

El PSTV un patógeno de importancia en el cultivo de la papa

Resumen

La enfermedad del tubérculo ahusado de la papa es causada por un nuevo patógeno (PSTV Potato Spindle Tuber Viroid), el cual existe en las células hospederas como una molécula de RNA desnuda de bajo peso molecular. Este constituye un problema para los programas de certificación de semillas y las colecciones de germoplasma de papa, porque se transmite a través de tubérculos y semilla botánica, y fundamentalmente de forma mecánica, por medio de instrumentos y maquinarias contaminadas. Esta enfermedad causa pérdidas en los rendimientos entre un 20 - 64 % en dependencia de la cepa en cuestión. Este patógeno ha sido estudiado intensivamente en las dos últimas décadas, resultando en una nueva clase de entidad infecciosa llamada viroide. En este trabajo nos proponemos ofrecer diferentes aspectos sobre la biología y la bioquímica de este patógeno, así como sus principales vías de control.

Palabras Claves: papa, *Solanum tuberosum*, viroide, enfermedad.

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia en el planeta por su alto valor nutricional, constituye el cuarto cultivo alimenticio en orden de importancia a nivel mundial, después del trigo, arroz y el maíz (57).

La producción anual de este cultivo representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todas las raíces y tubérculos. El producto llega a más de mil millones de consumidores en todo el mundo; dentro de este total, figuran 500 millones de los países en vías de desarrollo, cuya dieta básica incluye la papa (41).

La producción mundial de papa se ha mantenido estable a un nivel aproximado de 260 a 270 millones de toneladas desde inicio de la década de los sesenta, actualmente asciende a 275 millones de toneladas y cubre 18 millones de hectáreas, siendo la Federación Rusa y China los primeros productores a nivel mundial.

En Cuba, constituye uno de los cultivos priorizados del Ministerio de la Agricultura, al cual se le dedica aproximadamente 40 millones de dólares anuales, sembrándose cerca de 17000 hectáreas con un rendimiento en la cosecha en la última temporada de 367,950 toneladas solamente precedida en el área del Caribe por México con 1235,050 toneladas (5).

A pesar de las investigaciones que se realizan, la producción de "semilla" para obtener un material de siembra con un alto grado de pureza varietal y calidad fitosanitaria, requiere de una alta exigencia tecnológica, debido a que la papa está expuesta al ataque de hongos, bacterias, virus y viroides. Algunos de estos patógenos habitan en el suelo y afectan su rendimiento; otros son transportados por el aire o por otros medios y causan epifitias que deben controlarse aplicando productos químicos. De todos los patógenos, los más importantes son los causantes de enfermedades virales, ya que se perpetúan en la descendencia clonal.

La introducción y la manipulación de grandes volúmenes de semillas puede traer consigo el establecimiento de plagas y enfermedades, por lo que es necesario desarrollar métodos avanzados para su producción en los países donde además de importarla existan focos de infección viral todo el año y tengan esquemas de producción de semillas hasta 10 años (6).

Los virus tienen una gran importancia económica dentro de este cultivo debido a que son los que provocan las mayores pérdidas de rendimiento y más aún cuando aparecen afectando la planta más de uno (22 y 36).

Además de los virus, que afectan el rendimiento de este cultivo, se encuentran los denominados viroides específicamente el Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) (Enfermedad del Tubérculo Ahusado de la Papa), conocida por ser muy común en Europa, en Norte América y también conocida en la India (38). Esta enfermedad reduce los rendimientos entre 16 - 64 % en dependencia de la cepa del viroide, la variedad de papa y las temperaturas cálidas (76). A pesar de que otros viroides como el TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) causan necrosis en los tallos y las hojas de las plantas (54), el PSTV constituye uno de los más estudiados, por ser ampliamente distribuido en el mundo y afectar uno de los cultivos de mayor importancia en Cuba y el mundo, provocándole grandes pérdidas, además constituye un problema para los programas de certifi-

cación porque es transmitido a través de tubérculos y semilla botánica.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto con este trabajo nos proponemos ofrecer diferentes aspectos sobre la biología y la bioquímica de este patógeno, así como sus principales vías de control.

