

## **DIVERSOS METODOS DE DETERMINACION DE VIRUS DE LA PAPA (\*)**

Mario Alvarez A.  
Primo Accatino L.  
Ingenieros Agrónomos (\*\*)

En consideración a la gran importancia económica que tienen las enfermedades virosas de la papa, los autores concedieron especial atención a la determinación de los virus causantes de estas enfermedades.

Para ello, hicieron uso de diversas técnicas con el fin de comprobar su efectividad.

Este trabajo reviste el mérito de ser la primera vez que estas técnicas de metodología aplicada se usen conjuntamente en el país, en determinaciones de virus de las papas.

### **1.— Empleo de plantas indicadoras:**

#### **INTRODUCCION:**

Planta indicadora es aquella que presenta una reacción rápida y característica a un cierto virus que puede no ofrecer síntomas en la planta del cultivo que se está estudiando. Una buena planta indicadora debe reaccionar a los pocos días después de la inoculación, mediante la formación sobre la hoja inoculada, de manchas definidas y separadas conocidas como lesiones locales.

La selección de una planta indicadora adecuada para un virus determinado es esencialmente un asunto de tanteo, puesto que un buen reactor muchas veces no está relacionado botánicamente con la planta de cultivo bajo estudio.

---

(\*) Trabajo realizado con la asesoría técnica del Dr. A.B.R. Beemster, experto en virología de la F.A.O., en Chile. Presentado en la XIII Jornadas Agronómicas en Los Angeles en Noviembre de 1962.

(\*\*) Ingenieros Agrónomos del Departamento de Investigación Agrícola del Ministerio de Agricultura.

## METODOLOGIA:

El método de inoculación empleado para los virus que se deseaba determinar, se efectuó frotando savia de plantas enfermas o aparentemente enfermas sobre las hojas de las plantas indicadoras.

Con este sistema se determinaron virus de la papa, tabaco y tomate, que se considera, están íntimamente relacionados entre sí.

El método seguido consistió en agregar una pequeña cantidad de "carborundum" sobre las hojas de las plantas indicadoras, el cual actuó como abrasivo, produciendo fisuras en la epidermis de las hojas. En seguida, se frotó suavemente con savia de la planta cuyo virus se deseaba detectar. Posteriormente cada hoja inoculada se sometió a un leve lavado con agua pura para expulsar el exceso de "carborundum" y evitar de esta manera mayor producción de heridas sobre la superficie de las hojas.

Este método de inoculación se empleó en *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor* y *Nicotiana debneyi*.

Sobre hojas amputadas de *Solanum demissum* A6, se usó el método de inoculación ya descrito, dejándolas en seguida en bandejas que formaban cámara húmeda, siendo posteriormente colocadas en condiciones adecuadas de temperatura (25°C) y de intensidad de luz, proporcionada por dos tubos de luz de neón de 20 Watts cada uno, los que dieron una intensidad de 500 Lux.

## RESULTADOS.

Las plantas indicadoras usadas en este trabajo, las virosis determinadas y los tipos de reacciones obtenidos, fueron los siguientes:

Planta Indicadora	Virosis Determinadas	Reacción
Nicotiana tabacum	"Mosaico Común" del tabaco	Mosaico sistémico
	"Mosaico del tabaco" en tomate	Lesiones locales necróticas
	Nuevo "strain" del virus Y de la papa	Estriado café sistémico en la nervaduras
Nicotiana glutinosa	"Mosaico Común" del tabaco	Lesiones locales necróticas

	"Mosaico del tabaco" en tomate	Lesiones locales necróticas
Datura stramonium	"Virus X" de la papa	Lesiones locales y sistémicas
Gomphrena globosa	"Virus X" de la papa	Lesiones locales necróticas
Chenopodium amaranticolor	"Virus X" de la papa	Lesiones locales
Solanum A6	"Strain" viejo del Virus Y de la papa	Lesiones locales
	Nuevo "Strain" del Virus Y de la papa	Lesiones locales rodeadas de un anillo necrótico.
Nicotiana debneyi	"Mosaico Común" del ta- baco	Lesiones locales necróticas

