevamente para poderlo transmitir a otra planta. En ausencia de alimentación, el virus puede permanecer infectivo hasta 14 horas en las partes bucales del insecto. Los áfidos alados son de particular importancia debido a que son fácilmente transportados por el viento, realizando largas migraciones. Los áfidos provenientes de cultivos infectados o de hospedantes secundarios (cultivos alternos o maleza), pueden llevar el virus a cultivos aledaños. Una vez que el follaje de la planta se inocula por áfidos, el virus se transloca a los tubérculos; siendo variable la eficiencia de esta translocación entre cultivares (Raboudi et al., 2002; Musa et al., 2004).

PVY también puede transmitirse mecánicamente (también llamada transmisión sap) por maquinaria, herramientas y plantas enfermas mientras se trasladan por el campo (Fageria et al, 2015), aunque el mayor vector sin dudas son los áfidos.

1.5 VIRUS QUE AFECTAN LA VID

1.5.1 VIRUS GFLV

1.5.1.1 TAXONOMÍA

El Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) es formalmente clasificado en la familia *Nepovirus* (Harrison et al., 1971). Los *Nepovirus* se clasifican como virus de tipo IV en el marco del sistema de clasificación de Baltimore.

Se transmiten por nematodos de distintos géneros. Sus genomas están formados por dos moléculas de ARN (ARN1 y ARN2) de una cadena de polaridad positiva, que encapsidan en partículas isométricas de alrededor de 28 nm de diámetro y formadas por 60 copias de una única proteína (Harrison y Murant, 1977; Brunt *et al.*, 1996).

Por pertenecer al supergrupo Picorna, los *Nepovirus* comparten algunos mecanismos comunes de expresión del genoma como la traducción monocistrónica, y presentan los ARN genómicos unidos covalentemente a una proteína VPg (proteína viral, unida al genoma) en su extremo 5' (Pinick et al., 1988) y una cola poliadenilada en su extremo 3' (Mayo et al., 1979). Su expresión tiene lugar por medio de la síntesis de poliproteínas que se procesan proteolíticamente por proteasas codificadas por el virus (García-Arenal y García, 1996).

ARN1 contiene regiones de codificación para las proteínas 1A, 1BHel (helicasa), 1CVPg, 1DPro (proteínasa) y 1ERdRp (ARN-polimerasa dependiente de ARN). El ARN2 contiene regiones que

codifican la 2AHP (proteína *homing*), 2BMP (proteína de movimiento) y 2CCP (proteína de cubierta)

1.5.1.2 DESCRIPCIÓN

1.5.1.2.1 ESTRUCTURA VIRAL

El virus de GFLV está compuesto por partículas isométricas de silueta angular de aproximadamente 30 nm de diámetro (Martelli et al., 2003) (**Figura 1.4**).

Además de los 2 fragmentos de ARN (ARN1 y 2) puede haber un tercer tipo de ARN, un ARN satélite (ARN3) de pequeño tamaño (1150 nucleótidos) que encapsida conjuntamente con los otros ARNs (Pinck et al., 1988), pero sin homología de secuencia con éstos. Las cepas de virus que poseen este tercer tipo de ARN satélite se diferencian de las que no lo contienen por producir síntomas más severos al ser inoculadas en *C. Quínoa*.

Al purificar el virus y someterlo a una centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa, se separan tres bandas correspondientes a tres tipos de partículas denominadas, en función de su coeficiente de sedimentación: T (Top, banda superior), M (Middle, banda media y B

(Botton, fondo), de 53, 93 y 126 S, respectivamente. Las partículas T no contienen ácido nucleico, mientras que M y B contienen una sola cadena lineal de ssRNA de sentido positivo, (ARN-1 y ARN-2, respectivamente) que representa aproximadamente 30% (M) y 42% (B) del peso de sus partículas (Quacquarelli et al., 1976). La cubierta viral es aproximadamente el 70% del peso de las partículas de M y 58% de las partículas B y se compone de 60 subunidades de un único polipéptido de M_r (Masa molecular relativa) de M_r 56.019, como se deduce de la secuencia del gen de la proteína de la cubierta (Serghini et al., 1990; Brandt et al., 1995).

Se ha reportado que el ARN-2 no es infeccioso por sí solo y que el ARN-1 tiene baja infectividad, pero la infectividad relativa de ARN-1 + ARN-2 es diez veces mayor, como fue determinado por el ensayo de lesión local (Quacquarelli et al., 1976), deduciéndose que deben estar presentes los 2 ARN para que el virus pueda generar la enfermedad.

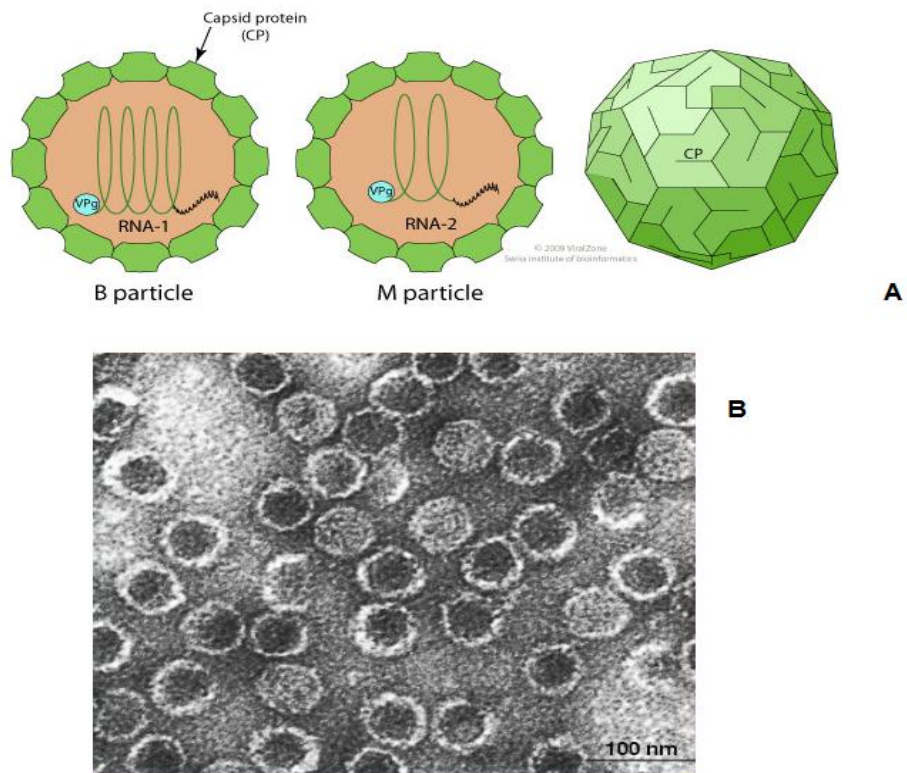


Figura 1.4 A. Esquema del virus GFLV, con su ARN dividido en dos partículas similares, rodeado por su proteína CP en forma icosaédrica (Extraído y modificado de http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/300.html). **B.** Micrografía Electrónica del Virus GFLV. (Demangeat, 2007)

1.5.1.2.2 GENOMA VIRAL

El ARN-2 lleva la información genética para la síntesis de la proteína de la cápside, mientras que la capacidad de infección puede radicar en la información cifrada en el ARN1 (**Figura 1.5**).

Cada ARN genómico codifica una poliproteína, la poliproteína P1 es codificada por ARN1 (Ritzenthaler et al., 1991) con un M_r 253.000, mientras que el ARN2 codifica P2 de M_r 122000 (Serghini et al., 1990). Ambas poliproteínas se procesan proteolíticamente en proteínas funcionales por la proteinasa codificada por ARN1 (Margis et al., 1991; Margis y Pinck, 1992).

ARN-1 tiene 7342 nucleótidos (nt) de longitud y contiene un único ORF de 6855 nt, que se extiende desde nt 243 a nt 7097. La poliproteína codificada por este ORF es de 2.284 aminoácidos de longitud. Esta se procesa por una autoactividad proteínica, en cinco proteínas necesarias para la replicación. Estas proteínas son 1A, la cual es una ARN polimerasa dependiente de ARN putativo de M_r 92.000, 1B contiene las firmas de un dominio de unión a nucleótidos y un cofactor de la proteasa (Ritzenthaler et al., 1991), 1C es la VPg, 1D es una proteasa cisteína de M_r 25.000 (Margis et al., 1991; Margis et al., 1991) y por último 1E que es una polimerasa (Margis y Pinck, 1992, Margis et al., 1991). Estas proteínas son las únicas proteínas necesarias para la replicación del ARN1 (Viry et al., 1993), y funcionan en trans para asegurar la replicación ARN2.

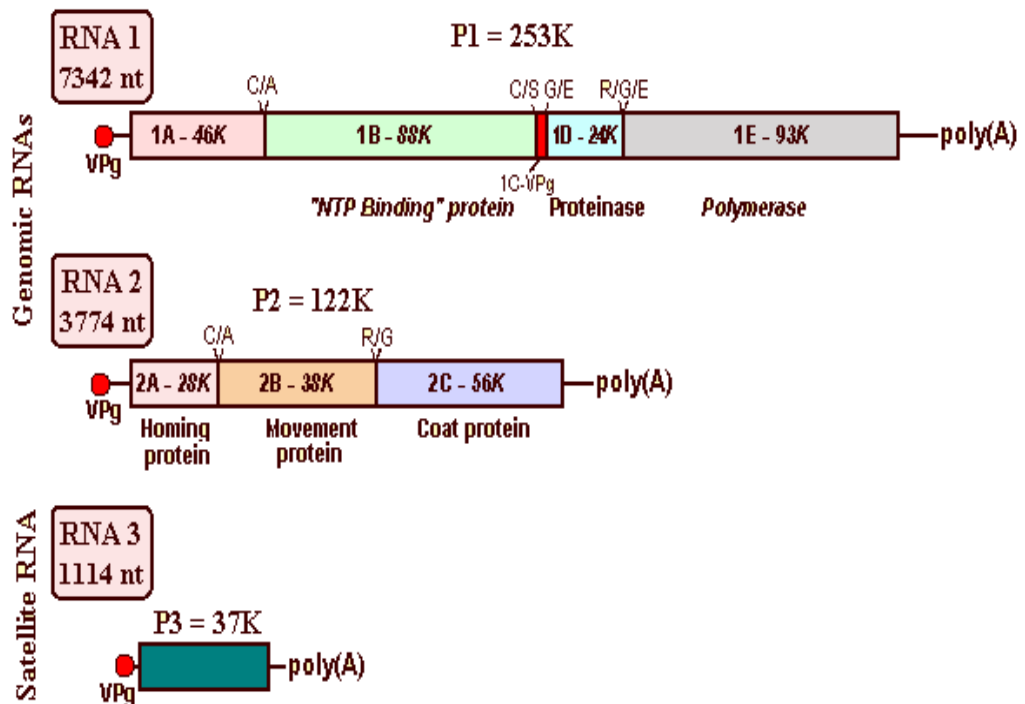


Figura 1.5 Representación esquemática del virus GFLV con su genoma viral bipartito y su satélite de ARN (Extraído y modificado de <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=385>)

ARN-2 tiene 3.774 nt de longitud y codifica para un solo producto P2 de M_r 131.000. Esta poliproteína tiene tres productos finales de maduración *in vitro* (Ritzenthaler et al., 1995a) y es procesada por la 1D. Desde el C-terminal a la N-terminal, la estructura primaria de esta poliproteína incluye la proteína 2C (CP), que se produce por escisión proteolítica de M_r 56.019 (Serghini et al., 1990). Luego sigue la

proteína 2B de M_r 38.000, anteriormente denominada P38, que es la proteína de movimiento putativo que se acumula a concentraciones muy altas en el citosol de las células infectadas (Ritzenthaler et al., 1995a) y también se encuentra en asociación con paredes celulares (Ritzenthaler et al., 1995b), y es esencial para la propagación sistemática del virus (Belin et al., 1999). El tercer producto de maduración es la proteína 2A N-terminal de M_r 28.000 que está implicado en la replicación del ARN-2 (Gaire et al., 1999), ya que media el transporte de los complejos de P2-ARN2 nacientes de su ubicación inicial en el citosol a los sitios de replicación perinuclear donde la replicación y la escisión de ARN2 P2 se llevan a cabo (Gaire et al. 1999).

El ARN satélite (satARN) es de 1.114 nt de longitud y codifica un polipéptido altamente hidrófilo. Tiene las mismas estructuras 5' y 3' terminales como los ARN genómicos ARN1 y ARN2 (es decir, un VPg y una cola poli (A)). La secuencia de codificación está precedido por un líder de 14nt que contiene la secuencia de consenso UG / UGAAAAU / AU / AU / A, que también está presente en otros *Nepovirus*, y es seguido por una región 3' terminal no codificante de 74 nt sin homología con su contraparte en especies de ARN genómico (Fuchs et al., 1989). El ARN satélite es incapaz de replicarse por su propia

cuenta, por lo que requiere ambos ARN del virus auxiliar para la replicación y encapsidación (Pinck et al., 1988; Hans et al., 1992)

Los aislamientos de GFLV son antigénicamente uniformes frente anticuerpos policlonales, incluso los de áreas geográficamente distantes (Huss et al., 1986).

1.5.1.3 CITOPATOLOGÍA:

Las modificaciones ultraestructurales de células infectadas con GFLV en hospedadores naturales o experimentales son las típicas debidas a *Nepovirus*: inclusiones citoplasmáticas, vacuolas vesiculares, paredes celulares gruesas, virus con túbulos y agregados cristalinos de partículas de virus.

Células infectadas por el virus GFLV muestran una proliferación masiva de membranas, que generalmente se acumulan en la periferia nuclear para formar el llamado compartimiento viral y se ha establecido que las membranas de este compartimiento se originan esencialmente del retículo endoplasmático (Ritzenthaler et al., 2002). Los agregados de partículas de virus son comunes, formando grandes cuerpos de inclusión (inclusiones vesicular-vacuolado) constituidos por los ribosomas, hilos del retículo endoplasmático y vesículas membranosas que contienen fibrillas finas (Gerola et al., 1969;. Saric y Wrischer,

1975; Savino et al., 1985). Se cree que el virus se replica en estos cuerpos de inclusión citoplasmáticos cuyas vesículas membranosas se cree que son el sitio de procesamiento de la poliproteínas virales y la replicación del ARN (Pfeiffer et al., 2000).

También es común también ver la formación de viriones alineados dentro de membranas, formando túbulos en el citoplasma asociados al plasmodesmos (Hyun-Ran, 2002), así como la formación de estructuras cristalinas en el núcleo compuestas por partículas vacías (Peñaiglesias y Rubio Huertos, 1971, Peñaiglesias et al., 1978, Fresno et al., 1978).

1.5.1.4 HOSPEDADORES

Aunque, en condiciones naturales, el número de hospedadores del virus GFLV es limitado, experimentalmente tiene un rango de hospedadores que comprende unas 30 familias botánicas. Además de su presencia en el género *Vitis* sp., se puede encontrar en diferentes plantas herbáceas y hortícolas, como: *Nicotiana tabacum*, *Chenopodium* sp., *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, *C. quinoa*., *Gomphrena globosa* L (Brückbauer & Rüdell, 1961a; Baldacci et al., 1962; Hewitt et al., 1962; Dias, 1963; Martelli & Hewitt, 1963a; Vuittenez, 1963; Taylor & Hewitt, 1964).

Las especies de diagnóstico son: *Vitis rupestris*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *G. Globosa*, *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana clevelandii*. Estas son infectables y desarrollan síntomas con la mayoría de las cepas de virus GFLV, mientras que otros, como *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus*, y *Petunia hybrida*, pueden ser infectadas por un menor número de cepas. Especies de propagación: *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *N. benthamiana* y *N. clevelandii* son una buena fuente de virus para la purificación y para mantenimiento de cultivos.

1.5.1.5 SINTOMATOLOGÍA

Las diferencias en la sintomatología de la vid distinguen tres grandes grupos de variantes biológicas en las que cada una produce síntomas distintos:

1) *court-noué* o malformaciones infecciosas: anomalías de todo tipo en la forma de las hojas y en el número de nervios, acortamientos de entrenudos, fasciaciones, corrimiento floral y porte achaparrado de la planta (Hewitt, 1950).

2) amarilleo canario o mosaico amarillo: alteraciones de intensidad variable en cualquier órgano en desarrollo, desde manchas, anillos o líneas, hasta coloración blanquecina o amarillo oro completa, racimos pequeños y uvas que no maduran (Hewitt, 1950)

3) amarilleo reticulado o bandeado de venas: coloración amarilla preferentemente en las nerviaciones principales de las hojas aunque se pueden extender a zonas intervenales, ligeras deformaciones de estas hojas, racimos escasos y de aspecto raquíico (Goheen y Hewitt, 1962).

Todos los trastornos provocados por el GFLV a nivel fisiológico repercuten en el metabolismo de la vida y acaban traducándose en cambios en la morfología general de la misma. Tanto las raíces principales como secundarias aparecen en menor número, con más grosor y menor longitud que las de plantas sanas, lo que afecta en el desarrollo de la planta. Éste menor desarrollo también se manifiesta en los racimos, los cuales se reducen en número y tamaño, maduran irregularmente y presentan corrimiento total o parcial de bayas. (Babini et al., 1981; Walter, 1988; Mannini et al., 1998) (**Figura 1.6**). La longevidad de las plantas infectadas con GFLV es menor, manifestándose con un progresivo decaimiento y aumento de la sintomatología vírica. Entre los síntomas iniciales aparecen entrenudos anormalmente cortos y asimetrías en la hoja. Más tarde, surgen dobles nudos y fasciaciones en sarmientos, síntomas en nervios y los dientes de la hoja son más agudos (**Figura 1.6**). A los 6-7 años, el porte caído de la planta, el aspecto de zarza por la numerosa aparición de brotes anticipados y el poco desarrollo general, dan un aspecto pobre, que en

los casos más graves es causa de muerte de estas plantas (Branas et al., 1938; Calo, 1988, Maninni et al. 1994).

Los síntomas de las plantas infectadas con el virus GFLV se ven afectados por numerosos factores entre los que se encuentran la nutrición, que puede exagerar o disimular los síntomas (Marschner, 1990) y el régimen térmico anual, que también puede alterar la sintomatología, ya que con altas temperaturas puede no manifestarse su típica patología (Vuittenez, 1970; Marschner, 1990).



Figura 1.6 Comparación de material proveniente de viñedos infectado por el virus GFLV (derecha) con materiales sanos (izquierda). Hojas de viñedos enfermos con márgenes dentados, veteado, mosaico amarillo y racimos con uvas de maduración irregular. (Extraído y modificado de <http://wine.wsu.edu/research-extension/plant-health/virology/virus-diseases>)

1.5.1.6 TRANSMISIÓN

La transmisión se da fundamentalmente mediante propagación vegetativa y por nematodos siendo el ectoparásito *Xiphinema index* su

principal vector transmisor (Duran et al., 1992, van Zyl, 2012). También se ha observado transmisión por inoculación mecánica artificial a determinadas plantas herbáceas y a través de semilla de vid (Lazar et al., 1990).

Los únicos vectores que transmiten el virus GFLV a la vid son nematodos del género *Xiphinema* (Andret- Link et al., 2004). Los nematodos que habitan en el suelo son animales invertebrados de cuerpo más o menos transparente con una organización muy sencilla, comprendiendo más de 2.000 especies. Los nematodos que aparecen en vid son especies de origen edáfico y se alimentan de sus raíces (Arias et al., 1990). El nematodo *Xiphinema index* daña es un ectoparásito de la familia Longidoridae del orden Dorylaimida (Hewitt et al., 1958; Raski et al., 1983; et al., 1995). A diferencia de otros vectores nematodos, *X. index*, no transmite ningún otro virus, además del GFLV (Raski et al., Brown et al., 1995; Brown y Weischer, 1998; Wyss, 2000). Experimentalmente, se ha encontrado que este virus puede también ser transmitido por el nematodo *Xiphinema italiae* (Cohn y Nitzany, 1970).

El *X. index* se alimenta de raíces en crecimiento, y es aquí donde adquiere partículas del virus (Hewitt et al., 1958; Raski et al., 1983; Wyss, 2000). Esto se puede dar en menos de 5 minutos de

alimentación y en un mismo periodo se puede dar la infección a otra planta mientras se alimenta de ésta (Alfaro y Goheen, 1974). El virus puede ser retenido durante más de 8 meses en ausencia de planta hospedera o hasta 3 meses si el nematodo se alimenta en plantas hospedadoras inmunes al virus (Taylor y Raski, 1964). El proceso de transmisión está mediada por la capacidad de *X. index* de ingerir partículas de GFLV y de retener estos en sitios de retención específicos dentro de su aparato alimenticio y posteriormente infectar otra vid por la liberación de estas partículas virales de los sitios de retención (Andret-Link et al., 2004) Experimentalmente tanto los adultos como los estados larvarios transmiten el virus (Fresno, 1992).

Por microscopio electrónico estudios del *X. index* revelaron que las partículas de GFLV se adhieren en monocapas al revestimiento cuticular del tracto esofágico por la parte más anterior del odontoforo hasta la parte anterior del tubo del esófago (Taylor y Robertson, 1970). Estos nematodos durante sus 4 etapas de desarrollo juvenil, mudan, y en estas etapas se da la sustitución de la cutícula externa incluyendo el revestimiento del esófago por lo tanto, después de la muda se pierde su capacidad infectiva (Taylor & Raski, 1964) hasta que nuevamente se vuelva alimentar de una planta con el virus y recuperen su potencial virulento (Raski et al., 1983).

Debido al movimiento limitado del vector la dispersión del GFLV en condiciones naturales es lenta (1,3-1,5 m/año), los vectores no son agentes de dispersión eficaces; la propagación a grandes distancias se realiza a través del material vegetal (propagación vegetativa) (Fresno, 1992).

1.5.2 VIRUS GLRAV-3

1.5.2.1 TAXONOMÍA

Los virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid (Grapevine leafroll associated virus, GLRAVs), pertenecen a la familia *Closteroviridae*. Dentro de esta, están implicadas al menos nueve distintas entidades virales filamentosas, entre las que se encuentra el virus GLRAV-3 y forman parte del genero *Ampelovirus* (Martelli et al. 2012, Martelli et al, 2002).