Historia

Los virus tienen una gran importancia económica en la papa, debido a las pérdidas que le ocasionan. Una baja incidencia (5 - 10 %) causada por una simple infección o proveniente de cosechas anteriores reducen mucho los rendimientos (36), pero una alta incidencia, temperaturas desfavorables e infección severa, causan pérdidas más drásticas en el rendimiento de los tubérculos de este cultivo (22).

Algunos de los virus más frecuentes asociados a la papa, se muestran en la Tabla 1 (55).

TABLA 1. VIRUS ASOCIADOS A LA PAPA

Virus que dependen de la papa para sobrevivir	Virus no dependientes	Indeterminados
PVY	TMV	PSTVd
PVS	TSWV	PYV
PVM	CMV	PDMV
PMTV	TBRV	
PAMV	TRSV	
WAMV	SALCV	
PVT	PYDV	
PLRV	BCTV	
APLV	AMV	
APMV	TNV	
PVV	YSV	
PSV		

FUENTE: Modificado de Salazar (1990).

Las pérdidas de rendimiento debido asociados a algunos virus/viroides en la papa, se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2. PERDIDAS DE RENDIMIENTOS DEBIDO A LOS VIRUS/VIROIDES MAS IMPORTANTES DE LA PAPA

Virus/virolide	Pérdidas (%)	Porcentaje de pérdidas/época
PVY	80	14 - 20 % (otoño) 44 - 57 % (primavera)
PVX	10-50	
PVS	3-20	
PVM	10-30	
PLRV	7 - 60 %	7 - 16 % (otoño) 39 - 60 % (primavera)
PSTV	16-65	
PMTV	26	
PVA	40	
TSWV	10-30	

FUENTE: Modificado de Salazar (1990).

Dentro de las enfermedades que afectan al cultivo de la papa, podemos citar a las causadas por viroides, específicamente el PSTV, clasificada como una de las más peligrosas por afectar en gran medida los rendimientos.

De forma general podemos clasificar a los viroides como una nueva clase de patógenos de las plantas superiores, compuestos por una cadena circular de RNA de bajo peso molecular ($M_r 0.8$ a 1.3×10^{-5}) los cuales sólo utilizan los componentes del hospedero para su replicación. No tienen RNA mensajeros y no tienen genes que codifiquen para la síntesis de polipéptidos *in vivo*. Ellos exhiben estructuras homogéneas de transición y un comportamiento hidrodinámico de sus moléculas de RNA (17 y 35).

Estos difieren de los virus convencionales en varios aspectos, tales como (81):

- 1- Pierden su actividad de RNA, no tienen cubierta protectora normalmente asociada con la supervivencia del virus y no hay traslocación de proteínas.
- 2- Presentan un número muy reducido de nucleótidos (246 aproximadamente), diez veces más pequeños que el más pequeño de los virus conocidos con 2681 nucleótidos.
- 3- Se incrementa a temperaturas (al igual que los síntomas) que oscilan entre 20 - 35°C, lo cual contrasta con los virus que pueden ser erradicados a 37°C (35 y 76a).
- 4- Son patógenos de las zonas meristemáticas, su concentración y traslocación es mayor en las partes en crecimiento, otro aspecto contrastante con los virus es que mediante la escisión de meristemas se pueden obtener plantas libres de virus.
- 5- La retención y multiplicación en los callos es mucho más estable que los virus convencionales. En algunos casos la concentración del viroide en suspensiones celulares han sido mayor que la encontrada en hojas (49).

Los viroides dependen totalmente de los factores del hospedero para su replicación, en contraste con los virus, que presentan una polimerasa viral-específica.

Actualmente se conocen alrededor de 16 tipos de viroides los cuales afectan diferentes cultivos. Por ejemplo: el exocortis de los cítricos (CEVd), que es uno de los más estudiados; la mancha clorótica del crisantemo (CCMud); la mancha solar del aguacate (ASBV) y

Enfermedad
Potato Spindle tuber
Citrus exccortis
Crysanthemun stunt
Cucumber pale fruit
Crysantemun chlorotic mottle
Cocunut cadag-cadag
Hop stunt
Columnea latent
Avocado sunblotch
Tomato apical stunt
Tomato "planta macho"
Burdock stunt
Carnation stunt Car
Apple scar skin
Grapevine
Citron variable

uno de los más difundidos e importantes, que es el PSTVd, que es el viroide de la fusiformidad de los tubérculos de papa (Tabla 3) (82).