## 2.— Método del "Tuber Index".

### Introducción:

El "Tuber Index" es un método ampliamente usado en el diagnóstico de los virus que atacan a la papa. Consiste, una vez efectuada la cosecha, en sembrar parte de un tubérculo acompañado de una yema, marcándose el resto del tubérculo y almacenándolo posteriormente. La yema brota a las pocas semanas, pudiéndose efectuar un análisis de los virus presente en la planta; ya sea por simple observación visual o mediante el empleo de plantas indicadoras y/o antisueros.

Con este método, se persigue detectar aquellos virus que en la temporada de cultivo permanecieron enmascarados y a las infecciones tardías que no alcanzaron a mostrar síntomas aún, cuando el virus llegó a los tubérculos.

Cada tubérculo y yema van numerados, lo que permite la eliminación posterior de aquellos que demostraron poseer algún virus.

### METODOLOGIA.

El trabajo se llevó a cabo en el invernadero de la Estación Experimental Central "La Platina".

Mediante un sacabocados especial, se sacaron trozos de tubérculos acompañados de un brote, los que fueron sembrados en sus respectivos maceteros.

Se efectuaron tres lecturas, a las dos, tres y cuatro semanas después de la siembra. La lectura se efectuó por simple observación visual, en consideración a que los síntomas se presentaban muy claros, determinándose la presencia de "Mosaico Leve" (virus X), "Mosaico Severo" o "Necrosis de las Nervaduras" (virus Y), "Mosaico Rugoso" (complejo de virus X e Y) y "Enrollamiento de la hoja" o "Leaf Roll".

### Resultados.

Los porcentajes de virosis determinados en siete variedades de papa, fueron los siguientes:

Variedad	Procedencia	Nº Plantas	Virus X	Virus Y	Virus X Y	L. Roll
Ackersegen	E.E. Central	21	9.5	4.7	0.0	0.0
Ackersegen primer año	Pirque	84	11.0	7.0	3.5	7.0
Ackersegen segundo año	Pirque	75	18.6	16.0	5.3	10.6
Condor	Pirque	64	3.1	9.3	3.1	1.5
Corahila	E.E. Central	16	6.2	6.2	0.0	0.0
Cunca	Graneros	43	39.5	30.0	9.3	9.3
Gineke	E.E. Central	24	16.5	0.0	4.2	0.0

### 3.— Determinación del Virus Causante del Leaf Roll de la Papa. Mediante el Método de "Igel Lange"

#### Introducción:

El Leaf Roll es una de las enfermedades degenerativas de la papa de mayor gravedad. Reduce la cantidad y tamaño de los tubérculos y sus daños son aún mayores cuando las variedades afectadas contienen también virus X.

Se transmite en el campo unicamente por insectos y se perpetúa por los tubérculos de un año para otro, considerándose que en las zonas de regular

infestación de afidos, una planta enferma alcanza en un año a varias plantas más a su alrededor, por lo que en muy poco tiempo llega a degenerar por completo al cultivo.

El método de "Igel Lange", es un proceso de patente alemana que lleva el nombre de sus autores y se usa con el fin de determinar en tubérculos de papa la presencia del virus causante del Leaf Roll.

Contrariamente al uso de la Serología y a las pruebas sobre plantas indicadoras en donde se demuestra la presencia del virus en la savia de las hojas o de los brotes, el método de "Igel Lange" determina las modificaciones causadas por el virus al penetrar en los tejidos. Estas modificaciones, conocidas por "Formaciones callosas" se producen en los tejidos vasculares del tubérculo. Este fenómeno puede tener como causa el esfuerzo que hace el tubérculo de la papa, con el fin de protegerse del virus.