Los *Ampelovirus* son virus filamentosos no envueltos, monopartitos, pertenecientes al grupo IV en la clasificación de Baltimore por ser de ARN simple cadena con sentido positivo. Son transmitidos por piojos harinosos y cochinillas. (Dolja et al; 2006; Karasev, 2000; Martelli et al., 2002)

En la actualidad, la secuencia completa del genoma de casi todos los GLRAVs conocidos está disponible en bases de datos públicas. Los virus GLRAVs son genéticamente diversos, varían en el número y tamaño de marcos de lectura abierta (ORFs) que poseen, siendo GLRaV-3 el más grande y el más complejo con 18.671 nt con 12 ORFs (Fei et al., 2003, Jarugula et al., 2010, Maree et al., 2003)

1.5.2.2 DESCRIPCIÓN

1.5.2.2.1 PARTÍCULA VIRAL

Sus partículas son filamentos flexuosos, 1,800 × 12 nm de tamaño, mostrando bandas transversales características (**Figura 1.7**), al igual que los de todos los miembros de la familia *Closteroviridae*, se construyen de forma helicoidal; el paso de la hélice primaria es de aproximadamente 3,5 nm, y hay aproximadamente 10 subunidades de proteínas por cada vuelta de la hélice (Martelli et al., 2011). El ARN constituye el 5% del peso de las partículas.

Su extremo 3' terminal no está poliadenilado, mientras que el extremo 5' de la partícula es probable que tenga la misma estructura compleja como otros miembros de la familia *Closteroviridae*, compuesto de cuatro proteínas diferentes. Por analogía con otros

miembros de la familia *Closteroviridae*, los viriones pueden contener cinco proteínas estructurales (Dolja et al., 2006). Consta de una CP principal de 34 kDa, que se calcula a partir de la secuencia de aminoácidos y cubre la longitud entera del virión a excepción de la parte 5' terminal (aproximadamente 100 nm), que está recubierta por CP menor (CPm) de 50 kDa, que podría ser instrumental en la determinación de transporte sistémico y el transporte célula a célula (Dolja et al., 2006). Las otras 3 proteínas estructurales adicionales son codificadas por el ORF4 (HSP70h), y el ORF5 (p55) y ORF 9 (p20A) (Dolja et al., 2006, Alzhanova et al., 2007).

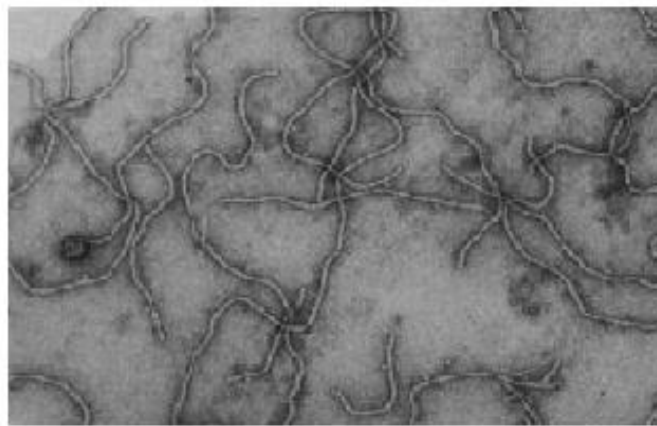


Figura 1.7. A- Representación del virus GLRAV-3, con su forma filametosa, mostrándose las CP que envuelven su ARN genómico (Extraído y modificado de http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/285.html). B. Microscopia electrónica de transmisión de partículas de GLRAV-3 purificadas (Maree et al., 2013)

1.5.2.2.2 GENOMA VIRAL

La primera secuencia completa, de 18.498 nucleótidos de longitud de GLRAV-3 se determinó para GP18 aislado de Sudáfrica (Maree et al., 2008). Este genoma tiene un extremo 5' UTR (del inglés

untranslated region) de 737 nt de longitud, con un contenido de uracilo (U) muy alto (48,5%) (Maree et al., 2008). El tamaño y la composición rica en U de los 5' UTR son características poco comunes entre los miembros de la familia *Closteroviridae*. Actualmente, están disponibles los genomas completos de 10 aislamientos distintos de GLRaV-3, que representan cuatro grupos principales de variantes genéticas. Todos estos genomas poseen secuencias largas de 5' UTRs (510–802 nts) y extremos 3' UTR más cortos y conservados. La organización del genoma consenso de GLRaV-3 aislados abarcan 13 ORF (**Figura 1.8**), los cuales se designan 1a, 1b, y 2-12 de acuerdo con la convención establecida por Agranovsky et al. (1994).

Las funciones de las proteínas putativas codificadas por los ORF 3 a 7 podría deducirse por comparación con los ORFs homólogos en los genomas de otros virus de ARN de cadena positiva, ya que se considera que existe un "núcleo" conservado de genes de replicación y luego genes más variables que codifican las proteínas estructurales y accesorias (Dolja y Carrington, 1992). Como es típico de la superfamilia de *Alfavirus* a la cual pertenece la familia *Closteroviridae*, el núcleo conservado incluye una superfamilia de ARN helicasa y los dominios de la polimerasa de ARN dependiente de ARN (Koonin y Dolja, 1993; Dolja et al., 2006), codificada por los ORFs 1a y 1b (Ling et al., 2004).

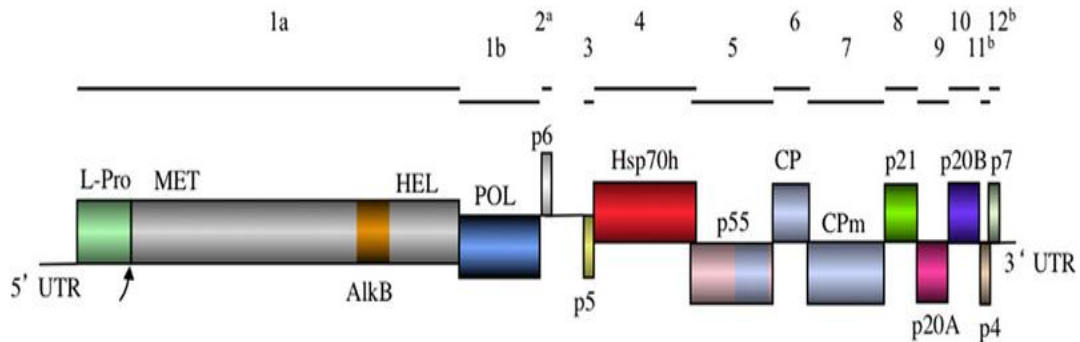


Figura 1.8 Diagrama esquemático del genoma del virus GLRaV-3 a escala. Las líneas sobre el mapa del genoma indican las posiciones de los ORFs y sus respectivos números correspondientes. En el mapa del genoma, los recuadros indican las posiciones de los genes con los productos génicos. (Maree et al., 2013)

El ORF 1a también alberga un dominio Alk B (Maree et al., 2008) capaz de desmetilar el ARN y reparar ARN viral, que está presente en muchos virus de ARN que infectan plantas leñosas (Van den Born et al., 2008) y una proteína similar a la papain proteasa.

La expresión de este ORF es incierta; ya que no hay homólogos detectables de la proteína hidrofóbica putativa pequeña de 6 kDa con un dominio transmembrana codificada por ORF2 y parece poco probable que tenga una función esencial (Bester et al., 2012; Seah et al., 2012).

Los cinco ORFs siguientes (ORF 3 a ORF 7) comprenden un módulo gen quintuple que es un sello distintivo de la familia *Closteroviridae* (Dolja et al., 2006). De estos, el ORF 3 codifica para una pequeña proteína transmembrana la cual se cree que es una proteína de movimiento de célula a célula (Peremyslov et al., 2004). El ORF 4 codifica un homólogo de chaperonas celulares HSP70 moleculares (HSP70h) que también se cree intervienen en el movimiento célula - célula y montaje de las colas de virión cortas típicas de *Closterovirus* (Tian et al., 1999, Peremyslov et al., 1999). La función de la proteína de ~ 60 kDa codificada por el ORF5 es similar a la de HSP70h; estas dos proteínas probablemente cooperan en el montaje de la cola del virión y en el movimiento de célula a célula (Alzhanova et al., 2007). El ORF6 codifica la CP mayor que forma la cuerpo largo del virión, que también se requiere para el movimiento de célula a célula (Alzhanova et al., 2000). La última proteína de este quinteto conservado es una proteína secundaria de la cápside (CPM) que es un componente principal de la cola del virión (Agranovsky et al., 1995; Satyanarayana et al., 2004). Las funciones de los ORFs restantes (ORF 8 a ORF 12) se pueden deducir por analogía por la ubicación similar con ORFs de otros miembros de la familia *Closteroviridae*. Los ORF 8, 9, y 10 pueden codificar proteínas involucradas en la supresión de la defensa de interferencia de ARN del hospedero (Reed et al., 2003; Lu et al., 2004; Chiba et al., 2006) y el

transporte viral a distancias largas (Prokhnevsky et al., 2002). Los pequeños ORFs 11 y 12 son únicos para GLRaV-3 y no están presentes en otros miembros de la familia *Closteroviridae*, y es poco probable que tengan funciones conservadas (Jarugula et al., 2012)

1.5.2.3 CITOPATOLOGÍA

GLRaV-3 es un virus que se limita al floema de los hospederos infectados, en cuyos órganos y tejidos se distribuye de manera desigual (Boscia et al., 1991; Credi y Santucci, 1991; Rowhani et al., 1997; Pietersen, 2004). Las modificaciones citopatológicas de tubos cribosos diferenciados y células del parénquima del floema puede ser extensa. El citoplasma de las células infectadas contiene cuerpos de inclusión formados por grupos de vesículas membranosas con contenido fibrilar originado a partir de la proliferación de la membrana periférica de las mitocondrias, que son liberados en el citoplasma luego de la ruptura de estos organelos (Kim et al., 1989, Faoro et al., 1992).. Se mostró experimentalmente que existen vesículas mitocondriales que contienen ARN y se cree que son los sitios de la replicación del genoma viral (Faoro y Carzaniga, 1995). También se pueden ver *clusters* de partículas virales que pueden estar rodeados por una membrana delimitadora, dando lugar a enclaves intracitoplásmicos

característicos, muchas veces ubicados cerca del núcleo (Faoro et al., 1992).

1.5.2.4 HOSPEDEROS

El virus GLRAV-3 no tiene aparentemente ningún otro hospedero distinto al de la especie *Vitis* (Klaassen et al., 2011). Otras infecciones naturales de *Vitis californica* e híbridos *Vitis vinifera* x *Vitis californica* se han reportado en California (Klaassen et al., 2011), y de *Vitis labruscana* (Concord) y *Vitis labrusca* (Cataratas) en el Estado de Washington (Naidu et al., 2011).

Las especies de diagnóstico y de propagación son varios cultivares *V. vinifera* rojos como Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Mission, Pinot noir,

1.5.2.5 SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas pueden variar en gran medida con la estación, el cultivar de vid, y las condiciones climáticas. Los efectos más comunes de infección con este patógeno son: la reducción de la productividad, menor contenido de azúcar en la fruta, se reduce el tamaño del manojito de uva y de la baya en si, además de la disminución de la pigmentación

de ésta (Pietersen, 2004; Uyemoto et al., 2009) (**Figura 1.8**). Otros efectos en hojas sintomáticas son disminución de la clorofila, pigmentos carotenoides, rubisco, nitrato reductasa, la actividad fotosintética y proteínas de la membrana de los tilacoides (Hristov y Abracheva, 2001). La enfermedad causa un daño permanente en el viñedo. Además, algunas variedades pueden ser completamente asintomática, al igual que algunos patrones y ciertos cultivares blanco *V. vinifera* y pies híbridos americano, que pueden servir como reservorio desde donde el virus puede ser transmitido a los cultivares sanos. Falta de síntomas no implica necesariamente una tolerancia genética o resistencia al virus (Kovacs et al. 2001). Las diferencias en la respuesta de la enfermedad se han medido entre las diferentes especies de *Vitis* y aislamientos virales (Golino 1993), sin embargo la resistencia al virus GLRaV-3 aún no se ha demostrado en *V. vinifera* (Pietersen 2004).

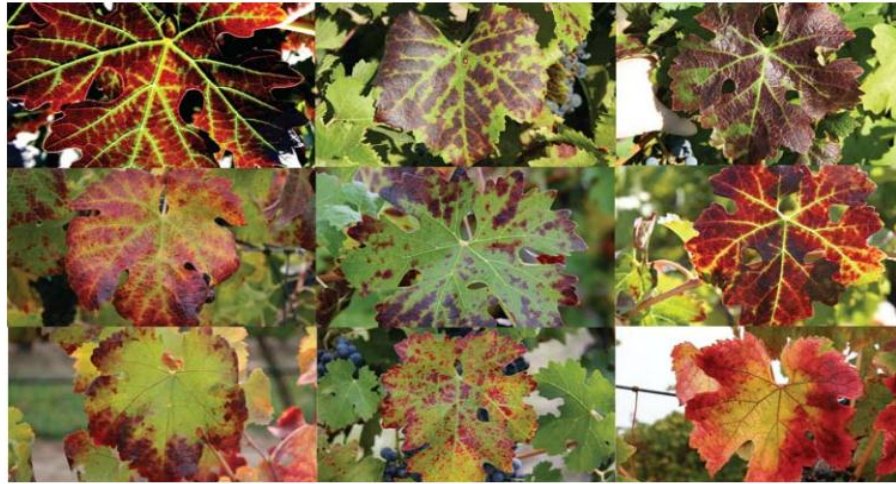


Figura 1.9 Arriba: distintos síntomas del virus GLRAV-3 en hojas de vid. Abajo: Comparación de racimo de uvas normales (extremos) con las provenientes de viñedos con el virus GLRAV-3 (centro). (Naidu et al. 2008)

En primavera, la brotación y desarrollo de los brotes a menudo se retrasa en los viñedos afectados. Esto suele ser un fenómeno con una duración corta, de sólo unas pocas semanas. Los síntomas en las hojas se vuelven evidentes a principios o mediados de verano, que suele aparecer antes en los viñedos que sufren estrés hídrico. Estos

síntomas aumentan en número y gravedad hasta finales de otoño (Maree et al., 2013).

Se ha demostrado que en ciertos cultivares se reduce el tamaño y el número de raíces en comparación con los cultivares no enfermos. (Hristov et al., 2001; González et al., 1995).

Causa enrojecimiento de la zona intervenal, mientras que las venas primarias y secundarias permanecen verdes. Las hojas de algunas variedades de color rojo, en particular aquellos con fruta muy pigmentada, desarrollan el color rojo uniforme sin vetas verdes (**Figura 1.9**). En cultivares blancos, el área intervenal puede llegar a ser clorótico. A finales del otoño, los márgenes de las hojas ruedan hacia abajo, la cantidad y cuanto ruedan las hojas varía considerablemente entre los cultivares infectados. A medida que avanza la temporada de crecimiento, más y más hojas presentan síntomas, progresando desde la base del brote a la parte superior. (Weber et al., 1993; Martelli y Boudon-Padieu, 2006; Martelli et al., 2012)

1.5.2.6 TRANSMISIÓN

El virus se puede transmitir por material de propagación vegetativo o por insectos. Mediante material de propagación vegetativo

el virus GLRaV 3 puede propagarse de un lugar a otro cuando se utilizan esquejes derivados de una vid infectada para la propagación (Martelli, 1993, Martelli, 2000). La difusión del virus GLRaV-3 a través de estas prácticas puede suceder con los cultivares tanto de bayas rojas como blancas de *V. vinifera*, especies de *Vitis* nativas de América, así como híbridos inter específicos y rizomas. Por lo tanto, el uso de esquejes o injertos infectados para la propagación, presentan muchas vías para la introducción de GLRaV-3 en viñedos. Debido a que el GLRaV-3 no es mecánicamente transmisible entre las vid, no se produce su propagación en los viñedos a través de las tijeras de podar, recortadoras, diluyentes, cosechadoras, o sierras (Naidu et al., 2015),

La difusión de planta a planta del virus GLRaV-3 se produce a través de cochinillas de la harina (*Pseudococcidae*) y cochinillas (*Coccidae*) (Tsai et al., 2010). Algunas condiciones que pueden influir en la transmisión del virus son: el título de virus, la distribución espacial de los virus, y variaciones estacionales (Tsai et al., 2011a; Tsai et al., 2012). Las cochinillas de harina muestran distinción de género específico en su capacidad para transmitir *Ampeloviruses*. Los machos tienen piezas bucales solamente vestigial no adecuados para la alimentación y la adquisición del virus mientras que las hembras tienen piezas bucales funcionales que permiten la adquisición del virus durante la ingesta de floema o savia de la planta, y su posterior

transmisión (Daane et al.,2012, Grasswitz y James, 2008). Sin embargo, las hembras no tienen alas y son en gran parte sedentarias, lo que limita el movimiento y la propagación del virus a distancias largas (Grasswitz y James, 2008). Ha sido reportado que las ninfas de primer estadio son los vectores más eficientes de GLRaV-3 en comparación con los adultos (Petersen y Charles., 1997; Tsai et al., 2008), dado que los adultos son prácticamente inmóviles y las pequeñas ninfas se pueden dispersar fácilmente, incluso a través del viento (Barrass et al., 1994). Por lo tanto, se espera que las etapas de vida jóvenes sean las responsables de la mayor propagación de la enfermedad en el campo. Las tasas de transmisión más altas se obtuvieron con ninfas de primer y posiblemente de segundo instancia que con adultos de *P. ficus* y *Pseudococcus longispinus* (Douglas y Krüger, 2008; Petersen y Charles,1997), en donde una sola ninfa de cochinillas de la harina es capaz de infectar una vid saludable con GLRaV-3 (Douglas y Krüger, 2008).

Los estudios sobre la transmisión de cochinilla sugieren que la transmisión es semipersistente (Tsai et al., 2010). La pérdida de infectividad después de 24 horas es representativa de una manera de transmisión no persistente o semi-persistente. La detección de GLRaV-3 en las glándulas salivales de *Planococcus citri* sugiere un mecanismo circulatorio de la transmisión (Daane et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Como objetivo general del presente trabajo se plantea evaluar la técnica molecular de RT-PCR así como la serológica de DAS-ELISA, para establecer cuál es la técnica recomendable para realizar la identificación de la presencia de los virus PVY en papa y GFLV y GLRaV-3 en vid.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener un método eficiente para la extracción de ARN viral de PVY, GFLV y GLRAV-3 de tejidos específicos, tanto de papa como de vid
- Poner a punto y validar una técnica de RT-PCR para la identificación de ARN viral de PVY, GFLV y GLRAV-3 en el material de propagación de papa y vid.
- Comparar los límites de detección de las técnicas RT-PCR y ELISA, en los distintos tejidos de papa para PVY y de vid para GFLV y GLRAV-3.

- Determinar cuál es la mejor época (primavera o verano) y el mejor tejido (floema, hoja, peciolo) para realizar la detección simultánea de GLRAV-3 y GFLV en vid.
- Comparar costos y tiempos de realización de las técnicas de RT-PCR y ELISA para la identificación de los virus PVY en papa y GFLV y GLRAV-3 en vid.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

En el presente trabajo se analizaron muestras de 10 papas y 10 plantas de vid, para detectar la presencia de los virus PVY en papa y GFLV y GLRaV-3 en vid. Las muestras de tubérculos y hojas de papa fueron de la variedad Chieftain provenientes, los tubérculos brotados del ensayo de Postcontrol del Programa de Certificación y las hojas de muestras enviadas a analizar por productores también en el marco del Programa de Certificación. Las muestras de vid fueron de la variedad Tannat y se obtuvieron del viñedo de la Estación Experimental INIA - Las Brujas y fueron provistas por el Ing. Agr. Pablo Campi.

3.2 MUESTREO

3.2.1 PAPA

Las muestras de brotes, corteza con y sin piel de papa se tomaron de material que fue cultivado en invernáculos en tierra autoclavada con condiciones de crecimiento de 16 hrs de luz y temperatura mantenida entre los 20 y 30°C, embebiendo con ácido giberèlico al 1,5% durante

24hrs, sacándose el tubérculo brotado en el mes de abril de 2015. Las hojas fueron obtenidas directamente del campo sembrado, en el mes de mayo de 2016.

Ambos tipos de muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas con su identificación correspondiente en cámara de frío, a una temperatura de 4° C hasta su análisis.

3.2.2 VID

Se recolectaron muestras de plantas de vid durante la poda de verano (al inicio de diciembre 2015) y la poda de otoño (principio de abril 2016). Se tomaron al azar 10 hojas jóvenes (de la parte más alta de la planta y de no más de 5 cm de largo x 5 cm de ancho) y 10 hojas maduras (de la parte media de la planta y de no más de 20 cm de largo x 20cm de ancho). También se colectaron 10 sarmientos de aproximadamente 15 cm de largo de toda la planta. La recolección se llevó a cabo depositando cada muestra en una bolsa plástica, con la identificación correspondiente y conservada en cámara de frío, a 4° C, hasta su posterior análisis.

3.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Todas las muestras fueron analizadas mediante la técnica serológica DAS–ELISA. A partir del resultado del análisis, se seleccionaron muestras positivas y negativas, para realizar un análisis comparativo con la metodología molecular RT–PCR (*Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction*). Todas las muestras se hicieron por triplicado, tomándose como resultado positivo si 2 de las 3 repeticiones resultaban positivas.

3.3.1 PRUEBA SEROLÓGICA DAS –ELISA

Se utilizó el siguiente protocolo en base a lo establecido por la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) para detectar virus vegetales por DAS-ELISA (OEPP/EPPO, 2015)

- Sensibilización de la placa

Se sensibilizó la placa con el anticuerpo específico del virus. Para ello se diluyó la inmunoglobulina IgG (de la marca comercial Bioreba) 1:1000(v/v) en “*Coating Buffer*” (ver ANEXO, Composición Buffers ELISA). Luego se colocaron 200 µl de dilución de IgG en cada celda. Posteriormente se cubrió la placa con polietileno para evitar la deshidratación y se incubó por 24 horas a 4° C. Transcurrido este tiempo se procedió al lavado de la placa, para lo que se vació ésta, luego se llenaron las celdas con “*Washing Buffer*” (ver ANEXO, Composición

Buffers ELISA) y se volvió a vaciar energéticamente el contenido. Este procedimiento se repitió 6 veces, evitando que quedaran burbujas en la superficie de cada celda.

- Adición de la muestra

Cada muestra identificada fue macerada y homogenizada en bolsas separadas, utilizando "*Extraction buffer*" correspondiente (ver ANEXO, Composición Buffers ELISA), en un factor de 1:20 (w/v). Se adicionaron 200 µl del macerado a cada celda previamente identificada. Adicionalmente se llenó al menos un celda "*Extraction buffer*" como blanco y dos celdas con muestras positivas y negativas al virus a detectar como controles positivo y negativo, respectivamente. Una vez terminada esta etapa se cubrieron las placas con polietileno y se mantuvieron a 37° C durante 4 horas aproximadamente, para después proceder nuevamente al lavado descrito anteriormente en el punto de Sensibilización.