TABLA 3. DISTRIBUCION DE ALGUNOS VIROIDES DE IMPORTANCIA, ENFERMEDADES QUE CAUSAN Y FECHA EN QUE FUERON DESCRITOS

Todos estos viroides han sido aislados en preparaciones parcialmente purificadas de ácidos nucleicos, de tejidos de plantas enfermas, donde se han purificado las formas lineales y circulares por electroforesis; además de otros ensayos como son (34):

- tratamiento con RNA-asa,
- tratamiento con DNA-asa,
- tratamiento con fenol y otras sustancias coagulantes de las proteínas,
- análisis del jugo para detectar la presencia de sustancias virales y la observación por el microscopio electrónico y
- análisis del coeficiente de sedimentación.

Fue la importancia económica de la enfermedad del tubérculo ahusado de la papa quien contribuyó al descubrimiento de la naturaleza *viroide* del patógeno, debido al incremento de la incidencia de PSTV observado en los años 50, que provocó pérdidas en un gran número de campos de papa destinados a la producción de semillas, lo que incentivó nuevamente el interés en el estudio de PSTV en los laboratorios de América del Norte.

La enfermedad producida por este patógeno denominada Tubérculo Ahusado de la Papa fue descrita por primera vez por Martin en 1922 (45), aunque desde 1917, Cerner (87) estuvo trabajando en una enfermedad degenerativa que probablemente era el PSTV. En 1923, Shultz y Folsom (66 a y b), demostraron la transmisibilidad de lo que ellos llamaron "**ahusamiento del tubérculo**", ellos atribuyeron su agente causal a los virus, pero en los primeros años de la década del 60 el estudio de esta peligrosa enfermedad fue frenada por particularidades que no eran comunes para virus como son: la ausencia de partículas víricas y actividad antigénica. Sin embargo, en los finales de **los años 60 estaba claro que el agente causal de la enfermedad del tubérculo ahusado, no era un "virus"** convencional.

En 1962, Raymer y O'Brien descubrieron que el tomate era un hospedero adecuado para la producción del PSTVd, permitiendo estudiar detalladamente el círculo de plantas hospedantes (70 a y 71), establecién-

dose que durante la inoculación del PSTV, los síntomas se manifestaron en 28 especies de la familia Solánacea y Compositae, así como otras 129 especies pertenecientes a 12 familias portadoras asintomáticas de la infección (15). En 1967, Diener (10) demostró que el agente causal de esta enfermedad era un RNA libre y que en las partículas virales no estaban presente el tejido enfermo, posteriormente en 1971 llegó a la conclusión usando ultracentrifugación y PAGE (electroforesis en genes de poliacrilamida) que era un RNA de bajo peso molecular y que difería básicamente de los virus convencionales, por lo que determinaron denominarle **viroide** (34).

Actualmente el PSTV es uno de los más estudiados, por las investigaciones conjuntas de virólogos, bioquímicos y biólogos moleculares de los Estados Unidos, Alemania y otros países, fue descubierta la estructura primaria y secundaria, sus propiedades físico-químicas, mecanismos de replicación y patogénesis (34 y 80), además de atraer la atención de otros como médicos y genetistas, resultando en la publicación de numerosos artículos, revisiones y hasta un libro en 1983 (15 y 76 b).

Origen

En opinión de muchos investigadores las enfermedades producidas por viroides, son de origen reciente y su aparición se atribuye a la introducción de métodos intensivos de la agricultura, especialmente los monocultivos. Este razonamiento se aplica igualmente a la mayoría de las enfermedades virales. Ellos también fueron descritos entre los últimos 50 a 80 años, aún cuando su existencia puede remontarse hacia el año 752 n.e. Es probable que los métodos agrícolas modernos e intensivos contribuyan a diseminar inadvertidamente las enfermedades virales a través de la propagación vegetativa de plantas infectadas, pero asintomáticas, a través de tubérculos, injertos de manzanas, cítricos y el corte de crisantemos, entre otras, aunque no son la única vía para propagarlas (33 y 82).