### Metodología.

Una vez cosechados los tubérculos, se mantuvieron almacenados por unas cuatro semanas para inducirlos a la formación de callo. Posteriormente, del extremo del estolón se efectuó un corte transversal, sacándose un trozo del tubérculo. De este trozo se cortaron rebanadas de unos dos milímetros de espesor, en forma perpendicular al estolón, con el propósito que los haces vasculares estuviesen dispuestos en forma vertical.

Las rebanadas se colorearon durante 15 minutos en un baño de resorcina y luego fueron examinadas al estereoscopio para determinar la presencia de cuerpos callosos teñidos de azul.

### Resultados.

Mediante este método se logró determinar la presencia de "callo" en cinco variedades de papa, provenientes de Melipilla.

El porcentaje de Leaf Roll de las diferentes variedades de papa, se obtuvo considerando aquellos tubérculos que presentaron teñido de azul, en forma clara y precisa su formación callosa.

Variedad	N; Tubérculos	No Tubérculos con presencia de callo	% de Leaf Roll
Ackersegen	30	1	3.3
Aquila	50	2	4.3
Condor	30	2	6.6
Corahila	55	2	5.5
Gineke	30	1	3.3

#### 4.— Determinación de Virus de la Papa mediante Antisueros.

##### Introducción.

Las reacciones serológicas, usadas ampliamente en muchos países productores de papa, son de suma importancia para la identificación de los virus. El método es bastante preciso y pueden obtenerse los resultados en un mínimo de tiempo (horas), contrariamente a lo que sucede con las plantas indicadoras, cuyos resultados se verifican después de varios días.

El proceso de preparación de un antisuero a grandes rasgos, consiste en inyectar dentro de la corriente sanguínea de un conejo, savia proveniente de una planta infectada con el virus cuyo anticuerpo se quiere elaborar.

Previamente esta savia ha sido sometida a proceso de centrifugación y agregación de Sulfato de amonio o ácido acético, para eliminar las proteínas normales de la planta y dejar sólo la proteína-virus.

El organismo del animal responde a la inoculación del cuerpo extraño mediante la formación de anticuerpos específicos. Después de un cierto período, el conejo se sangra y se extrae el antisuero. Este antisuero reacciona únicamente frente al virus específico que había originalmente inoculado.

##### Metodología.

Los antisueros usados para los virus X,Y,S y M usados en el presente trabajo son de procedencia holandesa. Vienen en el interior de cápsulas de vidrio, disecados al frío, lo que permite su almacenaje a bajas temperaturas sin que pierdan su propiedad infectiva por varios años.

Para su uso, estos antisueros fueron disueltos, añadiendo 2 cc. de solución salina (0.85% de Na Cl) a cada ampolla. En esta forma el antisuero quedó listo para ser usado, pudiéndose efectuar alrededor de 300 microglutinaciones.

Para realizar el test de virus S, las hojas de papa fueron sacadas del tallo principal, pudiendo ser la tercera o cuarta hoja desde el ápice del tallo. Las hojas muy nuevas tienen escaso contenido de virus S para un test totalmente seguro. Para los otros virus X,Y, y M, se prefirió usar hojas nuevas, con folíolos totalmente desarrollados.

La operación de extracción de la savia se efectuó mediante una prensa de metal en la cual se enrollan 2 ó 3 hojas. El prensado se efectuó dos veces consecutivas ya que en la segunda prensada hay generalmente mayor proporción de virus que en la primera.

El antisuero para cada uno de los virus (X,Y,S y M) se dispuso en gotas pequeñas sobre la superficie de un disco petri, al que previamente se le había agregado un repelente de agua (Folvar al 1% en Cloroformo). En seguida a cada gota de antisuero se le agregó savia de la planta a diagnosticar. Posteriormente el disco fué cubierto con una capa de aceite de parafina, para evitar la evaporación de la gota. Como testigo se usaron ampollas de suero normal, efectuándose el mismo proceso que los otros antisueros.