- Adición del Conjugado

El anticuerpo conjugado con la enzima (Bioreba) se diluyó 1:1000 (v/v) "*Conjugate Buffer*" (ver ANEXO, Composición Buffers ELISA). Se adicionaron 200 µl de la dilución en cada celda. Luego se cubrió la placa con polietileno y se incubó 4 horas a 37° C. Una vez finalizada la

incubación se lavó las placas de acuerdo al procedimiento ya descrito en el punto de Sensibilización.

- Adición del Sustrato

Se utilizó como sustrato de la enzima p-nitrofenil fosfato, a una concentración de 1mg/ml, disuelto “*Substrate Buffer*” (ver ANEXO, Composición Buffers ELISA). Luego se agregaron 200 µl en cada celda y se incubó a temperatura ambiente (18 –25° C), en oscuridad. La lectura se realizó a una longitud de onda de 405nm en un lector de placas Multiskan EX, ThermoScientific, a los 30 minutos aproximadamente de haber agregado el sustrato.

Para determinar una muestra como positiva se consideró como *cut off* el valor obtenido siguiendo la siguiente fórmula:

$cut-off = (\text{Promedio} + 3 * \text{Desviación Estándar}) * 1,1$ (ver Anexo, Análisis de Datos)

3.3.2 PRUEBAS MOLECULARES

3.3.2.1 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Se realizan los ensayos a partir de 2 métodos distintos de extracción de ARN: a) Kit comercial de extracción RNeasy Plant Qiagen, b) Método de Osmani y Rowhani.

En ambos protocolos se utiliza un *pool* de material que consto de 4 muestras de la parte de la planta a utilizar y siempre usando la misma planta.

Las extracciones en papa se realizaron a partir de los brotes enteros de tubérculos, de la corteza del tubérculo con y sin piel, y de hojas.

En vid, las extracciones se realizaron a partir del floema de los brotes lignificados (sarmientos) obtenidos por el raspado de la cubierta y en el caso de las hojas y peciolo se tomaron 2 de hojas maduras y 2 de hojas verdes para realizar el *pool*. Dependiendo del método de extracción fue la cantidad de material utilizado, para el Kit RNeasy Qiagen se utiliza un *pool* de 50mg de material mientras que para el Protocolo de Osmani y Rowhani se utilizaron 200mg.

3.3.2.1.1 KIT RNEASY QIAGEN

La purificación de ARN total se realizó utilizando el kit RNeasy Plant de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemania).

3.3.2.1.2 MÉTODO DE OSMANN Y ROWHANI

Se siguió el método descrito por Osmann y Rowhani en 2006 con ligeras modificaciones. Además de utilizarse el Buffer de Extracción descrito (Buffer de Extracción 3) (Ver ANEXO, Composición Buffers ELISA) se utilizó para la primera etapa los Buffers de Extracción descritos para DAS-ELISA por Bioreba (Ver ANEXO, Composición Buffers ELISA)

Se realizó una primera extracción introduciendo las muestras pesadas en bolsas plásticas esterilizadas. Dentro de las bolsas, las muestras fueron maceradas con un rodillo. Cada muestra se hizo por duplicado en bolsas distintas, en una relación 1:20 p/v, donde a una se le agregó Buffer de Extracción 1 (BE1) en el caso de las muestras de papa y Buffer de Extracción 2 (BE2) en el caso de las muestras de vid, y en la otra Buffer de Extracción 3 (BE3) (tanto para papa como para vid).

Seguido de esa primera extracción se procedió a la liberación del material genético del virus de su envoltura de proteínas mediante Buffer de desnaturalización GES (0.1 M Glicina, 0.05 M NaCl, 1mM EDTA y 0.5% Triton X-100) con y sin 1% de β -mercaptoetanol para papa y con 1% de β -mercaptoetanol para vid (Rowhani et al., 2000). Se agregó 4,8 y 16 μ l de extracto en 46, 42 y 34 μ l de buffer GES, incubándose a 95°C por 10 minutos en un termociclador Multigene, Labnet. Transcurrido el tiempo se reservó en hielo procediendo inmediatamente a realizar los ensayos siguientes. El volumen de extracto óptimo al que se llegó es de 16 μ l en 34 de buffer GES.

3.3.2.2 RT-PCR

Para llevar a cabo este protocolo se necesitó realizar en primer lugar la transcripción reversa (RT), donde se utilizó oligodT (ThermoScientific) como partidores, así como transcriptasa reversa y los ssRNA totales obtenidos de las muestras a través de los métodos descritos anteriormente. La mezcla de reacción utilizada se describe en la **Tabla 3.1**. El tiempo de reacción fue de 60 minutos a 47 C en el termociclador

Tabla 3.1 Reactivos Mix de Retrotranscripción

Reactivo	Volumen (µl)
H2O	6,5
Buffer RT	4
OligodT	1
dNTPs	5
Retrotranscriptasa Reversa	1
ARN	2,5

Para detectar los virus en estudio (PVY, GFLV, GLRaV-3) por medio de RT-PCR se utilizaron los *primers* descritos en la **Tabla 3.2**. Se utilizó un control interno de la reacción, específico para cada especie (**Tabla 3.2**). Como control negativo se utiliza agua desionizada.

Terminada la reacción de RT, con el ADN copia (ADNc) sintetizado se procedió a realizar la reacción de PCR utilizando la mix de PCR dada en la **Tabla 3.3**. Para determinar el volumen óptimo de ADNc en la reacción de PCR para detectar cada virus se realizaron pruebas con 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 µl.

Tabla 3.2 Primers utilizados en las reacciones de PCR

VIRUS Y CONTROLES	CULTIVO	PRIMER*	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO AMPLICON	Ta**	REFERENCIA
PVY	Papa	PVY-F	ACGTCCAAAATGAGAATGCC	480 pb	55	Nei y Singh, 2001
		PVY-R	TGGTGTTTCGTGATGTGACCT			
GLRaV-3	Vid	LC1-F	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT	546 pb	56	Osman y Rowhani, 2004
		LC2-R	GTTGTCCCGGGTACCAGATAT			
GFLV	Vid	GFLV-F	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	118 pb	56	Gambino y Gribaudo, 2006
		GLFV-R	GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG			
CONTROL INTERNO	Vid	MDH.H968	GCATCTGTGGTTCTTGCAGG	196 pb	56	Nassuth et al., 2000
		MDH.C1163	CCTTTGAGTCCACAAGCCAA			
	Papa	EF1-F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	101 pb	55	Jeevalatha et al., 2015
		EF1-R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA			

*Todos los primers fueron sintetizados por Macrogen, Korea

** Temperatura de Annealing

El ADNc que no fue utilizado fue almacenado en tubos de 0,2 ml a -4°C.

Los tiempos y temperaturas que se utilizaron en el termociclador para la reacción de amplificación variaron dependiendo del virus a analizar. Para PVY los ciclos corresponden a:

- 5 minutos a 94° C

- 35 ciclos por 30 segundos a 94° C para desnaturalización, 30 segundos a 55° C para anillamiento, 30 segundos a 72° C para extensión.
- 10 minutos a 72° C.
- Mantención a 4° C.

Tabla 3.3 Reactivos Mix de PCR

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer	2.5
MgCl ₂	2.5
dNTPs	1.25
Primers c/u	0.625
Taq	0.2
H ₂ O	14,8- 16,3
cADN	1 – 2,5

Nota: Volumen final 25 μl. El volumen de cADN varía dependiendo de cuál fue el volumen en el que los resultados obtenidos eran los esperados. Así en el caso de GLRaV-3 fue 2,5 μl, en los casos de GFLV 1,5 μl y en PVY 1 μl.

Así en el caso de GFLV y GLRAV-3 hay un cambio en la temperatura de anillamiento y cantidad de ciclos, quedando de la siguiente manera:

- 5 minutos a 94° C.

- 45 ciclos por 30 segundos a 94° C para desnaturalización, 45 segundos a 56° C para anillamiento, 30 segundos a 72° C para extensión.

- 10 minutos a 72° C.

- Mantención a 4° C.

3.3.2.3 VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Terminado el proceso RT-PCR se preparó un gel de agarosa (Invitrogen) al 2,5% en buffer TBE 0.5X (ThermoScientific), con 2 μ l de GoodView como intercalante de ADN.

Para visualizar la calidad del ARN extraído se realiza un gel de agarosa al 1% con 1% (v/v) de hipoclorito de sodio (Aranda et al., 2012) en buffer TBE 0.5x, y 2 μ l de GoodView,

Se cargó en cada celda 8 μ l de producto de RT-PCR o de producto de extracción, con 2 μ l de Loading Buffer 5x (Bioline).

Se utilizaron 2 marcadores de peso molecular (MPM), dependiendo del tamaño del amplicón esperado: para los del virus PVY

y GFLV Hyperladder 25pb (Bioline) y para GLRAV-3 Hyperladder 50pb (Bioline), y en el caso del ARNr Hyperladder I (Bioline).

La electroforesis se realizó a 100 V por 40 minutos. Finalizado este proceso se observó el gel en un transiluminador de luz UV DyNA light, Labnet.

3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO KAPPA

Para hacer el análisis comparativo entre el análisis serológico y el análisis molecular se realizó un test estadístico “Kappa”, el cual permite medir el nivel de concordancia entre dos técnicas de diagnóstico (Cohen, 1960). Así, cuando se comparan entre sí dos técnicas se obtiene la **Tabla 3.4**. La proporción de coincidencias entre ambas técnicas se mide mediante: $P_0 = (a + d) / n$ (**Fórmula 1.1**)

Considerando que existe independencia en el resultado entre ambas técnicas, la proporción de coincidencias debida al azar (P_e) se calcularía como se expone en la **Fórmula 1.2**.

$$P_e = [(a + c)(a + b) + (b + d)(c + d)] / n^2 \text{ (Fórmula 1.2)}$$

Índice Kappa de Cohen se calcularía según la **Fórmula 1.3**:

$$k = (P_0 - P_e) / (1 - P_e) \text{ (Formula 1.3)}$$

Landis y Koch (1977) propusieron una clasificación para la coincidencia entre dos técnicas según su índice Kappa de Cohen (Tabla 3.5).

Tabla 3.4 Tabla de contingencia para la comparación entre dos técnicas (Vidal, 2010)

		TÈCNICA 2		
		Positivo	Negativo	total
TÈCNICA 1	Positivo	a	b	a+b
	Negativo	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	n

Tabla 3.5 Clasificación en la coincidencia entre dos técnicas de diagnóstico según su índice Kappa de Cohen (Landis y Koch, 1977)

Índice Kappa de Cohen	Cohincidencia
0,81-1	Casi perfecta
0,61-0,80	Sustancial
0,41-0,60	Moderada
0,21-0,40	Justa
0,0-0,20	Ligera
Menor a 0,0	Pobre

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 ANÁLISIS MOLECULARES.

4.1.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Uno de los principales elementos a considerar en el desarrollo de una metodología de diagnóstico molecular de plantas de campo infectadas con virus, es contar con un método de extracción de ARN que sea eficiente, basado en una alta concentración y pureza del ARN obtenido. Los posibles contaminantes remanentes en la extracción de ARN deben ser considerados ya que pueden afectar el posterior resultado diagnóstico.

Se compararon dos métodos de extracción de ARN mediante la visualización de la calidad del ARN obtenido mediante gel de agarosa al 1% con 1% (v/v) de hipoclorito de sodio (Aranda et al., 2012). Los métodos de extracción de ARN fueron el kit RNeasy Qiagen y el método de Osmani y Rowhani, los cuales se puede ver en las **Figuras 4.1 y Figura 4.2**, respectivamente.

La verificación de la calidad del ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1% e hipoclorito al 1% (v/v) sólo se pudo visualizar cuando el ARN fue extraído con el kit RNeasy Qiagen (**Figura 4.1**). Cuando las

muestras fueron obtenidas por el Método de Osmani y Rowhani no se observó purificación de ARNs. Se infiere que esto puede haberse debido a la presencia de polifenoles, polisacáridos y otros componentes del tejido de la planta que impiden resolver correctamente la electroforesis o degradan el ARN. (**Figura 4.2**).

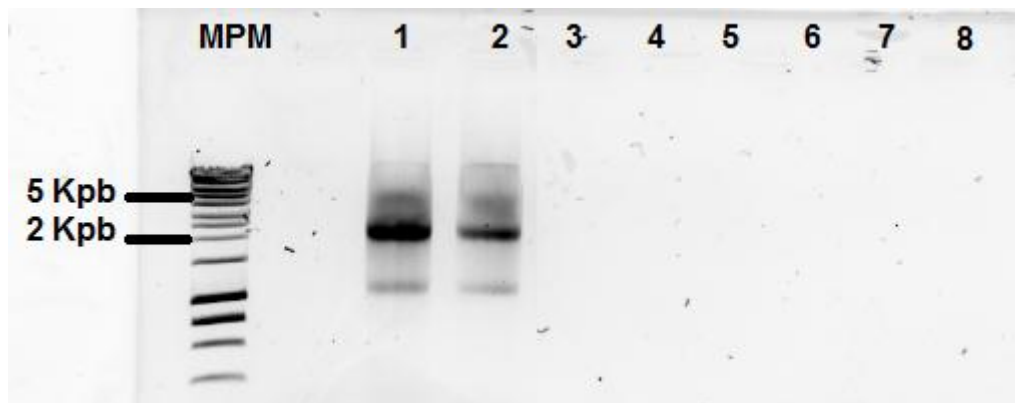


Figura 4.1. Visualización de ARN extraído con kit RNeasy Qiagen. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con 1% de hipoclorito de sodio. Carril 1: Brote papa, Carril 2: Hoja papa, Carril 3: Corteza de papa con piel, Carril 4: Corteza de papa sin piel, Carril 5: Hoja de vid, Carril 6: Floema de vid, Carril 7: Peciolo de vid, Carril 8: Blanco, MPM: Hyperladder I

En la **Figura 4.1** se pueden observar las distintas partes de la papa y vid en las que se realizó extracción de ARN. Únicamente se visualizan bandas en las extracciones hechas a partir de hojas y brotes de papa. Estas bandas de aproximadamente 4800 pb y 2000 pb correspondería al ARN ribosomal 28S y 18S, respectivamente (Aranda et al, 2012). Cuando se realizó la extracción de ARN a partir del cuerpo

del tubérculo con y sin piel no se observaron bandas, esto podría deberse a que los tubérculos presentan pigmentos, polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios que coprecipitan con el ARN, afectando de esta forma el rendimiento y calidad de los mismos (Claros y Canovas, 1998; Kim y Hamada, 2005)

En la **Figura 4.1** también se observan las extracciones realizadas en vid de las muestras recolectadas en la poda de verano (diciembre de 2015). No se visualiza ninguna banda en las extracciones hechas en ninguno de los tres tejidos (hoja, peciolo y floema), infiriendo que no se logró extraer el ARN. Esto posiblemente se deba a que existe una gran cantidad de polifenoles que al igual que en el tubérculo de papa, impiden la correcta extracción de ácidos nucleicos. Existe un protocolo especial desarrollado por McKenzie (MacKenzie et al., 1997) para la extracción de ARN de plantas leñosas con el kit RNeasy Qiagen, pero para esta tesis no se realizó ya que encarece significativamente los costos, y lo que se busca es un método de trabajo de bajo costo.

En la **Figura 4.2 A** se observan las Extracciones hechas por el Método de Osmani y Rowhani en papa para brote, hojas, corteza con y sin piel realizadas en BE1, mientras que en la **Figura 4.2 B** las extracciones hechas en vid, de floema, peciolo y hoja en BE3. Como se puede ver en ambas figuras no se visualizan bandas, seguramente por

lo explicado anteriormente para la extracción de tubérculo y vid de la **Figura 4.1**. La electroforesis se realizó tanto con el extracto primario (solo con los buffers BE1 en el caso de papa, y con BE3 en el caso de vid), como con el extracto inmediatamente luego de incubar a 95 °C por 10 minutos con el Buffer GES (extracto secundario),

Como se puede ver en las **Figuras 4.1 y 4.2**, el único método por el cual se pudo determinar que hubo extracción de ARN por electroforesis fue con el kit RNeasy Qiagen en brote y hoja de papa, mientras que en los demás tejidos no se pudo determinar. De todas formas no significa que no haya extracción de ARN, lo cual se comprobó por controles internos de reacción de PCR, que se detallará en puntos posteriores.

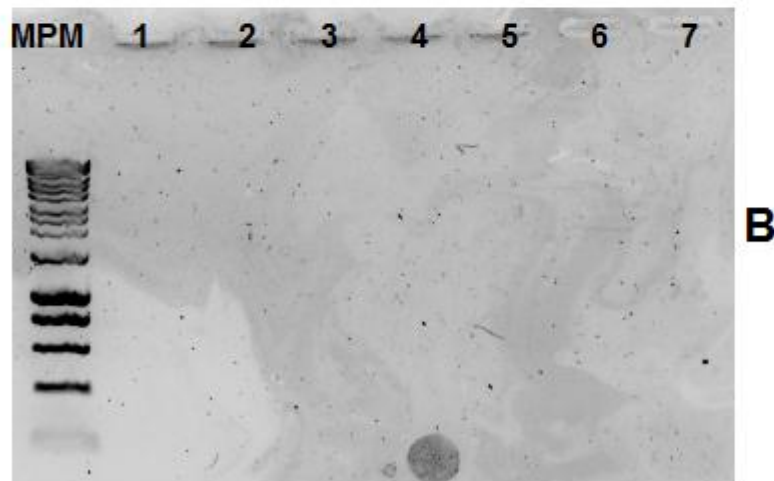
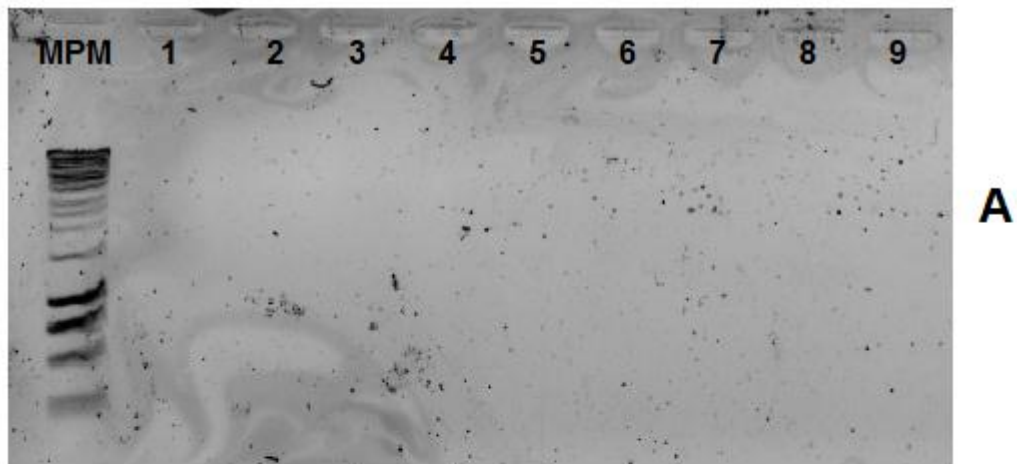


Figura 4.2 Visualización de ARN extraído con el Método de Osmani y Rowhani en tejidos de papa (A) (con 1% β -mercaptoetanol) y vid (B). Electroforesis en gel de agarosa al 1% con 5% de hipoclorito. A: Carriles 1-2; brote extracto primario y secundario respectivamente, Carril 3-4: hoja extracto primario y secundario respectivamente, Carril 5-6: corteza con piel extracto primario y secundario respectivamente, Carril 7-8: corteza sin piel extracto primario y secundario respectivamente, Carril 9: Blanco. B: Carriles 1-2: floema extracto primario y secundario respectivamente, Carril 3-4: hoja extracto primario y secundario respectivamente, Carril 5-6: peciolo extracto primario y secundario respectivamente, Carril 7: Blanco. MPM: Hyperladder I.

4.1.2 DETECCIÓN BASADA EN PCR

En todos los casos el ADNc obtenido por RT fue utilizado para poner a punto la técnica de PCR

4.1.2.1 PAPA

La **Figura 4.3** presenta una electroforesis en gel de agarosa con los resultados obtenidos para la amplificación del virus PVY, partiendo de ARN obtenido de la extracción realizada con el kit RNeasy Qiagen. Se puede ver una única banda de aproximadamente 480 pb que correspondería a la presencia del virus PVY tanto en hoja como en brote, pero no es el caso del tubérculo con y sin piel.

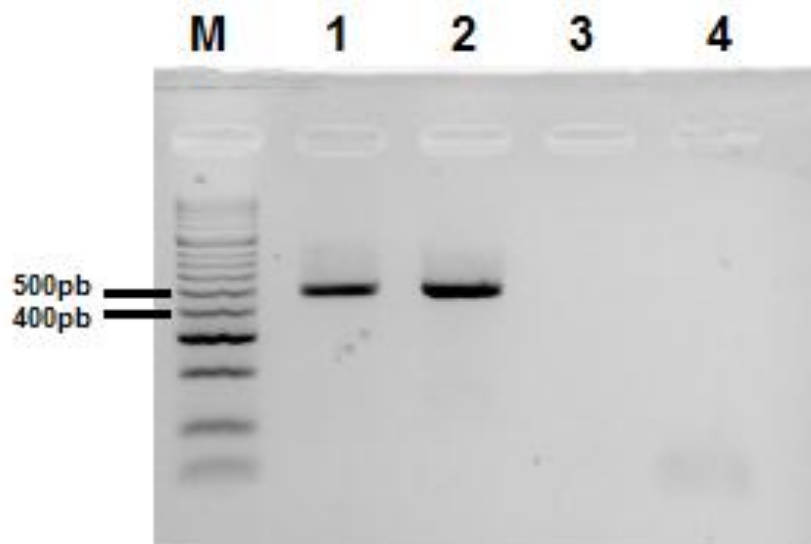


Figura 4.3 Visualización de productos de RT-PCR de papa infectada con PVY, a partir de extracciones realizadas con Kit RNeasy Qiagen, en gel de agarosa al 2,5%. Carril 1: brote, Carril 2: hoja. Carril 3: corteza con piel, Carril 4: corteza sin piel, M: Hyperladder 50pb.