La otra explicación para un posible origen reciente de esta enfermedad es que se haya originado por la introducción accidental de viroides al reservorio de plantas salvajes (16). Este postulado asume que los viroides no causan síntomas en los hospederos nativos o plantas silvestres, pero si lo hacen en cultivos o árboles. Esta hipótesis no está sustentada completamente por evidencias recientes:

el PSTV se manifiesta indistintamente de forma asintomáticamente o con síntomas severos en plantas cultivadas y en aproximadamente 500 introducciones de papas silvestres (53 y 77).

Esta última hipótesis necesita una revisión al considerarse una evidencia importante de que los viroides pudieran ser intrones "*escapados*", los cuales como los RNA pudieran haberse originado más temprano que el DNA (7).

Distribución geográfica

Actualmente el PSTV(d) se encuentra en todos los continentes: en Europa (Gran Bretaña, Bulgaria, Polonia, Hungría, ex-URSS), en América del Norte y del Sur (USA, Canadá, Argentina, Perú), en Asia (India, Corea, China, y Australia) (75 y 82). Existen países como China, en el que esta enfermedad es una importante causa de la degeneración de este cultivo (83), por lo que los chinos están prácticamente obligados a convivir con el viroide, sólo buscan para su control plantas resistentes.

En nuestro país la enfermedad se considera cuarentenada, a pesar de la entrada a Cuba, de material foráneo contaminado, ésta no se encuentra ampliamente distribuida, sino que está concentrada específicamente en las cinco variedades cubanas, 'Josema', 'Jorinca', 'Aninca', 'Marinca' y 'Cubanita'. La variedad 'Candita', que también es cubana, hasta el momento está libre de este patógeno.

Cepas e importancia económica

De los diferentes contratiempos en la producción de papa, los virus constituyen la principal causa ya que provocan grandes reducciones en los rendimientos.

Schultz y Folsom (79) descubrieron dos formas de Spindle Tuber. Una denominada "*unmottled curly dwarf*" que causa daños severos como son achaparramientos de las plantas y agrietamiento de los tejidos, mientras que el PSTV regular produce los mismos síntomas pero con menor intensidad. Más recientemente, se describieron dos cepas de PSTV en el tomate, la "*salvaje*" y la "*severa*" (19).

El efecto del PSTV sobre el rendimiento es ampliamente significativo y ha sido ampliamente estudiado. Los primeros estudios se realizaron con genotipos de papa probablemente infectados con virus latente, pero los dos principales estudios (31 y 70 b) se realizaron

empleando la variedad 'Saco' que es inmune a los virus A, S y X, donde las pérdidas de los rendimientos de la cepa severa fue de 64 %, mientras que con la suave estuvo en un rango que osciló entre 17 - 24 %.

La nocividad de esta enfermedad depende de la cepa, así como de la variedad, condiciones de cultivo y el tiempo. En Europa y Norteamérica, esta enfermedad reduce el rendimiento ampliamente de la papa entre un 16 - 64 %. Esta enfermedad en la década del 20 infectó entre un 3 - 99 % de las plantas en muchos campos cultivados de USA y Canadá. La reducción de la cosecha de papa, afectada con la cepa severa alcanza entre 40 - 90 % (53) y en la ex-URSS, las pérdidas debido a la afectación alcanzó el 5 % del total de la cosecha (42).

Una cepa **severa** pudiera reducir los rendimientos entre 65 - 80 % y una **salvaje**, que es más difícil de detectar visualmente entre 15 - 25 %. Esta enfermedad afecta la calidad gustativa del tubérculo, reduce la formación del almidón, vitamina C y aumentan las pérdidas durante la conservación del tubérculo. La aguda reducción de la capacidad reproductiva de las plantas afectadas, la pérdida de masa del tubérculo y su gran afectación por diversos tipos de pudriciones pueden llevarlos a la *autoeliminación* (48).

Sintomatología

La dependencia del grado de aparición de los síntomas del PSTV debido a las condiciones del cultivo frecuentemente dificulta su detección y estudio a nivel mundial. Sin embargo durante la existencia de condiciones óptimas las variaciones del tubérculo y follaje son del todo característico, lo que permite diagnosticar la enfermedad relativamente fácil, comenzando por la fase de botonización-floración.

Los síntomas dependen de las variedades de papa, las condiciones ambientales, las cepas del viroide y los años de infección; estos síntomas rara vez son evidentes antes de la floración.