En aquellos casos que apareció reacción positiva en el suero normal, se descartó todo el grupo, en consideración a la posible vejez de las hojas o a la posibilidad que hubiesen aplicado fungicidas en las hojas.

La lectura de las reacciones se efectuó mediante un esteroscopio, reconociéndose la reacción positiva por la aglutinación de la savia con presencia de virus al contacto con el antisuero respectivo.

### Resultados.

Variedad	Nº muestra	Virus determinados (en %)			
		Virus X	Virus Y	Virus S	Virus M
Ackersegen	54	7.4	1.8	11.1	12.8
Aquila	39	7.7	2.5	7.7	10.2
Condor	56	3.5	7.1	5.3	7.1
Corahila	52	1.9	7.6	5.6	9.6
Gineke	44	2.2	4.7	6.8	16.3

### Discusión y Conclusiones:

En muchos casos es difícil reconocer y determinar un virus presente en una planta de papa, ya sea por efectos de enmascaramiento, inexperiencia del técnico en la materia, incidencia del virus en variedades portadoras, etc. Para lograr, entonces, diagnosticar exactamente la enfermedad virosa presente se necesita de la ayuda de métodos auxiliares.

El método del "tuber index" es ampliamente usado para ese objetivo; tiene la ventaja que las plantas se mantienen bajo control absoluto y se puede además comparar plantas sanas con enfermas para describir síntomas. Es importante también en la determinación de "carriers" o variedades portadoras.

Como este sistema no es absolutamente seguro, por las mismas razones expuestas en el párrafo primero, se necesita a veces complementarse con otros métodos, (serología y plantas indicadoras, por ej).

El método de la serología aunque muy rápido y útil, puede usarse sólo para un número limitado de virus; en el caso de la papa, para los virus X,Y,S y M. El test serológico puede efectuarse con plantas obtenidas directamente del campo o del "tuber index". Para ser usadas, las plantas necesitan estar en un período vegetativo adecuado.

Plantas muy jóvenes o muy viejas no son posibles de utilizar.

Otro método aún más sensitivo que el uso de la serología y que tiene menos limitaciones, es aquel del empleo de plantas indicadoras. Se basa en la formación de reacciones típicas que aparecen en la superficie de las hojas de ciertas plantas al ser inoculadas con un virus determinado. Es un método bastante seguro, con la desventaja que los resultados se obtienen sólo al cabo de varios días.

En general, probar la presencia de virus en tubérculos de papa es muy difícil. Sería de suma importancia contar con un sistema destinado a este fin, ya que se evitaría el uso del método del "tuber index".

En la actualidad se están probando métodos para diagnosticar directamente la presencia de los virus en los tubérculos. Uno de los más efectivos es el de Igel-Lange, que detecta la presencia del virus del leaf-roll. En este caso cobra mayor importancia el método, puesto que hasta ahora no se ha podido elaborar un antisuero para este virus y no existen plantas indicadoras que den reacciones típicas y rápidas.

Este método no es absolutamente seguro, ya que influyen las condiciones de almacenaje de los tubérculos, como asimismo el tipo de variedad que se está probando.

En opinión de los autores, los métodos efectuados constituyen, si se usan en forma conjunta, una gran ayuda en la determinación de los virus que afectan a la papa. Los defectos propios de cada método se ven compensados por las cualidades de los otros, lo que permite al final, una exactitud de diagnóstico casi absoluta.

Por otro lado, y como puede observarse a través del trabajo, las necesidades materiales y costos de aplicación de los métodos son muy reducidos, lo que permitiría adoptar las técnicas descritas, aún por particulares interesados en producir papa libre de enfermedades virósas.

## **RESUMEN.**

El objetivo del presente trabajo fué llevar a cabo determinaciones de virus de la papa, de acuerdo a la aplicación de diversas metodologías.



Mediante el uso de plantas indicadoras se determinaron virosis de la papa y otros cultivos. La presencia de los virus se reconoció por la reacción típica de las plantas indicadoras a la inoculación.