En la **Figura 4.4 A** se observa la amplificación del virus PVY en las muestras de ARN extraídas con el Método de Osmani y Rowhani con BE1, seguido de la extracción con buffer GES con y sin 1% de β -mercaptoetanol. Se observó amplificación en brote con buffer GES con y sin el agregado de β -mercaptoetanol, siendo la banda con agregado de β -mercaptoetanol visiblemente más intensa que la observada sin el agregado del agente reductor. En el caso de la hoja, la extracción sin buffer GES no amplificó el ácido nucleico, mientras la extracción con β -mercaptoetanol sí lo hizo. En base a estos resultados se puede sugerir que el agregado de β -mercaptoetanol podría mejorar la extracción de ARN viral tanto en brote como en hoja, ayudando a mantener sin degradar el ARN y bloqueando posibles inhibidores. En cuanto a las muestras de tubérculo con y sin pie no se observó amplificación del virus PVY.

En la **Figura 4.4 B** se muestran las extracciones realizadas con el Método de Osmani y Rowhani con BE3, seguidas por la extracción con Buffer GES con y sin 1% de β -mercaptoetanol. En la electroforesis no se identificaron bandas por lo que éste no sería un buen método para la detección de este virus.

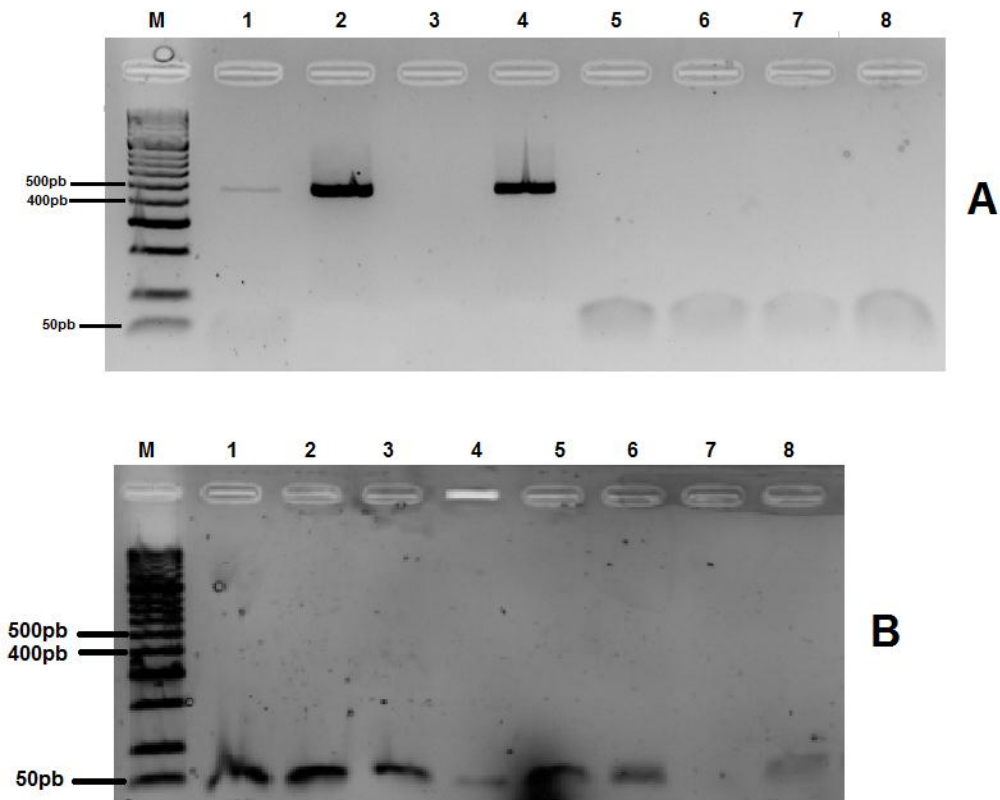


Figura 4.4 Visualización de productos de RT-PCR de papa infectada con PVY, a partir de extracciones realizadas con el método de Osmani y Rowhani. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% a partir de extracciones con BE1(A) y BE3 (B). A: Carril 1: brote s/ β -mercaptoetanol. Carril 2: brote c/ β -mercaptoetanol, Carril 3: hoja s/ β -mercaptoetanol. Carril 4: hoja c/ β -mercaptoetanol, Carril 5: corteza sin piel s/ β -mercaptoetanol, Carril 6: corteza sin piel c/ β -mercaptoetanol, Carril 7: corteza con piel s/ β -mercaptoetanol, Carril 8: corteza con piel c/ β -mercaptoetanol. B: Carril 1: brote s/ β -mercaptoetanol. Carril 2: brote c/ β -mercaptoetanol, Carril 3: hoja s/ β -mercaptoetanol. Carril 4: hoja c/ β -mercaptoetanol, Carril 5: corteza sin piel s/ β -mercaptoetanol, Carril 6: corteza sin piel c/ β -mercaptoetanol, Carril 7: corteza con piel s/ β -mercaptoetanol, Carril 8: corteza con piel c/ β -mercaptoetanol, M: Hyperladder 50 pb.

Para corroborar la extracción de ARN en los distintos tejidos se realizó en todos los casos un control interno específico para papa.

En la **Figura 4.5** se observa la amplificación del control interno, gen *ef1* de aproximadamente 101 pb, para la extracción que se realizó

con el kit RNeasy Qiagen tanto en hojas como en brotes. Las amplificaciones que resultan con bandas de aproximadamente 500 pb podrían corresponder a la presencia de ADN genómico (ya que no se realizó tratamiento con DNasas). En tubérculo con y sin piel no se observó amplificación por debajo de los 100 pb. Para resolver mejor el tamaño de estas bandas en duda se dejó correr durante más tiempo la electroforesis luego de sacada la foto (no se muestran datos). Se asume por lo tanto que son *primers* formando dímeros. Los resultados obtenidos en corteza con y sin piel eran de esperarse ya que en la electroforesis al 1% para ver presencia de bandas que corresponden con el ARNr 18S y 28S, no se divisaron bandas, por lo tanto no hubo extracción de ARN para estos tejidos o la reacción se vio inhibida por contaminantes.

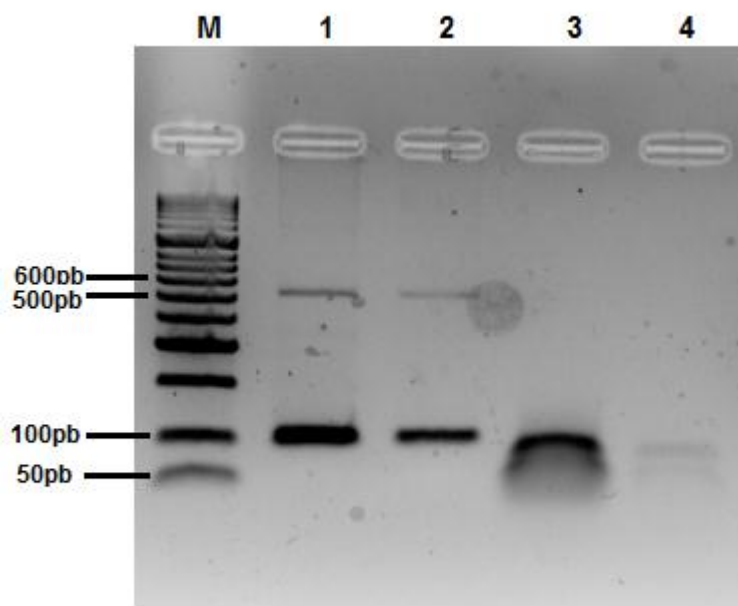


Figura 4.5 Visualización de productos de RT-PCR de papa. Control interno a partir de extracciones realizadas con Kit RNeasy Qiagen, en gel de agarosa al 2,5%. Carril 1: brote, Carril 2: hoja, Carril 3: corteza con piel, Carril 4: corteza sin piel, M: Hyperladder 50pb

Como se observa en la **Figura 4.6**, en la extracción usando el Método de Osmani y Rowhani con BE1, seguida de la extracción con buffer GES con y sin 1% de β -mercaptoetanol, tanto en hoja como en brotes amplificó el control interno para papa con una banda de aproximadamente 101 pb que corresponde con el gen *ef1*. Las bandas obtenidas con las extracciones realizadas con 1% de β -mercaptoetanol en brote, tienen intensidad mayor a las que no se le agregó el agente reductor, por lo que se puede suponer que el β -mercaptoetanol mejora la calidad y cantidad del ARN extraído en este tejido. Nuevamente al

igual que con el kit RNeasy Qiagen, en las muestras de tubérculo con y sin piel no se observó amplificación por lo tanto, se puede sugerir que no hubo extracción de ARN en esos tejidos con este buffer o que hubo un exceso de inhibidores de la PCR.

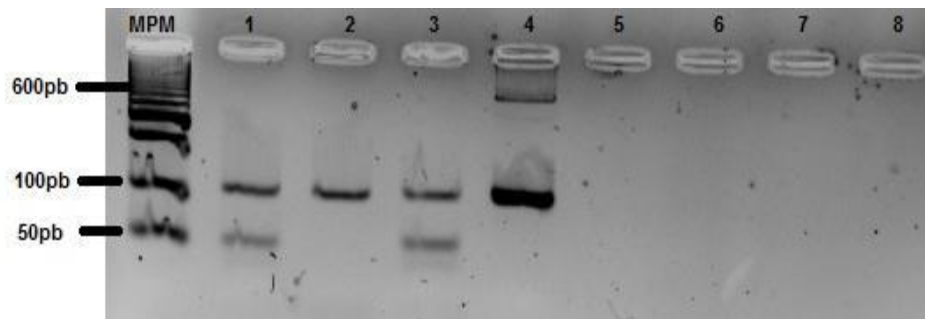


Figura 4.6 Visualización de productos de RT-PCR de papa. Control interno a partir de extracciones realizadas con el Método de Osmani y Rowhani, en gel de agarosa al 2,5% a partir de extracciones con BE1. Carril 1: hoja s/ β -mercaptoetanol. Carril 2: hoja c/ β -mercaptoetanol. Carril 3: brote s/ β -mercaptoetanol. Carril 4: brote c/ β -mercaptoetanol, Carril 5: corteza sin piel s/ β -mercaptoetanol. Carril 6: corteza sin piel c/ β -mercaptoetanol. Carril 7: corteza con piel s/ β -mercaptoetanol. Carril 8: corteza con piel c/ β -mercaptoetanol, MPM: Hyperladder 50 pb.

4.1.2.2 VID

En la **Figura 4.7 A** se observan los ensayos de RT-PCR realizados a partir de extracciones con el Método de Osmani y Rowhani con BE2 y posterior extracción con Buffer GES 1% β -mercaptoetanol. Se observaron bandas de aproximadamente 118 pb que corresponderían a la presencia del virus GFLV en los 3 tejidos

(floema, hoja y peciolo), tanto en las muestras de diciembre como de abril. En las muestras de hoja y peciolo se obtuvieron las bandas más intensas, con esto se podría suponer que BE2 es más efectivo para la extracción de ARN de estos tejidos que de floema para la posterior RT-PCR.

En la **Figura 4.7 B** se observa la detección de GFLV por RT-PCR en los tres tejidos a partir de extracciones con el Método de Osmani y Rowhani con BE3 y posterior extracción con Buffer GES 1% β -mercaptoetanol. Se obtuvo la amplificación de la banda de aproximadamente 118 pb, tanto en hoja, peciolo como en floema.

A su vez, se observó que con los dos buffers de extracción se detectó el virus en todos los tejidos y en los dos momentos de muestreo. Estos resultados permitirían evitar falsos negativos, ya que se ha descrito que el virus tiene variaciones dependiendo de la época de crecimiento, la estación y factores ambientales (Rowhani et al., 1992, Osman et al., 2012).

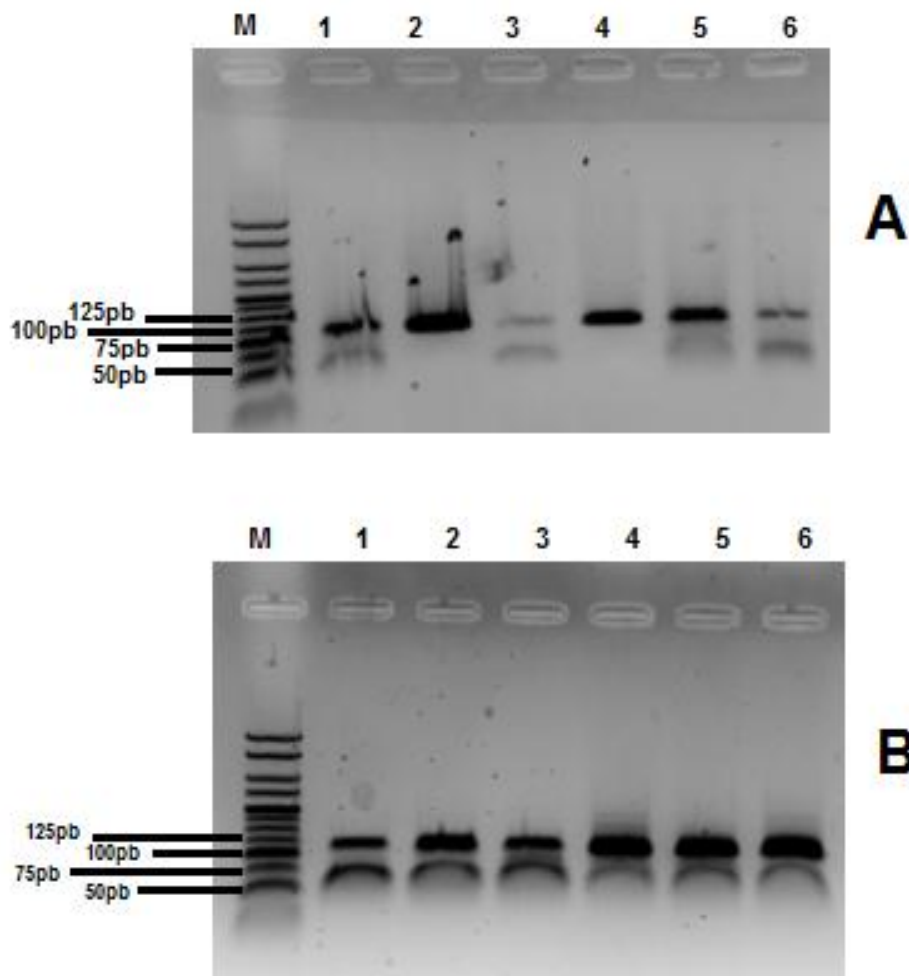


Figura 4.7 Productos de RT-PCR de vid infectada con GLV extraídas con el Método Osmani y Rowhani. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% a partir de extracciones con BE2 (A) y BE3 (B).A: Carriles 1 al 3: tejidos recolectados en diciembre, Hoja, Peciolo, Floema, respectivamente. Carriles 4 al 6: tejidos recolectados en Abril, Hoja, Peciolo, Floema, respectivamente. B: Carriles 1 al 3: tejidos recolectados en Diciembre. Hoja, Peciolo, Floema, respectivamente. Carriles 4 al 6: tejidos recolectados en abril, Hoja, Peciolo, Floema, respectivamente. M: Hyperladder 25pb.

Cuando se partió de los extractos obtenidos con BE3, las intensidades de las bandas fueron similares entre los tres tejidos, en las dos épocas del año (diciembre y abril), lo cual es una diferencia con las extracciones realizadas con BE2. Esto se podría deber a que

existen diferencias entre los componentes del buffer que podrían afectar el rendimiento, integridad y calidad del ARN extraído.

En el caso del virus GLRaV-3, como se ve en la **Figura 4.8**, los análisis de RT-PCR realizados a partir de extracciones con BE2 (**Figura 4.8 A**) y con BE3 (**Figura 4.8 B**) y posterior extracción con buffer GES 1% β -mercaptoetanol dieron como resultado, en el caso de las realizadas con BE2, amplicones del tamaño esperado de aproximadamente 546 pb en las muestras de hojas, peciolo y floema del mes de diciembre. Mientras que en el mes de abril solo se observó la amplificación de aproximadamente 546 pb en peciolo y floema, siendo la banda de floema la de menor intensidad nuevamente. Para el caso de la extracción realizada con BE3 se observó que en hojas, peciolo y floema se ve la amplificación de 546 pb correspondiente al virus en la poda de diciembre, mientras que solo se ve en floema y peciolo en el mes de abril.

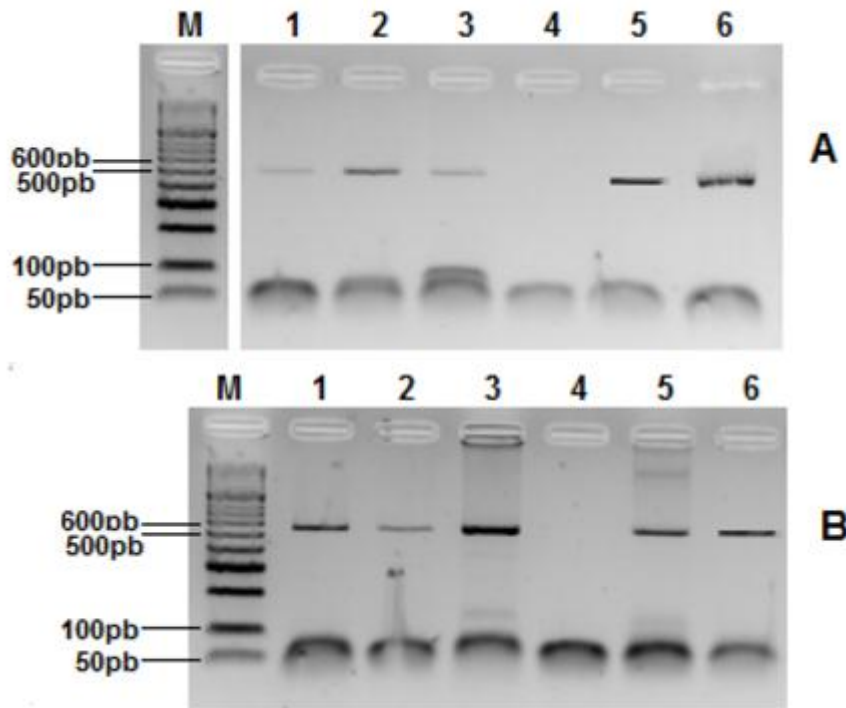


Figura 4.8 Productos de RT-PCR de vid infectada con GLRaV-3 extraídas con el Método Osmani y Rowhani. Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% a partir de extracciones con BE2 (A) y BE3 (B). A: Carriles 1 al 3: tejidos recolectados en diciembre, Hoja, Peciolo y Floema, respectivamente. Carriles 4 al 6: tejidos recolectados en Abril, Hoja, Peciolo y Floema, respectivamente. B: Carriles 1 al 3: tejidos recolectados en Diciembre. Hoja, Peciolo y Floema, respectivamente. Carriles 4 al 6: tejidos recolectados en abril, Hoja, Peciolo, y Floema, respectivamente. M: Hyperladder 50pb.

Se puede observar que en abril no se detectó en hojas el virus GLRAV-3, esto concuerda con estudios previos (Ling et al.; 2001; Tsai et al, 2011; Xu et al., 2012) en donde se determinó que en otoño e invierno el título del virus baja en el tejido foliar, manteniéndose en el floema, mientras que en período de crecimiento de la vid (primavera)

se comienza a acumular en la hoja a medida que avanza la temporada, de ahí que en diciembre sí es detectable en este tejido.

Otro punto a tener en cuenta es que se repite, al igual que con el virus GFLV, que las bandas obtenidas en el BE2 en floema son menos intensa que las obtenidas con el BE3. Esto se puede deber a como ya se comentó previamente, que existen diferencias entre los componentes y pH de los buffers que podrían afectar el rendimiento, integridad y calidad del ARN extraído en este tejido.

Para corroborar nuevamente las condiciones de la RT-PCR se realizó un control interno específico para *vid* con los cebadores MDH.H968 y MDH.C1163.

Como muestra la **Figura 4.9 A** para las muestras extraídas en BE2 se observa una buena amplificación del amplicón de aproximadamente 196 pb tanto en peciolo como en hoja, pero no se observó amplificación en floema, con lo que se puede inferir nuevamente que no se da una buena extracción de ARN con este buffer en este tejido.

En la **Figura 4.9 B** se observa la RT-PCR con las muestras extraídas a partir de BE3, en donde tanto en peciolo, hoja como en floema se amplificó el amplicón de aproximadamente 196 pb. Además

en hoja amplificaron bandas de 600 y 700 pb, mientras que en peciolo y floema amplificaron bandas de aproximadamente 350, 450, 600 y 700 pb correspondiente según la bibliografía con la presencia de ADN contaminante (Nassuth et al., 2000).

Las diferencia en la amplificación del control interno entre los distintos tejidos, podría deberse a que como ya se ha dicho, la preparación de muestras de plantas leñosas, para las pruebas de PCR, son difíciles debido a la presencia de inhibidores, tales como compuestos fenólicos, polisacáridos y otros componentes que inhiben las actividades de las enzimas utilizadas en PCR o que degradan el ARN (Salzmann et al., 1999).

Por otra parte se puede sugerir que el ARN mensajero de la MDH, en floema, extraído con BE2, es degradado, pero no el del virus que al estar envuelto por proteínas CP, no se ve afectado, y al agregar el buffer GES y liberar el ARN viral, los mismos componentes de este buffer como el β -mercaptoetanol pueden impedir la degradación, ya que este actúa como antioxidante (MacKenzie et al., 1997).

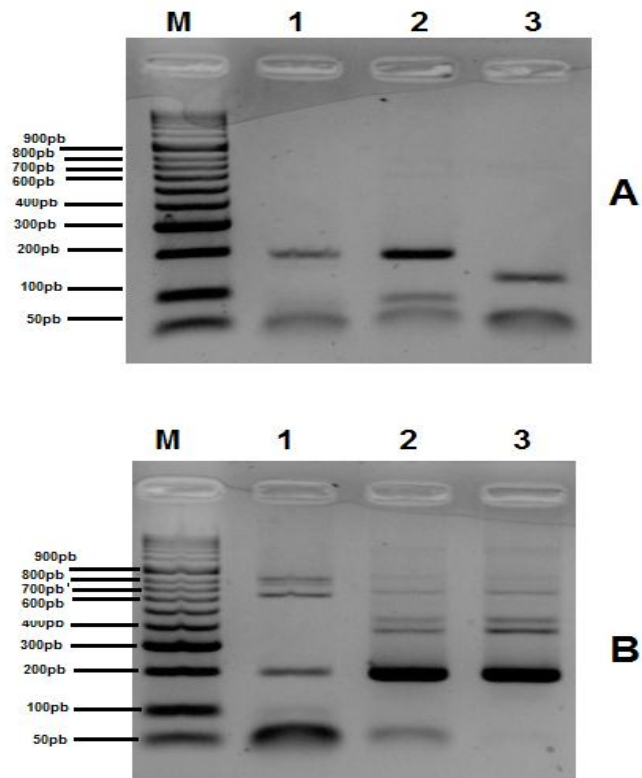


Figura 4.9. Visualización de productos de RT-PCR de vid. Control interno, a partir de extracciones realizadas con el Método de Osmann y Rowhani con BE2 (A) y BE3 (B), en gel de agarosa al 2,5%. A: Carril 1 al 3 hoja, peciolo, floema, respectivamente. B: Carril 1 al 3: hoja, peciolo, floema, respectivamente. M: Hyperladder 50pb.

Los resultados obtenidos en cada tejido, y época de recolección se resumen en la **Tabla 4.1**

Tabla 4.1 Resumen de resultados en vid para la detección de GLRaV.3 y GFLV

		GLRaV-3		GFLV	
		Primavera	Otoño	Primavera	Otoño
BE.2	Floema	+	+	+	+
	Pecíolo	+	+	+	+
	Hoja	+	-	+	+
BE3	Floema	+	+	+	+
	Pecíolo	+	+	+	+
	Hoja	+	-	+	+

4.2 DETERMINACIÓN DE LÍMITE DE DETECCIÓN

Para determinar el límite de detección en vid y papa se realizaron diluciones (con extracciones de plantas sanas) de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en la primera extracción con buffer de extracción. Se consideró como el límite de detección la menor dilución que resultó positiva de todas las muestras evaluadas para cada virus.

En la **Figura 4.10** se puede ver la sensibilidad de la técnica de RT-PCR en papa, tanto con las extracciones realizadas con el kit RNeasy Qiagen como con el Método de Osman y Rowhani con el BE1

y buffer GES con 1% β -mercaptoetanol. Las diluciones se realizaron a partir de las hojas de papa que son el material vegetal que se utiliza de rutina en el Programa de Certificación de esta especie.

En la **Figura 4.10 A** se puede ver que con el kit RNeasy Qiagen se obtuvo un límite de detección de 10^{-4} . Por otro lado, a partir de las extracciones realizadas con el Método de Osman y Rowhani se obtuvo una menor sensibilidad llegando a una dilución de 10^{-3} .

En cuanto a los virus de vid se realizaron diluciones al igual que en papa. Se utilizaron las muestras con la que se obtuvo mayor Índice Kappa (ver punto 4.4) de cada buffer de extracción en la que se detectaron los dos virus a la vez. Con BE2 y BE3 se eligió floema en diciembre.

Como se puede observar en la **Figura 4.11 A y Figura 4.11 B** en la RT-PCR para la extracción con BE2 y BE3, respectivamente, a partir de floema recolectado en diciembre, se obtuvo en ambos casos un límite de detección de 10^{-3} para el virus GFLV.

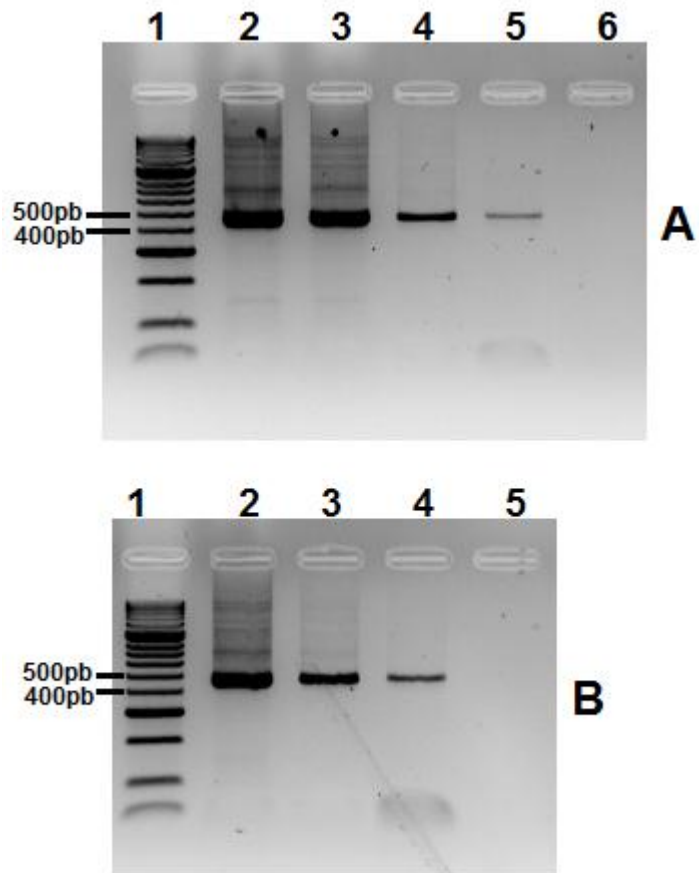


Figura 4.10. Límite de detección para el virus PVY en papa a partir de hoja.
 A Amplificación a partir de extracción realizada con kit RNeasy Qiagen. Carriles 2 al 6: diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . respectivamente. B: Amplificación a partir de extracción realizada con método de Osmani y Rowhani con BE1. Carriles 2 al 5: diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Respectivamente. M: Hyperladder 25 pb.

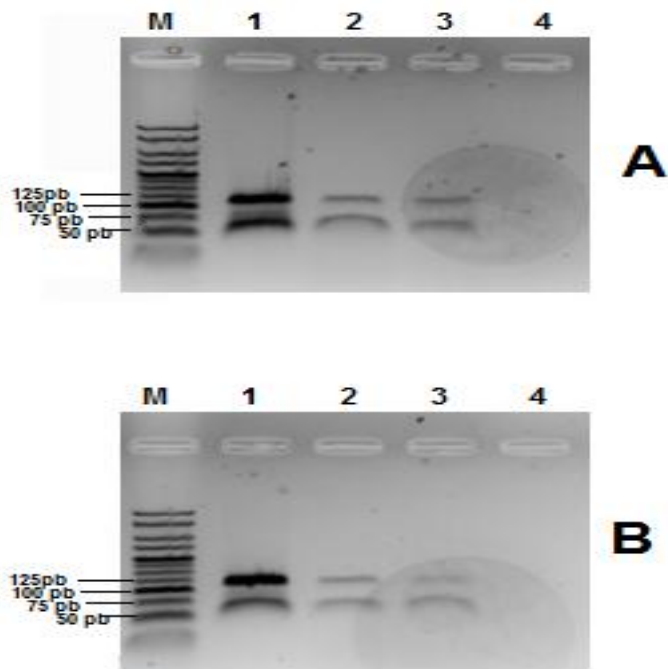


Figura 4.11. Límite de detección para el virus GLRV en vid a partir de floema muestreado en diciembre. A: Amplificación a partir de extracción realizada con Método de Osmann y Rowhani con BE2. Carriles 1 al 5 diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , respectivamente. B: Amplificación a partir de extracción realizada con Método de Osmann y Rowhani con BE3. Carriles 1 al 5: diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , respectivamente. M: Hyperladder 25pb

En cuanto al virus GLRaV-3, en la **Figura 4.12 A** se observa que en floema de diciembre con BE3, se obtuvo un límite de detección de 10^{-3} , y en la **Figura 4.12 B**, en floema de diciembre con BE2, el límite de detección fue de 10^{-2} .

Esta diferencia de sensibilidad entre las muestras se podría deber a, como se dijo anteriormente, el BE3 puede ser un mejor buffer para la extracción de ARN en un tejido como el floema.

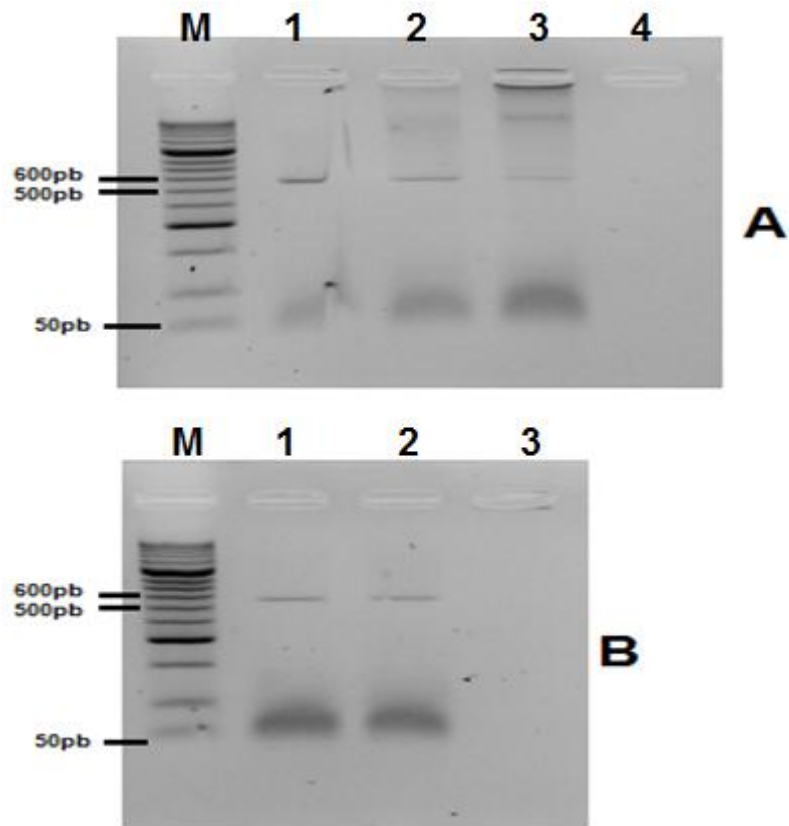


Figura 4.12 Limite de detección para el virus GLRaV-3 en vid a partir de floema muestreado en diciembre. **A:** Amplificación a partir de extracción realizada con Método de Osmann y Rowhani con BE3. Carriles 1 al 4 diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , respectivamente. **B:** Amplificación a partir de extracción realizada con Método de Osmann y Rowhani con BE2. Carriles 1 al 3: diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , respectivamente. M: Hyperladder 50pb.

4.3 ANÁLISIS SEROLÓGICO

Se realizó el análisis de todas las muestras, partiendo de las mismas extracciones utilizadas para los RT-PCR.

Luego del análisis de los datos (ver Anexo, Análisis de datos) para el virus PVY, el *cut off* obtenido para las muestras de papa fue de 0,179. En el **Gráfico 4.1** se puede ver que las muestras de brote extraídas con BE1 presentan un resultado positivo mientras que las extraídas con BE3 negativas. Las muestras de hoja extraídas con BE2 también presentan un resultado positivo mientras que las con BE3 resultaron negativas. En el caso de la corteza de tubérculo con piel y sin piel no se observa detección del virus con ninguno de los dos buffers de extracción.

El BE2 es el buffer de extracción sugerido por Bioreba (proveedor de los reactivos) para realizar el DAS-ELISA con los anticuerpos que la empresa provee, por lo tanto, como era esperado los resultados fueron positivos. Sin embargo, el BE3 resultó no ser apropiado para la detección de PVY, como se explicó antes puede deberse que el pH de la solución no sea el apropiado o que los componentes no permitan la correcta sensibilización del virus en la placa.

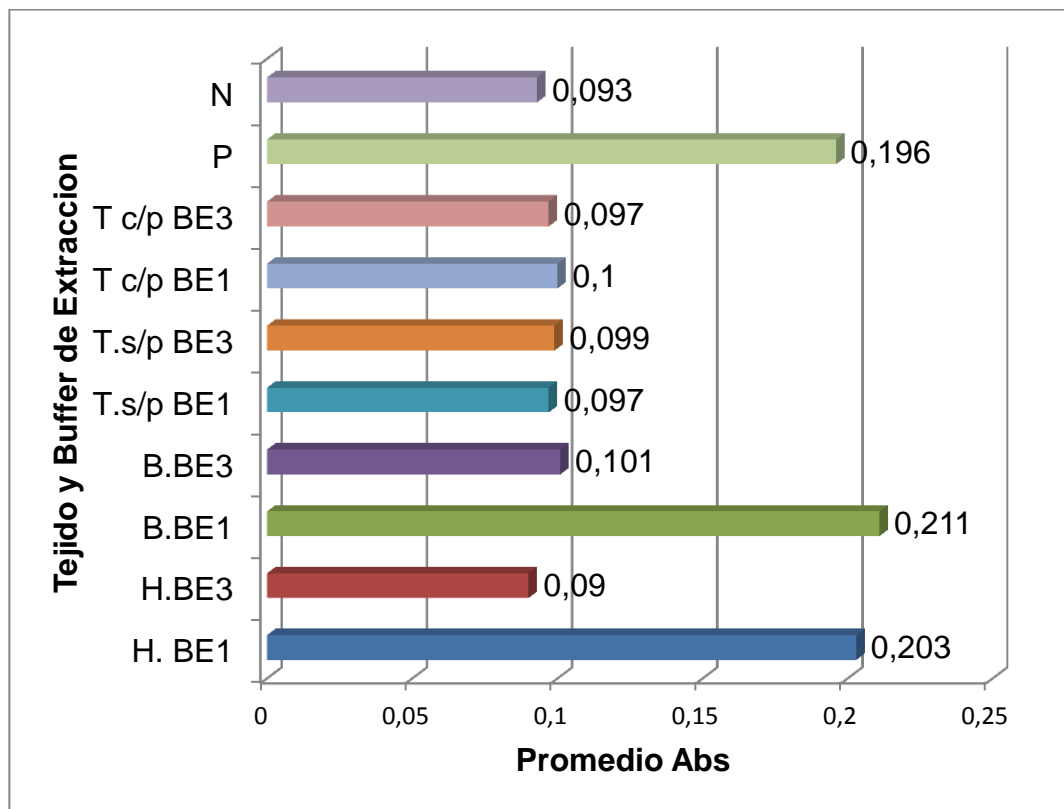


Grafico 4.1 Detección de PVY en papa mediante DAS-ELISA. Valores promedio de Absorbancia para cada tejido y buffer de extracción utilizado. H: hoja, B: brote, T.s/p: corteza de tubérculo sin piel, T.c/p: corteza de tubérculo con piel, N: control negativo, P: control positivo.

El límite de detección para cada una de las muestras positivas se llevó a cabo haciendo diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} con muestras negativas. El resultado arrojado es que tanto en brotes como en hojas el límite de detección fue de 10^{-1} .

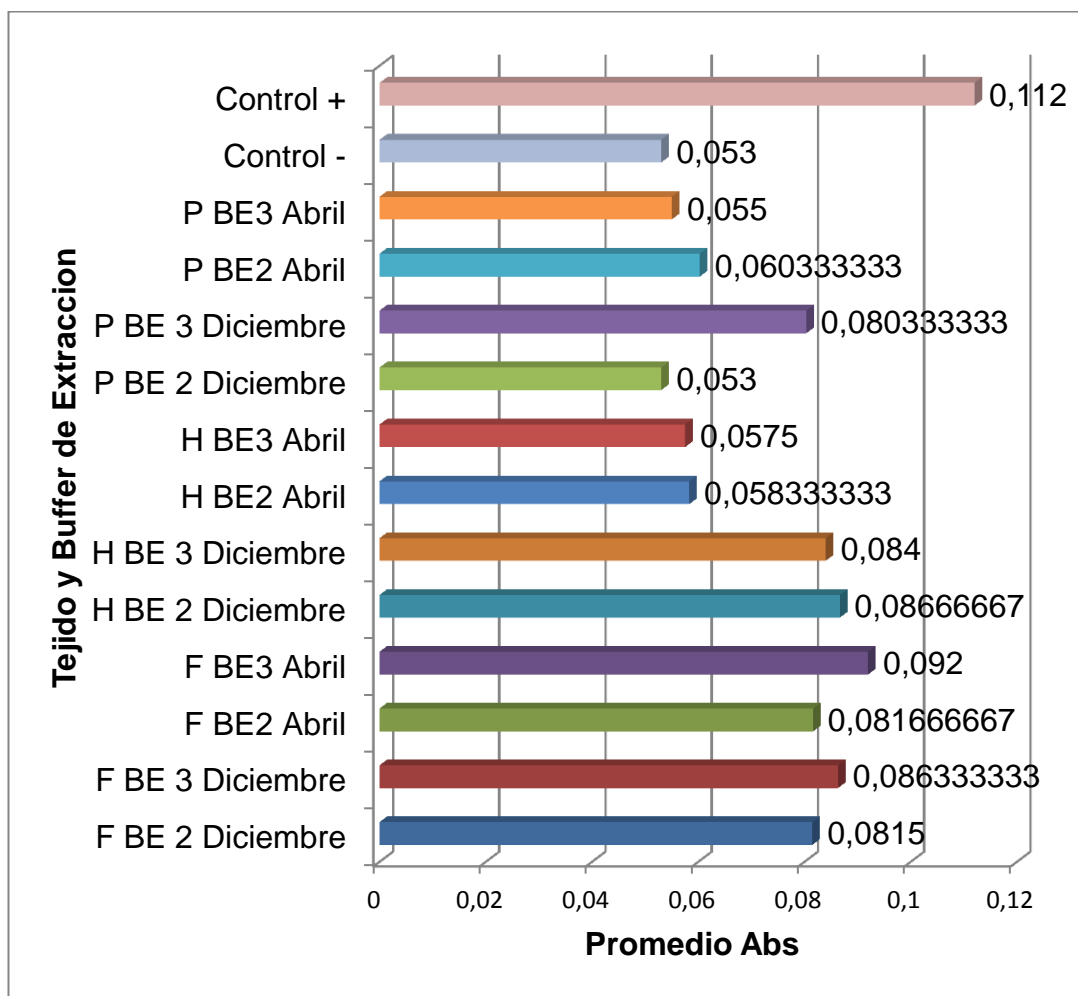


Grafico 4.2 Detección de GFLV en vid mediante DAS-ELISA. Valores promedio de Absorbancia para cada tejido y buffer de extracción utilizado. H: hoja, F: floema, P: peciolo.

En las muestras de vid, para el virus GFLV el análisis de los datos presenta un *cut off* de 0,078. Como se puede observar en el **Grafico 4.2**, las muestras de diciembre se obtuvieron resultados positivos tanto en el floema y hoja con los dos buffer de extracción y en peciolo con el

BE3. En abril, para el virus GFLV, se obtuvo un resultado positivo únicamente en la muestra de floema con el BE3.

En diciembre resultan negativas únicamente las muestras de peciolo extraído con BE2. A partir de las muestras de abril, las extracciones de hoja y peciolo con ambos buffers resultaron negativas, mientras que en floema únicamente resultan negativas las extracciones con BE2.

La detección observada por DAS-ELISA del virus GFLV en hoja y floema con ambos buffers de extracción en diciembre es coherente con estudios ya realizados, en donde indican que el título viral en estos tejidos aumenta durante 60 días luego de la brotación (primavera) y disminuye cerca del otoño (Bouyahia et al. 2003, Osman et al., 2012, Walter et al., 1993). La detección en peciolo únicamente con BE3 en diciembre puede indicar que este buffer es mejor para la extracción de las partículas virales o para inhibir los contaminantes en este tejido, que el BE2.

Para determinar el límite de detección del método, para cada una de las muestras positivas, se llevó a cabo haciendo diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Los resultados arrojados para GFLV en diciembre fueron que las muestras extraídas de floema y hoja con BE3 y BE2, fue

con las que se obtuvo mayor sensibilidad llegando al 10^{-1} , mientras que con las muestras de peciolo con BE3 se obtuvo un resultado negativo en la primera dilución. En abril, en la muestra de floema con BE3 se obtuvo también un resultado negativo en la primera dilución.

Para GLRaV-3 se determinó un *cut off* de 0,101 para las muestras analizadas. Se puede ver en el **Gráfico 5.3** que las muestras de diciembre se observa únicamente detección en floema extraído en BE3. Mientras que en abril se observa que las muestras extraídas de floema con los 2 buffers de extracción resultan positivas.

Las muestras de hoja y peciolo de diciembre y abril, extraídas con ambos buffers, se observa un resultado negativo, al igual que para floema con BE2 en diciembre.

El virus GLRAV-3 es un virus que está limitado al floema, y se ha reportado que los mayores títulos en este tejido se dan a finales del periodo de crecimiento (finales de verano, principio de otoño) (Osman et al., 2012, Tsai et al., 2012), por lo tanto es coherente que se detecte este virus en el floema de diciembre por DAS-ELISA. En cuanto a los otros tejidos (hoja y peciolo), puede ser que el título del virus sea bajo en los periodos muestreados, por lo que no es detectable por esta técnica serológica,

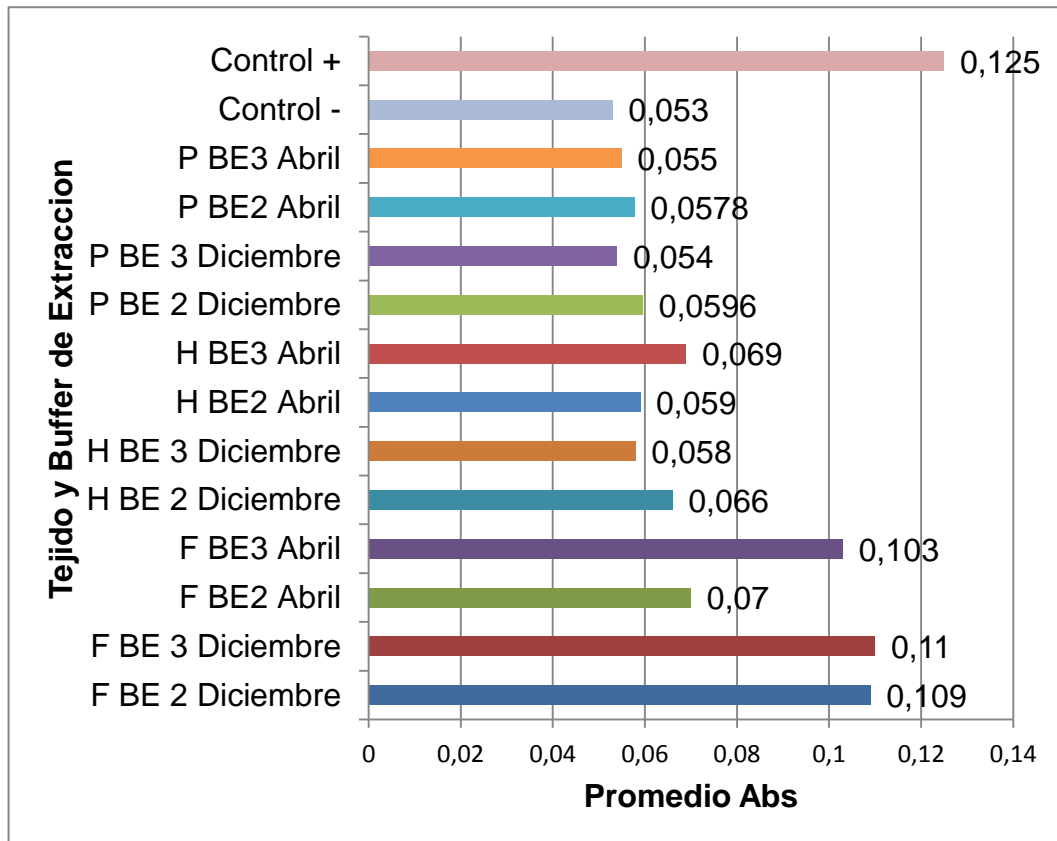


Grafico 4.3 Detección de GLRaV-3 en vid mediante DAS-ELISA. Valores promedio de Absorbancia para cada tejido y Buffer de Extracción utilizado. H: hoja, F: floema, P: peciolo.