Se probaron serológicamente cinco variedades de papas. Los resultados del test demostraron la presencia de virus X, Y, S, y M sobre las diversas variedades probadas.

Empleándose el método del "tuber index", es decir la siembra en maceteros de un trozo de tubérculo acompañado de una yema, se logró determinar por simple observación visual la presencia de "Mosaico leve" (virus X), "Mosaico severo" (virus Y), "Mosaico rugoso" (complejo de virus X e Y) y "Leaf roll" o "Enrollamiento de la hoja".

Mediante la aplicación del método Igel-Lange, consistente en demostrar la formación de "callo", inducida por la presencia del virus del "leaf roll", se determinó la incidencia del virus en diversas variedades de papa.

Los resultados, a la vez que determinaron la mayor o menor eficacia de los diferentes métodos empleados, demostraron el alto porcentaje de virosis existente en las diversas variedades de papas probadas.

#### S U M M A R Y.

The work presented here aimed the determination of potato viruses by applying various test methods.

By using indicator hosts, viruses of potato and other crops can be identified. The presence of viruses can be established easily by the appearance of typical symptoms after inoculation of an indicator host.

Five potato varieties tested serologically. The results of the tests demonstrated the presence of the potato viruses X, Y, S and M in the tested the varieties.

By applying the tuber-index method (planting a piece of a potato tuber with a sprout, in a pot) it was possible to establish the presence of "mild mosaic" (virus X), "severe mosaic" (virus Y), "rugose mosaic" (a complex of X and Y) and "leaf roll" by watching the symptoms.

By applying the Igel-Lange method, "leaf roll" could be determined in different varieties. The Igel-Lange test enables the determination of "leaf roll" virus in potato tubers by demonstrations of callose.

From the tests it has become clear that the tested varieties all showed a rather high percentage of virus infection. Moreover it was possible to establish the reliability of the different test methods.

## B I B L I O G R A F I A

- Bazan de Segura, Consuelo "Virosis de la papa en el Perú", Boletín N° 31, Estación Experimental Agrícola "La Molina", Lima, Perú, 1947.
- Beemster, A.B.R. "Potato viruses and some remarks on their control" Reprint of Proceeding triennial Conference of the E.A.F.R. 61-78. Bramschweig. 1960.
- De Bokx, J.A. "A Comparison of different methods for testing potato virus Y". Instituut voor Plantenziektenkunding Onderzoek T.Pl.-Ziekten 67 p: 303-306. Wageningen. 1961.
- García Orad, Antonio y Pérez de San Roman, Francisco "Nuevas técnicas de diagnósticos del enrollado y su aplicación al control de la patata de siembra". Separata de Anales (I.N.I.A) Vol.VII, N° 2: 201-262. Madrid. 1958.
- Macarthur, A.W. "Potato Virus S". Scottish Society for Research in Plant Breeding Reprinted from the Annual Report. 1956.
- Paul, H.L. "Investigations on the use of *Gomphrena globosa* for quantitative work". Proceeding of the 2 nd Conference on Potato Virus Diseases: 157-159. Wageningen. 1955.
- Roland, G. "Identifications de virus de la pomme de Terra". Proceeding of the Conference on Potato virus diseases: 31-33. Wageningen. 1952.
- Ronde Kristensen "Potato virus X, serological investigations and other diagnostic methods". Proceeding of the 3 nd Conference on Potato virus diseases: 26-29, Wageningen. 1955.

Sardiña, J.R. Orad A.G. y  
San Roman F.P.

"Some observations about techniques of diagnosing potato leaf-roll virus". Proceeding of the 3 nd. Conference on Potato Virus Diseases: 59-70. Wageningen, 1957.

van Slogteren, D.H.M.

"Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil". Proceeding of the 2 nd Conference on Potato Virus Diseases: 51-54. Wageningen, 1957.

---