Para GLRaV-3 en diciembre, la muestra de floema con BE2 mostró un límite de detección de 10^{-1} , mientras que las muestras extraídas en abril de floema con BE2 dieron negativas a la primera dilución. Las extraídas con BE3 dan como límite de detección 10^{-1} tanto en diciembre como en abril.

4.4 COMPARACIÓN DE AMBOS MÉTODOS MEDIANTE TEST KAPPA DE COHEN

Al comparar dos técnicas, es habitual que algunas de las coincidencias pueden ser debidas al azar. El método más utilizado para medir la coincidencia entre dos técnicas de diagnóstico dicotómicas es el índice Kappa de Cohen (Cohen, 1960). Dicho índice mide las coincidencias entre ambas técnicas no producidas por el mero azar, es decir las coincidencias más allá del azar (Abraira, 2001). El nivel de concordancia se realizó en base a lo establecido por Landis y Koch, 1977.

Como se puede ver en la **Tabla 4.2** para el virus PVY el índice Kappa de Cohen tanto para las muestras de brote y hoja analizadas a partir de extracciones con el Kit RNeasy de Qiagen y el Método de Osmani y Rowhani es 1, lo que indica una concordancia con respecto a los resultados obtenidos, entre la técnica de referencia DAS-ELISA (EPPO, 2015) y RT-PCR. Estos resultados indican que la técnica molecular ensayada es adecuada como método de diagnóstico de PVY sin importar el método de extracción de material genético utilizado.

Tabla 4.2 Concordancia entre las dos pruebas de diagnóstico medidas mediante el índice Kappa de Cohen, según el caso en los diferentes tejidos, y método de extracción para el virus PVY en papa

		ELISA			
		Tejido	Po	Pe	K
RT-PCR	RNeasy Kit	Brote	1	0,2	1
	RNeasy Qiagen	Hoja	1	0,2	1
	Buffer 1	Brote	1	0,2	1
		Hoja	1	0,2	1

En la **Tabla 4.3**, se muestra la comparación entre las técnicas DAS-ELISA y RT-PCR para la detección de GFLV. Como se puede observar, el mayor índice Kappa lo presenta el BE3 tanto en diciembre como en abril con un nivel de concordancia casi perfecto con un k de 0,83, seguido de BE2 en floema en muestras de diciembre con una concordancia sustancial con un k de 0,73.

De todas las muestras analizadas, las que fueron extraídas con BE3 en diciembre son las que presentan mejores k, yendo de moderado a casi 100% su nivel de concordancia. En cambio, las

muestras de abril extraídas con BE2 son las que muestran índices Kappa con valores de 0,23 mostrando una concordancia justa.

Tabla 4.3 Concordancia entre las dos pruebas de diagnóstico medidas mediante el índice Kappa de Cohen, según el caso en los diferentes tejidos, buffer de extracción y fecha de muestreo para el virus GFLV en vid

		ELISA			
		Tejido	Po	Pe	K
RT-PCR	Buffer 3 Abril	Floema	0,92	0,14	0,91
		Hoja	0,35	0,14	0,25
		Peciolo	0,33	0,13	0,23
	Buffer 2 Abril	Floema	0,33	0,13	0,23
		Hoja	0,33	0,13	0,23
		Peciolo	0,33	0,13	0,23
	Buffer 3 Diciembre	Floema	0,85	0,14	0,83
		Hoja	0,69	0,15	0,63
		Peciolo	0,66	0,133	0,61
		Floema	0,8	0,13	0,76
	Buffer 2 Diciembre	Hoja	0,69	0,15	0,63
		Peciolo	0,5	0,2	0,375

En la **Tabla 4.4** se muestra el grado de coincidencia entre las técnicas de DAS-ELISA y RT-PCR para detectar el virus GLRaV-3. En

general los índices Kappa son más bajos que con GFLV, siendo la extracción con BE3 en abril la que tiene el mayor índice Kappa con 0,91 y un nivel de concordancia casi del 100%. Todas las extracciones de floema tienen un índice Kappa entre 0,76 y 0,91 (entre sustancial y casi perfecto). Las demás extracciones con ambos buffers en hoja y peciolo varían entre 0,23 y 0,40 con una concordancia justa.

Tabla 4.4 Coincidencia entre las dos pruebas de diagnóstico medidas mediante el índice Kappa de Cohen, según el caso en los diferentes tejidos, Buffer de Extracción y fecha de muestreo para el virus GLRaV-3 en vid

		ELISA			
		Tejido	Po	Pe	K
RT-PCR	Buffer 3 Abril	Floema	0,92	0,14	0,91
		Hoja	0,5	0,2	0,375
		Peciolo	0,33	0,13	0,23
	Buffer 2 Abril	Floema	0,77	0,11	0,75
		Hoja	0,5	0,2	0,375
		Peciolo	0,45	0,18	0,33
	Buffer 3 Diciembre	Floema	0,9	0,2	0,875
		Hoja	0,46	0,15	0,36
		Peciolo	0,33	0,13	0,23
		Floema	0,9	0,2	0,875
	Buffer 2 Diciembre	Hoja	0,4	0,2	0,25
		Peciolo	0,5	0,16	0,4

4.5 ANÁLISIS DE COSTOS

El análisis de costos se realizó en base a los costos directos de INASE (proveedores y mano de obra) y se pueden ver en la **Tabla 4.5**

Tabla 4.5 Comparación de las diferentes técnicas de detección de virus utilizadas en esta tesis

	Costo Estimado por muestra (U\$S)	Requerimiento de Equipo	Requerimiento de Recursos Humanos especializado	Requerimiento de Infraestructura	Tiempo insumido
ELISA	1-2	Moderado	Bajo	Bajo	3 días
RT-PCR con kit comercial	50	Alto	Moderado	Moderado	7 hrs
RT-PCR con Buffer de Extracción	27-28	Alto	Moderado	Moderado	6 hrs

El análisis comparativo de la relación costo-beneficio entre las pruebas ensayadas, indicó que el método con menores requerimientos en equipos, personal e infraestructura es el DAS-ELISA. Considerando los bajos requerimientos de la técnica, sumado a su relativamente alta sensibilidad y bajo costo, podría sugerirse su uso como prueba de rutina, además de presentar la posibilidad de automatización simplificando su ejecución y permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras en cortos periodos de tiempo. El RT-PCR con

buffers de extracción resultaría, a pesar de su relativamente alto costo unitario, ideal por su eficiencia y por su mayor límite de detección, ya que es 14 veces más caro que el ELISA pero a su vez, entre 10 (vid) y 100 (papa) veces más sensible en el peor de los casos, ofreciendo así ventajas para detectar virus en material de propagación vegetativa que hoy en día se toma como negativo. Además de obtenerse el resultado en el día, tiene la posibilidad de automatización al igual que la técnica de ELISA (ya que el primer paso de extracción es similar al realizado en la técnica de ELISA). Adicionalmente, esta técnica podría eliminar la subjetividad característica de la mayoría de las pruebas serológicas, ya que la interpretación de resultados se da por la presencia o ausencia de una banda de tamaño esperado.

La prueba diagnóstica con mayores requerimientos en equipos, personal e infraestructura fue la técnica RT-PCR tanto con kit como con buffers, esto limita su uso a laboratorios debidamente equipados, requiriendo para su ejecución técnicos capacitados.

5 CONCLUSIONES

Este trabajo tuvo tres grandes objetivos. Por un lado, se pusieron a punto las técnicas para detectar el virus PVY en papa, y los virus GFLV y GLRaV-3 (simultáneamente) en vid, mediante técnicas moleculares. Por otro lado, se compararon dos métodos de extracción de ARN viral. Se evaluó el kit comercial Qiagen y el método de Osmani y Rowhani, intentando determinar qué método es más eficiente en cuanto a los resultados. Por último, se compararon resultados y costos de las técnicas de DAS-ELISA y RT-PCR.

En lo que respecta a las técnicas moleculares, se lograron optimizar las técnicas de detección por RT-PCR de PVY en papa, GFLV y GLRaV-3 en vid.

Entre los resultados más relevantes en papa se identificó que se puede detectar el virus tanto en brote como en hoja, con métodos de extracción comerciales (kit RNeasy Qiagen), así como también mediante el método de Osmani y Rowhani, utilizando buffers de extracción utilizados en la técnica de DAS-ELISA (BE1). El método de extracción con kit RNeasy Qiagen en hoja fue con el que se obtuvo el mayor límite de detección (10^{-4}). Además, se pudo concluir que los

métodos utilizados para la extracción de ARN no son los adecuados para utilizar en corteza de tubérculos con y sin piel, ya que no se logró amplificación ni del virus PVY ni del control interno.

Se pudo constatar que con el procedimiento dado por el fabricante del kit RNeasy Qiagen RNeasy no se pudo extraer ARN de la vid en ninguno de los tejidos evaluados. Mientras que la extracción con el método de Osmani y Rowhani, es simple y rápido, y puede ser usado para detectar GFLV y GLRaV-3 tanto en floema, hoja como en peciolo.

Se pudo determinar que el mejor procedimiento a seguir para la detección conjunta de GFLV y GLRaV-3 por RT-PCR, es mediante floema (*pool* de 5 sarmientos de toda la planta). El método de extracción de ARN sugerido es el de Osmani y Rowhani, realizando la extracción con BE3, ya que en ambos virus su límite de detección fue de 10^{-3} . Y el periodo de muestreo puede ser tanto diciembre como abril ya que en ambos periodos se obtiene un índice Kappa con una coincidencia casi perfecta entre RT-PCR y DAS-ELISA.

También se puede sugerir que el GLRaV-3 no se distribuye homogéneamente en la planta durante los cambios de estación, ya que no se puede detectar en todos los tejidos a la vez, haciendo que su

capacidad de detección no constante en el tiempo, dependiendo del momento del año en que se haga el muestreo.

El análisis general para los tres virus refleja que existe un mayor límite de detección (10^{-3} en vid y 10^{-4} en papa) cuando se utiliza la técnica de RT-PCR que cuando se usa ELISA (10^{-1}) tanto en vid como en papa. Esto significa que aunque el virus se encuentre en bajas concentraciones en la planta, el método de RT-PCR permite detectar muy bajas concentraciones virales y amplificarlo exponencialmente.

En cuanto a costos, se pudo observar que la técnica de DAS-ELISA es la menos costosa en términos absolutos, mientras que la técnica de RT-PCR basada en el método de Osmani y Rowhani es más costosa que DAS-ELISA (14 veces) pero 100 veces más sensible en floema extraído en diciembre de vid para GLRAV-3 y GFLV, y 100 veces más sensible para PVY en hoja de papa.

La técnica de RT-PCR con kit de extracción comercial no sería viable en cuanto a costos, en el caso de vid, ya que se precificaría de un paso previo (MacKenzie et al., 1997) aumentando más aun el costo unitario.

Para papa, el RT-PCR a partir de extracciones con kit RNeasy Qiagen es el que tiene una mayor sensibilidad (10^{-4}) pero es 25 veces más costosa que DAS-ELISA. Mientras que el RT-PCR, partiendo de muestras extraídas con BE1 (Método Osmani y Rowhani) resulta únicamente 14 veces más caro que el DAS-ELISA y 100 veces más sensible. Por esto, como sugerencia, se puede decir que la técnica de RT-PCR puede ser particularmente útil para el *screening* de semillas nuclear o pre-nuclear de papa, en los Programas de Certificación nacional o regional, donde hay tolerancia cero para la infección por virus PVY, ya que disminuye los falsos negativos por su mayor límite de detección en comparación con DAS-ELISA.

6 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo servirán de base al programa de Certificación de MPV que se lleva a cabo en INASE para mejorar el servicio que se brinda a los productores.

Como perspectivas a futuro se puede plantear la comparación de resultados entre las técnicas de DAS-ELISA y RT-PCR para otros virus del Programa de Certificación, además de comparar otros métodos de extracción de ARN.

Se puede continuar con el ajuste de las técnicas de RT-PCR para la detección en conjunto (RT-PCR Multiplex) de todos los virus existentes en el EE de un mismo cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Abraira, V. (2001) El índice kappa. **Semergen**, 27, p.247-249.
- Agranovsky A. A.; Koonin E. V.; Boyko V. P.; Maiss E.; Frötschl R.; Lunina N. A. (1994) Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. **Virology** 198, p.311–324
- Agranovsky A. A.; Lesemann D. E.; Maiss E.; Hull R.; Atabekov J. G. (1995) “Rattlesnake” structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, 92, p.2470–2473
- Agrios G.N. (2002) **Fitopatología**. 2da Edicion. Mexico, Editorial UTEHA.
- Alfaro, A. & Goheen, A.C. (1974) Transmission of strains of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index*. **Plant Dis. Rep**, 58, p.549-552.
- Alonso, F. (2002) **El cultivo de la patata**. 2nd ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.
- Alzhanova D. V.; Hagiwara Y.; Peremyslov V. V.; Dolja V. V. (2000) Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. **Virology**, 268, p.192–200
- Alzhanova D. V.; Prokhnevsky A. I.; Peremyslov V. V.; Dolja V. V. (2007) Virion tails of Beet yellows virus: Coordinated assembly by three structural proteins. **Virology**, 359, p.220–226
- Andret-Link P.; Schmitt-Keichinger C.; Demangeat G.; Komar V.; Fuchs M. (2004) The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. **Virology**, 320, p.12-22.
- Andret-Link, P.; Laporte, C.; Valat, L.; Ritzenthaler, C.; Demangeat, G.; Vigne, E.; Laval, V.; Pfeiffer, P.; Stussi-Garaud, C. & Fuchs, M. (2004) Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. **J. Plant. Pathol**, 86, p.183-195.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012) Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. **Electrophoresis**, 33(2), p.366–369
- Arauz Cavallini, L.F. (1998) **Fitopatología; un enfoque agroecológico**. Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Arias M, López-Pérez A, Fresno J. (2003) Nematodos, virosis y manejo de los viñedos españoles. **Terralia**, 31, p.68-75.
- ARIAS, M.; BELLO, A.; PEREZ-REBOLLO, B. (1990) Nematodos fitoparásitos. **Phytoma España**, 19, p.41-50.

Astier, S.; Albouy, J.; Maury, Y.; Robaglia, C.; Lecoq, H. (2007) **Principles of Plant Virology. Genome, Pathogenicity, Virus Ecology.** Enfield, NH, USA , Science Publishers.

Babini, A.R.; Credi, R.; Giunchedi, L.; and Canova, A. (1981) Effetto di infezioni virali su alcuni portainnesti della vite (Effect of virus infections on some grapevine rootstocks). En: **3° Simposio Internazionale sulla Selezione Clonale della Vite, Junio 1981, Venezia.** Venecia, p.310-318.

Baldacci E, Belli G, Betto E, Refatti E. (1962) Further researches on test plants (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa*) for the diagnosis of viruses in clones, degenerated or selected on symptomatological criteria. **Ann Fac. Agrar**, 10, p.10.

Barbara, D. J. y Clark, M. F. (1982). A simple indirect ELISA using F(ab') fragments of immunoglobulin. **Journal of General Virology**, 58, p.315.

Bar-Joseph, M. y Malkinson M. (1980) Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A comparison of two plant viruses. **Journal of Virological Methods** 1, p.179.

Barrass, I. C.; Jerie, P.; and Ward, S. A. (1994) Aerial dispersal of first- and second-instar long tailed mealybug, *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti) (Pseudococcidae: Hemiptera). **Austr. J. Exp. Agric.** 34, p.1205–1208

Belin C.; Schmitt C.; Gaire F.; Walter B.; Demangeat G.; Pinck L. (1999) The nine C-terminal residues of the grapevine fan- leaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. **Journal of General Virology**, 80, p.1347-1356

Benson, A. P.; W. J. Hooker. (1960) Isolation of virus X from "immune" varieties of potato: ***Solanum tuberosum*. Phytopathology**, 50, p.231–234

Bester R.; Maree H. J.; Burger J. T. (2012) Complete nucleotide sequence of a new strain of grapevine leafroll-associated virus 3 in South Africa. **Arch. Virol**, 157, p.1815–1819

Blanchard A, Rolland M, Delaunay A, Jacqout E (2008) An international organization to improve knowledge on Potato virus Y. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, 3, p.6–9

Blanco-Urgoiti, B.; M. Tribodet; S. Leclere; F. Ponz; C. Pérez de San Román; F. J. Legorburu; C. Kerlan. (1998) Characterization of Potato potyvirus Y (PVY) Isolates from Seed Potato Batches. Situation of the NTN, Wilga and Z Isolates. **European Journal of Plant Pathology**, 104, p.811-819.

Borja, M. J. y Ponz, F. (1992). Axi appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus. **Journal of Virological Methods**, 36, p.73-83.

Boscia D.; Savino V.; Elicio V.; Jebah S. D.; Martelli G. P.; 1991. Detection of closteroviruses in grapevine tissues. En: **Proceedings of**

the 10th Congress of ICVG, Setiembre, 1991, Volos, Grecia. Volos, ORES Publishing, p.52–57.

Bouyahia H.; Potere O.; Boscia D.; 2003. Sampling methodology for the detection of Grapevine fanleaf virus by ELISA. En: Extended Abstracts 14th Meeting of ICVG, Setiembre, 2003, Locorotondo, Italy. Locorotondo, **ICVG**, p.204-205.

Branas, J.; Bernon, G.; Levadoux, L.; 1938. Les maladies de dégénérescence de la vigne. Compte rendu. En: **Congrès Viticole de Mâcon, Enero, 1938, Paris, Francia.** Paris, Union Nat. Ingen. Agricoles, p.11-13.

BRANDT, S.; IBL, M.; HIMMLER, G. (1995) Coat protein gene sequence of an Austrian isolate of Grapevine fanleaf virus. **Archives of Virology**, 140 (1), p.157-164.

Brown, D.J.F.; Weischer, B. (1998) Specificity, exclusivity and complementarity in the transmission of plant-viruses by plant-parasitic. **Fundamental and Applied Nematology**, 21 (1), p.1-11.

Brown, D.J.K.; Robertson, W.M.; Trudgill, D.L. (1995) Transmission of viruses by plant nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, 33, p.223-249.

Brückbauer H.. Rüdell M. (1961) Untersuchungen über die Viruskrankheiten der Rebe. III. Samenübertragbarkeit der Reisingkrankheit des Silvaners bei einer Testpflanze sowie Untersuchungen über das evtl. Vorkommen des Virus in Weinbergsunkräutern. **Die Wein-Wissenschaft**, 16, p.187-189.

Brunt, H.A.; K. Crabtree, M.J. Dallawitz, A.J. Gibbs and L. Watson. (1996) **Viruses of plants.** Cambridge, UK , CAB International.

Burrows, M. and T. Zitter. (2005) **Virus Problems of Potatoes.** Ithaca, NY, USDA-ARS and Department of Plant Pathology Cornell University.

Burrows, M.E.; Zitter, T.A. (2005) **Virus Problems of Potatoes.** Ithaca, NY, USDA-ARS and Department of Plant Pathology, Cornell University.

C. Stange. (2006) Plant- virus interactions during the infective process. **Cien. Inv. Agr**, 33(1), p.1-18

Calò, A. (1988) Réaction physiologique de la vigne en présence de virus. (Physiological reaction of grapevine in the presence of viruses). **Riv. Vitic. Enol.** 41, p.317-323.

Cambra M, Boscia D, Gil M, Bertolini E & Olmos A. (2011) Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses. En: Hadidi, A.; Barba, M.; Candresse T.; Jelkmann W. **Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits**, St. Paul (US), APS Press, p.303–313.

Chellemi D.; O.; E. Funderburk J.; W. Hall D. (1994) Seasonal abundance of flowerinhabiting Frankliniella species on wild plant species. **Environment Entomology**, 23, p.337-342.

Chiba M.; Reed J. C.; Prokhnovsky A. I.; Chapman E. J.; Mawassi M.; Koonin E. V.; Carrington, J.C.; Dolja, V.V. (2006) Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. **Virology**, 346, p.7–14.

Chu, P. W. G.; Waterhouse, P.M.; Martin, R.R. y Gerlach, W.L. (1989) New approaches to the detection of microbial plant pathogens. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 7, p.45-110.

Clark, M. F.; Adams, A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, 34, p.475-483.

Clark, M.F.; Bar-Joseph, M. (1984) Enzyme immunosorbent assays in plant virology. **Methods in Virology** 7, p.51-85.

Claros, M.; Canovas, S. (1998) Rapid high quality RNA preparation from Pine seedlings. **Plant Molecular Biology Reporter**. 16, p.9-18.

Cohen, J. (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**, 20, p.37-46.

Cohn E.; Tanne E.; Nitzany F.E. (1970) Xiphinema italiae, a new vector of grape fanleaf virus. **Phytopathology**, 60, p.181-182

Collier, L.; Balows, A.; Sussman, M. (1998) **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. Vol 1, 9a ed. Londres,. Hodder Education Publishers.

Credi, R.; Santucci, A. (1991) Serological detection of leafroll-associated closterovirus-like particles: apparent absence of viral antigens in leaves. En: **Proceedings of the 10th Congress of ICVG, Setiembre, 1991, Volos, Grecia**. Volos, ORES Publishing, p.71–80

Crisci, C.; Vilaro, F. (1983) Virus y agentes relacionados en cultivos de papa del Uruguay. **Investigaciones Agronomicas**, 4(1), p. 59-61

Cruz, F.; Frías, T. (1997) **Guía ilustrada de la prueba de inmunoabsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos**. México. D.F, SAGARPA.

Daane, K. M.; Almeida, R. P. P.; Bell, V. A.; Botton, M.; Fallahzadeh, M.; Mani, M.; Miano, J. L.; Sforza, R.; Walton, V. M.; and Zaviezo, T. (2012) Biology and management of mealybugs in vineyards. En: N. J. Bostanian, R. Isaacs, and C. Vincent, eds. **Arthropod Management in Vineyards**. Dordrecht, Holanda, Springer, p.271-308

Daane, K. M.; Bentley, W. J.; Walton, V. M.; Malakar-Kuenen, R.; Yokota, G. Y.; Millar, J. G.; Ingels, C. A.; Weber, E. A.; and Gispert, C. (2006) Sustainable controls sought for the invasive vine mealybug. **Calif. Agric.** , 60, p.31-38

Dalla Rizza, M.; Vilaró, F.L.; Torres, D.G.; Maeso, D. (2006). Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the uruguayan breeding program. **American Journal of Potato Research**, 83(4), p.297-304.

Dias, H.F. (1963) Host range and properties of grapevine fanleaf and grapevine yellow mosaic viruses. **Ann. Appl. Biol.**, 51, p.85-95.

Dietzgen, R.G.; Xu, Z.; Teycheney, P. (1994) Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). **Plant Dis.**, 78, p.708-711.

Dodds, J. A. (1986). The potential for using double-stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. En: **Developments and applications in virus testing**. Jones, E. A. O.; Torrance, L., eds. Wellsbourne, Association of Applied Biologists. p.71-86.

Dodds, J. A.; Mons, T. J. y Jordan, R. L. (1984) Plant viral double-stranded RNA. **Annual Review of Phytopathology**, 22, p.151-168.

Dolja V. V.; Carrington J. C. (1992) Evolution of positive-strand RNA viruses. **Semin. Virol.**, 3, p.315–326

Dolja V. V.; Kreuze J. F.; Valkonen J. P. T. (2006) Comparative and functional genomics of closteroviruses. **Virus Res.**, 117, p.38–51.

Domier, L.L.; Shaw, J.G.; and Rhoads, R.E. (1987).Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. **Virology**, 158, p.20-27.

Douglas, N.; Krüger, K. (2008) Transmission efficiency of Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Eur. J. Plant Pathol.**, 122, p.207-212.

Duran Vila N.; Martelli G. (1992) Las enfermedades de la vid transmisibles por injerto: Una puesta al dia. Nepovirus. **Phytoma Espana**, 3, p.28–36.

Echer, M.; Costa, C. P. (2002) Reaction of sweet pepper to the potato virus Y (PVYn). **Scientia Agricol.**, 59, p.309-314.

Edwarson J.R. (1966) Electron microscopy of cytoplasmic inclusions of cells infected with rod shaped viruses. **Am. J. Bot.**, 53, p.359-364.

Fageria, M.; Nie, X.; Gallagher, A. Singh, M. (2015) Mechanical Transmission of Potato Virus Y (PVY) Through Seed Cutting and Plant Wounding. Am. J. Potato Res., 92, p.143.

Faoro, F.; and Carzaniga, R. (1995) Cytocchemistry and immunocytochemistry of the inclusion bodies induced by grapevine leafroll-associated closteroviruses GLRaV-1 and GLRaV-3. **J. Plant Pathol.**, 5, p.85–94.

Faoro, F.; Tornaghi, R.; Cinquanta, S.; and Belli, G. (1992) Cytopathology of leafroll-associated virus III (GLRaV-III). **J. Plant Pathol.**, 2, p.67–83.

Fei, F.; Lyu, M. D.; Li, J.; Fan, Z. F.; Cheng, Y. Q. (2013) Complete nucleotide sequence of a Chinese isolate of Grapevine leafroll-associated virus 3 reveals a 5' UTR of 802 nucleotides. **Virus Genes**, 46, p.182-185.

Fereres, A. 2000. Barrier crops as a cultural control measure of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. **Virus Res.**, 71, p.221-231.

Fresno Perez, J. (1992), **Correlacion Bioecologica entre nematodos transmisores de virus (Xiphinema spp.) y el virus de la degeneración infecciosa de la vid entrenudo corto (GFLV)**. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense Madrid

Fresno, J.; Pena-Iglesias, A.; Castro, S. and Rey, M. C. (1978) Ultraestructura de *Chenopodium quinoa* y *Cucumis sativus* infectados por el virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (FLV) con tratamiento previo para eliminar ribosomas. En: ICVG. **Proc. 6th meeting ICVG, 1976, Cordoba**. Madrid, Minist. Agric. Madrid, p.97-102.

Fuchs M.; Pinck M.; Serghini M.A.; Ravelonandro M.; Walter B.; Pinck L. (1989) The nucleotide sequence of satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. **Journal of General Virology** 70: 955-962.

Gaire F.; Schmitt C.; Stussi-Garaud C.; Pinck L.; Ritzenthaler C. (1999) Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. **Virology**, 264, p.25-36.

Galipienso L, Carmen Vives M, Navarro L, Moreno P, Guerri J. (2004) Detection of Citrus Leaf Blotch Virus Using Digoxigenin-Labeled cDNA Probes and RT-PCR. **Eur J Plant Pathol**, 110, p.175-181.

Gálvez, R.; Mendoza, H.A.; Fernández-Northcote, E.N. 1990. Herencia de la inmunidad al virus Y de la papa (PVY) en clones derivados de *Solanum tuberosum* ssp. andigena. **Fitopatología**, 27, p.8-15.

Garcia-Arenal, F.; Garcia, J.A. (1996) Estructura y expresión del genoma de los virus de plantas.. En: G. Llacer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello, eds. **Patología vegetal**. Vol I. Madrid, España, SEF, p. 44-46.

Gergerich, R.C.; and V. V. Dolja. (2006) **Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible** [Internet]. Londres, The Plant Health Instructor. Disponible desde: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/plantvirusspanol.aspx>> [Acceso 10 de agosto, 2016]

Gil Ramírez, J.F. (2010), **Diagnostico y caracterización molecular de virus asociados al cultivo de la papa en Colombia, con énfasis en el virus MOP- TOP (PMTV, POMOVIRUS)**. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Glais L, Tribodet M, Kerlan C. (2002) Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): Evidence that PVYN-W and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. **Arch. Virol.**; 147, p.363–378.

Goheen, A.C.; Hewitt, W.B. (1962) Vein banding, a new virus diseases of grapevines. **American Journal of Enology and Viticulture**, 13, p.73-77

Golino, D.A. (1993) Potential interactions between rootstocks and grapevine latent viruses. **American Journal of Enology and Viticulture**, 44(2), p.148-152.

González, E.; Díaz, T.; Mosquera, M.V. (1995) Effects of various types of virus on *Vitis vinifera* L. cv. Albariño cultivated in vitro. **Vitis**, 34 (4), p.243-244.

Grasswitz, T. R.; James, D. G. (2008) Movement of grape mealybug, *Pseudococcus maritimus*, on and between host plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 129, p.268-275.

Gray S, De Boer, S.; Stewart, Lorenzen J, Karasev A.; Whitworth J, Nolte P.; Singh R.B Boucher A. Xu H. (2010) PVY; An Evolving Concern for Potato Crops in the United States and Canada. **Plant Disease**, 94 (12), p.1384-1396.

Gray S.M.; Banerjee N.; 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 63, p.128-148.

Hamilton, E. 1, Edwardson, J. E.; Francki, E. L B.; Hsu, H. T.; Hul], E.; Koenig, R.; Milne, R. G. (1981) Guidelines for the identification and characterization of plant viruses. **Journal of General Virology** 54, p.223-241.

Hans, F., Fuchs, M., and Pinck, L. (1992) Replication of *Grapevine fanleaf virus* satRNA transcripts in *Chenopodium quinoa* protoplasts. **J. Gen.Virol.**, 73, p.2517-2523.

Harper K, Creamer R (1995) Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probes. **Plant Dis**, 79:563-567.

Harrison B.D.; Finch J.T.; Gibbs A.J.; Hollings M.; Shepherd R.J.; Valenta V.; Wetter C. (1971) Sixteen groups of plant viruses. **Virology**, 45, p.356-363.

Harrison, B.D.; Murant, A.F. (1977) Nematode transmissibility of pseudorecombinant isolates of tomato black ring virus. **Annals of Applied Biology**, 86, p.209-212

Hewitt, W.B.; Goheen, A.C.; Raski, D.J.; Gooding Jr., G.V. (1962) Studies of virus diseases of the grapevine in California. **Vitis**. 3, p.57-83.

Hewitt W.B. (1950). Fanleaf - another vine disease found in California. **Bulletin of the California Department of Agriculture**, 39, p.62-63.

Hewitt, W.B.; Raski, D.J.; Goheen, A.C. (1958) Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. **Phytopathology** 48, p.586-595.

Hong, Y.; Hunt, A.G. (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA- dependent RNA polymerase. **Virology**, 226, p.146-151.

Hristov, I.; Abrasheva, P. (2001) Effect of grapevine fanleaf virus and grapevine leafroll- associated virus 3 on vine plants under conditions of in vitro cultivation. **Plant Science**, 38(5-6), p.269-274.

Hu, X., T. Meacham, L. Ewing, S. M. Gray, A. V. Karasev. (2009). A Novel recombination Strain of Potato Virus Y suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in Tobacco. **Virus Res.**, 14, p.68-76.

Hulí, R. y Al-Hakim, A. (1988) Nucleic acid hybridization in plant virus diagnosis and characterization. **TIBTEOH**, 6, p.213-218.

Hull R. (2002). **Matthew's Plant Virology**. New York, NY, USA, Academic Press.

Huss B.; Muller S.; Sommermeyer G.; Walter B.; Van Regenmortel M.H.V. (1987) Grapevine fanleaf virus monoclonal antibodies: their use to distinguish different isolates. **Journal of Phytopathology**, 119, p.358-370.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. En: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; and White, T.J. (Eds.) **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, pp. 3–12

Jarugula, S.; Gowda, S.; Dawson, W.O.; Rayapati, A.N. (2010) 3-Coterminal subgenomic RNAs and putative cis-acting elements of Grapevine leafroll-associated virus 3 reveals 'unique' features of gene expression strategy in the genus Ampelovirus. **Virology Journal**, 7, p.180.

Jarugula, S.; Gowda, S.; Dawson, W. O.; and Naidu, R. A. (2012). "Development of Full Length Infectious cDNA Clone of Grapevine Leafroll- associated Virus 3," En: ICVG. **Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Octubre, 2012, Davis, California, USA**. Davis, Foundation Plant Services, p.70–71.

Jiang, J.; Laliberté, J.F. (2011) The genome-linked protein VPg of plant viruses - a protein with many partners. **Current Opinion in Virology**, 1, p.347–354.

Jones, R.; Kumar, S.; Mackie, A. (2003) Potato Virus Y. **Department of agricultural Factsheet**, 2, p.1443-7783.

Karasev, A. (2000) Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annu. Rev. Phytopathol**, 38, p.293-324.

Kawasaki E.S. (1990) **Amplification of RNA. PCR protocols: A guide to methods and applications**. San Diego, USA, TJ Academic Press.

Kim, Hyun-Ran; Park, Yong-Mun; Chung, Bong-Nam; Park, Gug-Seoun; Kim, Jeong-Soo; 2002, Biological Assay and Cytopathological Characteristics of Grapevine leafroll-associated 3 virus (GLRaV-3) and Grapevine fanleaf virus (GFLV). **The Plant Pathology Journal**, 18(5), p.244-250.

Kim, K. S.; Gonsalves, D.; Teliz, D.; and Lee, K. W. (1989) Ultrastructure and mitochondrial vesiculation associated with closterovirus- like particles in leafroll-diseased grapevines. **Phytopathology**, 79, p.357–360.

Kim, S.; Hamada, T. (2005) Rapid and reliable method of extracting DNA and RNA from sweetpotato, Ipomoea batatas (L). **Lam. Biotechnology Letters**, 27, p.1841-1847.

Klaassen, V.A.; Sim, S.T.; Dangl, G.S.; Osman, F.; Al Rwahnih, M.; Rowhani, A.; Golino, D.A. (2011) Vitis californica and Vitis californica × Vitis vinifera hybrids are hosts for Grapevine leafroll-associated virus-2 and -3 and Grapevine virus A and B. **Plant Disease**, 95, p.657- 665.

Koenig, R. (1981) Indirect ELISA for the bread specificity detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, 55, p.53.

KOGOVSEK, P.; GOW L.; POMPE-NOVAK, M.; GRUDEN, K.; FOSTER, G.D.; BOONHAM, N.; RAVNIKAR, M. (2008). Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of potato virus Y isolates. **Journal of Virological Methods**, 149, p.1-11.

Koonin E. V.; Dolja V. V. (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 28, p.375–430.

Kovacs, L.G.; Hanami, H.; Fortenberry, M.; Kaps, M.L. (2001). Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. **American Journal of Enology and Viticulture**, 52(3), p.254-259.

Landis, J.R.; Koch, G.G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 33, p.159-174.

Lazar, J. Kolber, M.; Lehoczy, J. (1990) Detection of some nepoviruses (GFV, GFVYM, GCMV, ArMV) in the seeds and seedlings of grapevine by ELISA. **Kertgasdasag**, 22(4), p.58-72.

Legorburu, F.J. (2000) Virosis de la patata y patata de siembra. **Cuadernos de Fitopatología**, 64, p.57-63.

Ling K. S.; Zhu H. Y.; Gonsalves D. (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus Ampelovirus. **J. Gen. Virol.**, 85, p.2099–2102.

Ling, K.S.; Zhu, H.Y.; Petrovic, N.; Gonsalves, D. (2001) Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting Grapevine leafroll-associated closterovirus-3 in field samples. **American Journal of Enology and Viticulture**, 52, p.21–7.

Liu, Y.; Sun, B.; Wang, X.; Zheng, C.; Zhou, G. (2007) Three digoxigenin-labeled cDNA probes for specific detection of the natural population of Barley yellow dwarf viruses in China by dot-blot hybridization. **J Virol Methods**, 145, p.22-29.

Lu R.; Folimonov A. S.; Shintaku M.; Li W. X.; Falk B. W.; Dawson W. O. (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 101, p.15742–15747.

MacKenzie, D.J.; McLean, M.A.; Murkerji, S.; Green, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription- polymerase chain reaction. **Plant Dis.**, 81, p.222–226.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. and Parker, J. (2006) **Biologia de los microorganismos**. 10a ed. Madrid, Pearson.

Maia, I. G.; Haenni, A.L.; Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **J Gen Virol**, 77, p.1335–1341.

Mannini, F.; Credi, R.; Gerbi, V.; Lisa, A.; Minati, J.L.; Argamente, N. (1994) Effect of viral infections on agronomical and enological behavior of clones of the grapevine cvs. Ruche and Dolcetto. **Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Enologia, Univ. Torino**, 18, p.55-71.

Mannini, F.; Gerbi, V. and Credi, R. (1998). Heat-treated virus-infected grapevine clones: Agronomical and enological modifications. **Acta Horticulturae**, 473, p.155-163.

Maree H. J.; Freeborough M.-J.; Burger J. T. (2008) Complete nucleotide sequence of a South African isolate of grapevine leafroll-associated virus 3 reveals a 5'UTR of 737 nucleotides. **Arch. Virol.**, 153, p.755–757.

Maree, H. J.; Almeida, R. P. P.; Bester, R.; Chooi, K. M.; Cohen, D.; Dolja, V. V.; Fuchs, M. F.; Golino, D. A.; Jooste, A. E. C.; Martelli, G. P.; Naidu, R. A.; Rowhani, A.; Saldarelli, P.; and Burger, J. T. (2013) Grapevine leafroll-associated virus 3. **Front. Microbiol.** 4, p.82-90.

Maree, H.J.; Freeborough, M.-J.; Burger, J.T. (2008) Complete nucleotide sequence of a South African isolate of grapevine leafroll-associated virus 3 reveals a 5' UTR of 737 nucleotides. **Archives of Virology**, 153, p.755–757.

Margis R.; Pinck L. (1992) Effects of site-directed mutagenesis on the presumed catalytic triad and substrate-binding pocket of Grapevine fanleaf nepovirus 24-kDa proteinase. **Virology** 190, p.884-888.

Margis R.; Viry M.; Pinck M.; Pinck L.; (1991) Cloning and in vitro characterization of the Grapevine fanleaf virus proteinase cistron. **Virology**, 185, p.779-787.

Marie-Jeanne-Tordo, V.; Chachulska, A.M.; Fakhfakh, H.; Le Romancer, M.; Robaglia, C.; Astier-Manifacier, S. (1995) Sequence polymorphism in the 5'-NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. **Journal of General Virology**, 76, p.939-949.

Marschner, H. (1990) **Manual nutrition of higher plants**. San Diego. CA, Academic Press.

Martelli G. P.; Agranovsky A. A.; Al Rwahnih M.; Dolja V. V.; Dovas C. I.; Fuchs M. (2012). Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. **J. Plant Pathol.**, 94, p.7–19.

Martelli G. P.; Agranovsky A. A.; Bar-Joseph M.; Boscia D.; Candresse T.; Coutts R. H. A. (2011). Family Closteroviridae, En: King A.; Adams M. J.; Carstens E. B.; Lefkowitz E.; editors. **Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Amsterdam, Elsevier-Academic Press, p.987–1001.

Martelli G. P.; Boudon-Padieu E. (2006). Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-Like Diseases of the Grapevine. En: CIHEAM, **Bibliographic Report 1998–2004**. Bari, CIHEAM, p.194.

Martelli G.P.; Hewitt W.B. (1963) Comparative studies on some Italian and Californian virus diseases of grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, 2, p.275-284

Martelli G.P.; Walter B.; Pinck L. (2003) Grapevine fanleaf virus. **Association of Applied Biologists, Descriptions of Plant Viruses**. [on line], 385. Disponible desde <<http://www3.res.bbsrc.ac.uk/webdpv/web/adpv.asp?dpvnum=385>> [Acceso 31 de junio 2016].

Martelli, G. P. (1993) **Graft-transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis**. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations in cooperation with the International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of Grapevine.

Martelli, G. P. (2000) Major graft-transmissible diseases of grapevines: Nature, diagnosis, and sanitation. En: American Society for Enology and Viticulture, **Proc. 50th Anniv. Annu. Meeting ASEV, Noviembre, 2000, Seattle**. Seattle, ASEV, p.231-236.

Martelli, G. P.; Abou Ghanem-Sabanadzovic, N.; Agranowsky, A. A.; Al Rawhani, M.; Dolja, V. V.; Dovas, C. I.; Fuchs, M.; Gugerli, P.; Hu, J. S.; Jelkmann, W.; Katis, N.; Maliogka, V. I.; Melzer, M. J.; Menzel, W.; Minafra, A.; Rott, M. E.; Rowhani, A.; Sabanadzovic, S.; and Saldarelli, P. (2012) Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated member of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. **J. Plant Pathol.**, 94, p.7-19.

Martelli, G. P.; Agranovsky, A. A.; Bar-Joseph, M.; Boscia, D.; Candresse, T.; Coutts, R. H.; Dolja, V. V.; Falk, B. W.; Gonsalves, D.; Jelkmann, W.; Karasev, A. V.; Minafra, A.; Namba, S.; Vetten, H. J.; Wisler, G. C.; and Yoshikawa, N. (2002) ICTV Study Group on closteroviruses. The family Closteroviridae revised. **Arch. Virol.**, 147, p.2039-2044.

Martín, M.T.; and García, J.A. (1991) Plum pox potyvirus RNA replication in a crude membrane fraction from infected *Nicotiana clevelandii* leaves. **Journal of General Virology**, 72, p.785-790.

Martínez-García, B.; Llave, C.; Atencio, F.A.; Díaz-Ruiz, J.R.; y López-Abella, D. (2001) La transmisión de los potyvirus por pulgones

(Revisión). **Investigaciones Agrarias, Producción y Protección Vegetal**, 16 (2), p.149-167.

Más P, Sánchez-Navarro J, Sánchez-Pina M, Pallás V (1993) Chemiluminescent and colorigenic detection of Cherry leaf roll virus with digoxigenin-labeled RNA probes. **J Virol Methods**, 45, p.93-102

Matthews, R.E.F. (1991) **Plant Virology**. 5th Ed. New York , Academic Press mc.

Mayo, M.A.; Barker, H.; Harrison, B.D. (1979) Polyadenylate in the RNA of five nepoviruses. **J. Gen. Virol.**, 59, p.149-162.

Meilong Xu, M.; Li, J.; Li, H.; Qiu, W. (2012) Study on the Time and Tissue for Reliable Detection of Grapevine Leafroll-associated Virus 3 in Cabernet Gernischt. En: **ICVG. Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Octubre, 2012, Davis, California, USA**. Davis, Foundation Plant Services, p.134-135.

Méndez-Lozano, J.; Ruelas-Ayala, R. D.; Fierro-Coronado, J. A. y Leyva-López, N. E. (2002) El PCR anidado una alternativa para la detección de geminivirus. En: **XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología (Memorias). Monterrey, 2002**. Monterrey, SMF.

Mendoza Silva, C.D. (2008) **EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE IC-RT-PCR EN LA DETERMINACIÓN DE Grapevine leafroll associated virus-3 (GLRaV-3) EN TEJIDO DE VID**. Tesis de Grado. Universidad de Talca

Mendoza, H.A.; Fernandez, E.; Jayasinghe, U.; Salazar, L.F.; Chuquillanqui, C.; Galvez, R. (1989) Breeding for resistance to potato viruses Y, X, and leafroll: Research strategy, selection procedures and experimental results. En: **Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato. Report of the III Planning Conference. International Potato Center (CIP), Noviembre, 1989, Lima, Peru**. Lima, CIP, p155- 171.

Messiaen C.; M. (1995) Thirty years of France experience in production of disease-free garlic and shallot mother bulbs. **Acta Horticultura**, 358, p.275-279.

Milne, R. (1984) Electron microscopy for the identification of plants viruses in *in vitro* preparations. En: Maramorosch, K.; Koprowski, H., eds. **Methods in Virology**. New York,. Acad. Preas.

Musa, F.; Carli, C.; Susuri, L.; Pireva, I. (2004) Monitoring of *Myzus persicae* (Sulzer) in potato fields in Kosovo. **Acta Agriculturae Slovenica**, 83, p.379 – 385.

Naidu R. A.; O'Neil S.; Walsh D. (2008). Grapevine Leafroll Disease [Internet]. WSU Extension Bulletin EB2027E. Disponible desde: <<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf>> [Acceso 4 de julio 2016].

Naidu, R.; Rowhani, A.; Fuchs, M.; Golino, D.; Martelli, G.P. (2015) Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. **Plant Disease**, 98(9), p.1172-1185.

Narváez, G.; Slimane Skander, B.; Ayllón, M.A.; Rubio, L.; Guerri, J.; Moreno, P. (2000) A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. **J Virol Methods**, 85, p.83-92

Nassuth, A.; Pollari, E.; Helmezczy, K.; Stewart, S.; Kofalvi, S.A. (2000) Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. **J Virol Methods**, 90, p.37-49

Nie, X.; Singh, R.P.; Singh, M. (2004) Molecular and pathological characterization of N:O isolates of the Potato virus Y from Manitoba, Canada. **Can. J. Plant Pathol**, 26, p.573-583.

Nolte, P.; Whitworth, J.L.; Thornton, M.K.; McIntosh, C.S. (2004) Effect of seedborne Potato virus Y on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato. **Plant Disease**, 88, p.248-252.

OEPP/EPPO. (2015) **Bulletin OEPP/EPPO**, 45 (3), p.445-449.

Ogawa, T.; Tomitaka, Y.; Nakagawa, A.; Ohshima, K. (2008) Genetic Structure of a Population of Potato virus Y Inducing Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease in Japan; Comparison with North American and European Populations. **Virus Research**, 131, p.199-212

Oliver, J.E.; Fuchs, M. (2011) Tolerance and resistance to viruses and their vectors in *Vitis* sp.: A virologist's perspective of the literature. **American Journal of Viticulture and Enology**, 62, p.428-451.

Osman, F.; Golino, D.; Rowhani, A. (2012) The Effect of Seasonal Changes on the Titer of Grapevine Viruses in Infected *Vitis vinifera* and their Downstream Detection using RT-PCR and qRT-PCR. En: ICVG. **Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Octubre, 2012, Davis, California, USA**. Davis, Foundation Plant Services, p.218-220.

P. Lava Kumar. (2009) **Methods for diagnosis of plant virus diseases: a laboratory manual**. Inglaterra, IITA

Pena-Iglesias, A.; Rubio-Huertos, M. (1971) Ultraestructura de hojas de *Chenopodium quinoa* Willd. infectadas con el virus del entrenudo corto infeccioso de la Vid. **Microbiología Espanola C.S.U.C**, 2A, p.183-192

Peña-Iglesias, A.; Castro, S.; Fresno, J.; and Carazo, G. (1978) Estudio de la ultraestructura de plantas herbáceas infectadas por varios Nepovirus (Ultrastructure of herbaceous hosts infected with various nepoviruses). En: **Proc. 6th meeting ICVG, 1978, Cordoba**. Madrid, Ministerio de Agricult., p.103-107.

Peremyslov V. V.; Hagiwara Y.; Dolja V. V. (1999) HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 96, p.14771-14776

Peremyslov V. V.; Pan Y.W.; Dolja V. V. (2004) Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. **J. Virol.**, 78, p.3704–3709.

Petersen, C. L.; and Charles, J. G. (1997) Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. **Plant Pathol.**, 46, p.509-515

Pietersen, G. (2004) **Spread of grapevine leafroll disease in South Africa a difficult but not insurmountable problem** [Internet]. Technical Yearbook 2004/5. Disponible desde: <http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0406leaf.php3> [Acceso 20 de julio 2016].

Pinck, L.; Fuchs, M.; Pinck, M.; Ravelonandro, M.; WALTER, B. (1988) A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F 13. **Journal of General Virology**, 69, 233-239.

Prokhnevsky A. I.; Peremyslov V. V.; Napuli A. J.; Dolja V. V. (2002) Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of beet yellows virus. **J. Virol.**, 76, p.11003–11011

Quacquarelli, A.; Gallitelli, D.; Savino, V.; Martelli, G.P. (1976) Properties of grapevine fanleaf virus. **J. Gen. Virol.**, 32, p.329-360.

Raboudi, F.; A. B. Moussa, H. Makni, M. Marrakchi y M. Makni. (2002) Serological detection of plant viruses in their aphid vectors and host plants in Tunisia. **OEPP/EPPO Bulletin**, 32, p.495–498.

Racah, B; Fereres, A. (2009) Plant Virus Transmission by Insects. En: **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**. Chichester , John Wiley & Sons.

Raski, D.J.; Goheen, A.C.; Lider, L.A.; Meredith, C.P. (1983) Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. **Plant Disease**, 67(3), p.335-339.

Reed J. C.; Kasschau K. D.; Prokhnevsky A. I.; Gopinath K.; Pogue G. P.; Carrington J. C.; et al. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by beet yellows virus. **Virology**, 306, p.203–209

Restrepo, M.A.; Freed, D.D.; and Carrington, J.C. (1990) Nuclear proteins. **Plant Cell**, 2, p.987-998

Riechmann, J.L.; Lain, S.; Garcia, J.A. (1992) Review Article: Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology**, 73, p.1-16

Ritzenthaler C.; Laporte C.; Gaire F.; Dunoyer P.; Schmitt C.; Duval S.; Piéquet A.; Loudes A.M.; Rohfritsch O.; Stussi- Garaud C.; Pfeiffer P. (2002) Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. **Journal of Virology**, 76, p.8808-8819.

Ritzenthaler C.; Pinck M.; Pinck L.; 1995a. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product *in vivo*. **Journal of General Virology**, 76, p.907-915

Ritzenthaler C.; Schmit A.C.; Michler P.; Stussi-Garaud C.; Pinck L.; 1995b. Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is located on tubules in vivo. **Molecular plant-microbe interactions**, 8, p.379-387

Ritzenthaler, C.; Viry, M.; Pinck, M.; Margis, R.; Fuchs, M. & Pinck, L. (1991) Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. **J Gen Virol.**, 72, p.2357–2365.

Robaglia, C.; Durand-Tardif, M.; Tronchet, M.; Boudazin, G.; Astier-Manifacier, S.; and Casse- Delbart, F. (1989) Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. **Journal of General Virology**, 70 (4), p.935-947.

Rodríguez L.; E. (1992) **Virus que dañan al jitomate (Lycopersicon esculentum Mill) en México y métodos de control: revisión de literatura.** Tesis de Grado. Universidad Autónoma Chapingo.

Rodríguez-Montessoro, R. (2003) **Manual de campo de enfermedades y desordenes fisiológicos de la papa en México.** Mexico.

Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D.K. 2003. **Immunology.** 3era ed., St. Loius, E.U, Ed. Mosby.

Romero, A.; B. Blanco-Urgoiti, M.J. Soto, A. Fereres, and F. Ponz. (2001) Characterization of typical pepper-isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. **Virus Research**, 79, p.71–80

Rosner, A Lachman, M Pearlsman, L Maslenin and Antignus. 2000. Molecular characterization and differential diagnosis of a necrotic PVY isolate in tomato. **Annual apply Biology**, 137, p.253–257.

Ross, H. 1952. Studies on mosaic resistance in the potato. En: **Proc. Conf. Potato Virus Dis.;Ageningen-Lisse, 1951.** p. 40-47.

Rowhani A.; Uyemoto J. K.; Golino D. A. (1997) A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll-associated viruses. **Plant Dis.**, 81, 799–801

Rowhani, A.; Walker, M. A.; Rokni, S. (1992) Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. **Vitis** 31, p.35-44.

Rubio L, Janssen D, Cuadrado IM, Moreno P, Guerri J (2003) Rapid detection of Cucumber vein yellowing virus by tissue-print hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. **J Virol Methods**, 114, p.105-107.

Rubio-Huertos, M.; and López-Abella, D. (1966) Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. **Microbiología Española**, 19, p.77-86.

Rybicki, E. P. y Hughes, F. L. (1990). Detection and typing of maize streak virus and other distantly related geminivirus of grasses lay polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. **Journal of General Virology**, 71, p.2519-2526.

Rybicki, E. P.; von Wechmar, M. B. (1985) Serology and Immunochemistry. En: Milne, R.G., ed. **The Plant Viruses**, Nueva York, Plenum Presa, p.207-244.

S. van Zyl , M.A. Vivier , M.A. Walker S. (2012) Xiphinema index and its Relationship to Grapevines: A review . **Afr. J. Enol. Vitic.**, 33, p.21-32

Salazar. L.F. (1995) **Los Virus de la Papa y su Control. Centro Internacional de la Papa.**, Lima Perú, International Potato Center (CIP).

Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM, Bressan RA. (1999) An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Mol. Biol. Rep.**, 17, p.11–17.

Satyanarayana T.; Gowda S.; Ayllon M. A.; Dawson W. O. (2004) Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 101, p.799–804

Scholthof, K.-B. G. (2001) **1898 – the beginning of virology...time marches on** [Internet], Texas, The Plant Health Instructor. Disponible desde: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TobaccoMosaic.aspx>> [Acceso 31 de julio 2009].

Seah Y. M.; Sharma A. M.; Zhang S.; Almeida R. P. P.; Duffy S. (2012) A divergent variant of Grapevine leafroll-associated virus 3 is present in California. **Viol. J.**, 9, p.235

Sociedad Española de Fitopatología.(SEF) (2015) **Potato virus Y** [Internet]. Madrid, Patógenos de plantas descritos en Españ.Disponible desde: <sef.es/descargar.php?ap=6&el=1349> [Acceso 20 de octubre 2009].

Serghini, M. A.; Fuchs, M.; Pinck, M.; Reinbolt, J.; Walter, B. & Pinck, L. (1990) RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. **J Gen Virol.**, 71, p.1433–1441.

Shcherbakova, L.A. 2007. Advanced methods of plant pathogen diagnostics. En: Dyakov, Y. T.; Dzhavakhiya, V.G.; Korpela, T. (2007) **Comprehensive and molecular phytopathology**. Nueva York, Elsevier B. V., p.483.

Shukla, D.D.; Ford, R.E.; Tosic, M.; Jilka, J.; and Ward, C.W. (1989) Possible members of the potyvirus group transmitted by mites or whiteflies share epitopes with aphid-transmitted definitive members of the group. **Archives of Virology**, 105, p.143-151

Šindelář L. and M. Šindelářová. (2005) Regulation of metabolic pathways PVY- RNA biosynthesis in tobacco: host's RNA degradation. **Biología Plantarum**, 49, p.309-312.

Singh, R.P.; Valkonen, J.P.T.; Gray, S.M.; Boonham, N.; Jones, R.A.C.; Kerlan, C.; Schubert, J. (2008) Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. **Arch. Virol.**; 153, p.1-13.

Smith, I. M.; Dunez, J.; Lelliott, R.A.; Phillips, D.H. y Archer, S.A. (1992) **Manual de enfermedades de las plantas**. Madrid, Ed. Mundi-Prensa.

.Spaar, D. ; Harmann, U. (1977) En: Klinkowski. M. et al. Ed. **Pflanzliche Virologie**. Volumen 3, 3rd edición. Berlin, Akademie-Verlang, p.63-113

Steinkellner H, Himmler G, Sagl R, Mattanovich D, Katinger H (1992) Amino-acid sequence comparison of nepovirus coat proteins. **Virus Genes**, 6, p.197–202

Stevenson, W. R. R.; Loria, G. D. Franc, and D. P. Weingartner. 2001. **Compendium of Potato Diseases. 2 ed. Ed. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 106 pp**

Sutic, D.D.; Ford, R.E. y Tosic, M.L. 1999. Handbook of plant virus diseases. CRC Press USA

Taylor, C.E; Robertson, W.M.; (1970) Sites of virus retention in the alimentary tract of the nematode vectors, *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and *X. index* (Thorne and Allen). **Ann. Appl. Biol.** 66, p.375-80.

Taylor, C.E.; Raski, D.J.; 1964. On the transmission of grape fanleaf by *Xiphinema index*. **Nematologica**, 10, p.486-495.

Taylor, R.H.; Hewitt, W.B.(1964). Properties and serological relationships of Australian and Californian soil-borne viruses of the grapevine and arabis mosaic virus. **Austr.J.Agric.Res.**, 15, p.571-585.

Thornberry, H.H.; Nagaich, B.B. (1962) Stability of tobacco-mosaic virus, Marmor tabaci H, in solutions diluted beyond the end point of infectivity. **J. Bacteriol.**, 83, p.1322-1326.

Thornberry, H.H. (1966) **Index of Plant Virus Diseases, Agric. Handb. U.S.D.A.** Estados Unidos, United States. Department of Agriculture.

Thornbury, D.W.; Pirone, T.P. (1983) Helper component of two potyviruses are serologically distinct. **Virology**, 125, p.487-490.

Tian T.; Rubio L.; Yeh H.-H.; Crawford B.; Falk B. W. (1999). Lettuce infectious yellows virus: In vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly, *Bemisia tabaci*. **J. Gen. Virol** 80, 1111–1117

Tijssen, P. (1985) **Practice and theory of enzyme immunoassays**. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press.

Torrance, L.; Jones, R. A. (1981) Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. **Plant Pathology**, 30, p.1-24.

Tribodet M.; Glais, M., Kerlan, C.; Jacquot, E.. (2005) Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. **Journal of General Virology**, 86, p.2101–2105.

Tsai, C.W.; Daugherty, M.P.; Almeida, R.P.P. (2011). Seasonal dynamics and virus translocation of grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. **Plant Pathology**, 61(5), p.977–985

Tsai, C. W.; Bosco, D.; Daane, K. M.; and Almeida, R. P. P. (2011a) Effect of host plant tissue on the vector transmission of grapevine leafroll-associated virus 3. **J. Econ. Entomol.**, 104, p.1480-1485.

Tsai, C. W.; Daugherty, M. P.; Almeida, R. P. P. (2012) Seasonal dynamics and virus translocation of Grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. **Plant Pathol.**, 61, p.977-985

Tsai, C. W.; Rowhani, A.; Golino, D. A.; Daane, K. M.; Almeida, R. P. P. (2010) Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity. **Phytopathology**, 100, p.830–834

Tsai, C.W.; Chau, J.; Fernandez, L.; Bosco, D.; Daane, K.M.; Almeida, R.P.P. (2008) Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the vine mealybug (*Planococcus ficus*). **Phytopathology** 98, p.1093-1098.

Urcuqui-inchima, S.; Haenni, A. L.; BERNARDI, F. (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research** 74, p.157-175.

Uyemoto JK, Martelli GP, Rowhani A. (2009) **Grapevine viruses, virus-like diseases and other disorders. Virus diseases of plants.** St. Paul, APS Press.

Valat, L. (2006) Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of Grapevine fanleaf virus: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. **Plant Science**, 170(4), p.739-747.

Van den Born E.; Omelchenko M. V.; Bekkelund A.; Leihne V.; Koonin E. V.; Dolja V. V. (2008) Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation. **Nucleic Acids Res.**, 36, p.5451–5461

van Regenmortel, M.H.V. (1982) **Serology and Immunochemistry of plant viruses.** Nueva York, Academic Press.

Verbeek, M.; Cuperus, R.A.A. van der Blugt, P.G.M. Peron y A.M. Dullermans. 2010. Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN, and Wilga strains of Potato virus Y. **Annals of Applied Biology**, 156, p.39-49.

Vidal Izquierdo, E. (2010), **Epidemiología de Plum pox virus y Citrus tristeza virus en bloques de plantas de vivero. Métodos de control.** Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia

Viry M.; Serghini M.A.; Hans F.; Ritzenthaler C.; Pinck M.; Pinck L.; 1993. Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. **Journal of General Virology**, 74, p.169-174.

Vuittenez, A. (1963) **Comptes Rendues Hebdomadaires des Seances de l'Academie Agricole de France.** Vol 49. Francia, Academie Agricole de France.

- Vuittenez, A. (1970) Fanleaf of grapevine. p. 217-228. En: N. W. Frazier ed. **Virus diseases of small fruits and grapevines**. Berkeley, Univ. Calif. Div. Agric. Sci., p.290.
- Walkey, D. (1991) **Applied Plant Virology**. 2da edicion. Londres, Chapman and Hall.
- Walter, B. (1988) **Quelques exemples de la réaction physiologique de la vigne en présence de virus**. Francia, Bull. O.I.V
- Walter, B.; Grenan, S.; Esmenjaud, D.; Cornuet, P.; Boidron, R.; Leguay, M.; 1993, Use and limits of ELISA for routine detection of ArMV and GFLV in grapevines and in Xiphinema index. **Proc. 11th meeting. ICVG, Montreux, 1993**. Montreux, ICVG, pp 146- 147.
- Ward, C.W.; and Shukla, D.D. (1991). Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. **Intervirolgy**, 32, p.269-296
- Ward, C.W.; Weiller, G.F.; Shukla, D.D.; Gibbs, A.J. (1995) Molecular systematics of the Potyviridae, the largest plant virus family. En: Gibss A.J.; Calisher C.H.; Garcia-Arenal, F. eds. **Molecular Basis of Virus Evolution**, Cambridge, Cambridge University Press, Cambridge, p.477-500.
- Weber E.; Golino D. A.; Rowhani A. (1993) Leafroll disease of grapevines. **Pract. Wine. Vineyard**, 14, p.21–24
- Webster, C.G.; Wylie, S.J.; Jones, M.G. (2004) Diagnosis of plant viral pathogens. **Current Science**, 86, p.1604-1607.
- Wetzel, T.; Candresse, T.; Ravelonandro, M. y Dunez, J. (1991) A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. **Journal of Virological Methods**, 33, p.355-365.
- Wyss U. (2000) Xiphinema index, maintenance and feeding in monoxenic cultures. En: Maramorosch K.; Mahmood F., ed. **Maintenance of human, animal, and plant pathogen vectors**. Chicago, Science Research Associates, pp.251-281
- Zaitlin, M. (1998) The discovery of the causal agent of tobacco mosaic disease. En: Kung, S.D.; Yang, S.F., eds. **Discoveries in Plant Biology**. Hong Kong, World Publishing Co. Ltd., p.105-110
- Zavaleta M.; E. (1999) Alternativas de manejo de enfermedades de las plantas. **Agrociencia**. 17, 47-55.
- Zdunic G, Budic-Leto I, Vrhovsek U, Tomic-Potrebujes I, Maletic E. (2012). Ampelographic and oenological characterization of the ancient grapevine cv. Dobricic grown in the coastal region of Croatia. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, 46(4), p.263-273

ANEXO

Composición Buffers DAS-ELISA

Tampones empleados para Protocolo DAS-ELISA.

Tampón Tapizado "Coating Buffer" pH 9,6

Reactivo	Cantidad para 1000 ml
Na ₂ CO ₃	1,59 g.
NaHCO ₃	2,93 g.
NaN ₃	0,2g.

Tampón de Lavado "Washing Buffer" pH 7,4

Reactivo	Cantidad para 1000 ml
NaCl	8g.
KH ₂ PO ₄	0,2 g.
Na ₂ HPO ₄	1,15 g.
KCl	0,2 g.
Tween 20	0,5 g.

Tampón Conjugado “Conjugate Buffer” pH 7,4

Reactivo	Cantidad para 1000 ml
TRIS	2,4 g.
NaCl	8g.
PVP K25 (MW 24000)	20 g.
Tween 20	0,5 g.
BSA (bovine serum albumin)	2g.
MgCl ₂ x6 H ₂ O	0,2 g.
KCl	0,2 g.
NaN ₃	0,2 g.

Tampón de Extracción Papa “Extraction Buffer 1” pH 7,4 (BE1)

Reactivo	Cantidad para 1000 ml
TRIS	2,4 g.
NaCl	8g.
PVP K25 (MW 24000)	20 g.
Tween 20	0,5 g.
KCl	0,2 g.
NaN ₃	0,2 g.
Albumina de Huevo	10,0 g

Tampón de Extracción Vid "Extraction Buffer 2" pH 8,2 (BE2)

Reactivo	Cantidad para 1000 ml
TRIS	24,0 g.
NaCl	8g.
PVP K25 (MW 24000)	20,0 g.
Tween 20	0,5 g.
PEG (MW 6000)	10,0 g.
NaN3	0,2 g.

Tampón de Extracción General "Extraction Buffer 3" pH 9,6 (BE3)

Reactivo	Cantidad para 1000 ml
Na₂CO₃	1,59 g.
NaHCO₃	2,93 g.
PVP 40 (MW 24000)	20 g.
Tween 20	0,5 g.
BSA	2 g.
N₂S₂O₃	10 g.

Análisis de Datos

Una de las principales dificultades en las pruebas de ELISA puede ser la determinación de la línea de corte o valor umbral, que discrimina los resultados positivos. Las lecturas de muestras sanas en ELISA dependen de una variedad de diferentes factores tales como reactivos, los productos químicos (pureza de pNPP!), tipo de placa de microtitulación, las condiciones de incubación, tipo de tejido de la planta, manejo (especialmente en el Lavado). Incluso si todos estos parámetros se mantienen lo más constante posible, puede suceder que hay diferencias de placa a placa en la misma serie de ensayos. Por lo tanto, no es recomendable trabajar como valor de Absorbancia (Abs) de corte predeterminado. A continuación, se describe un análisis estadístico que puede ser fácilmente calculado para cada placa de microtitulación. Para un tratamiento automatizado de los datos, utilizamos un diseño de solución para la distribución de muestras de ensayo en una placa de microtitulación de 96 celdas.

En primer lugar, el cálculo de las medias de las dos lecturas de cada muestra y ordenar estos medias en orden ascendente. Al hacer un histograma, los datos que pertenecen a muestras sanas se mantienen con un ligero aumento lineal de los valores de Abs, mientras que un 'step' (**flecha roja en Figura 7.1**) distingue posibles muestras

positivas (por lo menos el control positivo) (Technical Information, ELISA Data Analysis, Bioreba, 2014)

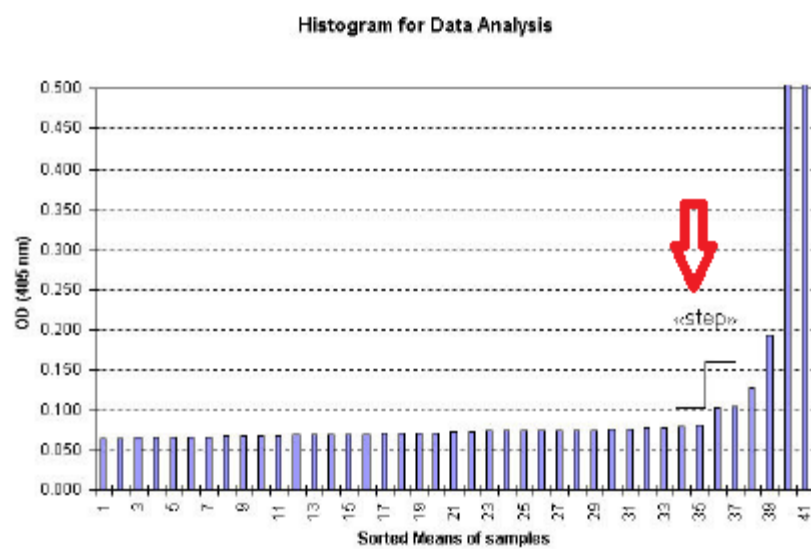


Figura 7.1 Histograma de Promedio de Absorbancia en función de la muestra para análisis de datos de DAS-ELISA

Fórmula para el cálculo del valor de corte

$$cut-off = (media + 3s) \times 1.1$$

media: media de los valores medios hasta el 'step'

s: desviación estándar de los valores medios de hasta el 'step'