Las plantas infectadas son raquílicas y se ven con un severo enanismo, el follaje tiene una apariencia mustia con un oscurecimiento de las hojas, que pueden presentar rugosidad y enrollarse ligeramente (12), hay pequeñas cantidades de tallos ligeramente geniculados, disminuye el crecimiento de las ramas laterales y las hojas más pequeñas salen del tallo bajo ángulos más agudos. Durante la fuerte depresión, la cantidad

de tallos se reduce hasta uno o dos y el arbusto toma forma fusiforme.

Los ángulos entre los pecíolos y los tallos son más agudos de lo normal, se detiene del crecimiento de tallos laterales. En 1922 Martin informa que en plantas irlandesas, la enfermedad se manifiesta por enredaderas que crecen rectas y ramas más pequeñas de lo normal. En 1923 Shultz y Folsom plantearon que en genotipos 'Green Mountain' (66 a) la enfermedad se caracteriza por epinastía y erectés de las plantas y hojas de la papa, y frecuentemente las hojas se tornan más verdes que las hojas saludables, además de una ligera rugosidad en la piel de los tubérculos; estos últimos son anormales (ahusados, cilíndricos) y provisto de ojos con "**cejas**" protuberantes (66 b).

Las hojas enfermas se diferencian de las sanas porque son más pequeñas y estrechas, menos elásticas, más arrugadas, con partes deformadas y reflejan menos la luz. Su color al inicio de la vegetación es verde o verde claro, después de la inflorescencia se tornan amarillas, los botones florales frecuentemente se secan y mueren y rara vez se forman las bayas. La existencia de necrosis en las hojas, tallos, nervios, pecíolos, así como el marchitamiento de las hojas no es común.

Los síntomas son muchos más visibles y severos a altas temperaturas mientras que a bajas temperaturas casi es imposible detectarlos. Bajo condiciones invernales, en casa de cristal es muy difícil detectar la enfermedad de acuerdo a sus síntomas (28), pero cuando se incrementa la temperatura entre 25 - 28°C en los invernaderos, se observan los típicos síntomas aéreos (74 a). Además estos síntomas se acentúan cuando hay gran cantidad de manganeso (72) y cloruro de potasio en la primera mitad de la vegetación.

Tubérculos

En los tubérculos los síntomas varían con las diferentes texturas de los suelos. En los suelos arenosos, los tubérculos son casi normales, mientras que en los más pesados son más elongados (26).

En las plantas enfermas, los tubérculos se forman más tarde, en menor cantidad, menor tamaño, con un aumento de un 20 - 90 % de ojos, son ahusados, alargados e isodiamétricos y sus extremos puntiagudos, además son de color carmelita oscuro (83). La superficie de los ojos comúnmente es más abultada (principalmente en la mitad posterior del tubérculo). Estos tu-

bérculos tienen la sección transversal más circular, la piel lisa y la pulpa quebradiza, rápidamente se pudren y por la luz enverdecen tardíamente. Presentan un período de latencia más largo, se cortan más fácil que los sanos y germinan generalmente con brotes apicales. Los síntomas pueden ser reconocibles entre los 14 - 18 días después de su inoculación en la planta (30).

Los tubérculos enfermos también se diferencian de los sanos porque son más largos y pequeños, frecuentemente carecen de ramificación. Los tejidos de los brotes por lo general se oscurecen y mueren, lo que les da un aspecto sucio, al igual que a los tubérculos.

Los síntomas de la enfermedad en los tubérculos se refuerzan de año en año, cuando la temperatura del ambiente y del suelo son relativamente altas y son acompañados por una humedad relativa muy heterogénea. Los síntomas visibles de la enfermedad en los tubérculos se debilitan cuando la temperatura y la humedad óptima del suelo son óptimas para su formación.

Bajo la influencia de la enfermedad el desarrollo de las plantas varía hacia el lado de maduración tardía en la primera mitad de la ontogénesis y hacia la maduración rápida en la segunda, lo que trae consigo una aguda depresión de las plantas y la reducción de su productividad.

Las cepas **severas** refuerzan más estos síntomas que las cepas **salvajes** donde son pocos visibles, estas últimas predominan sobre la severas en una proporción de 10:1; los síntomas son más severos a temperaturas altas, donde uno de los experimentos es colocarlos en invernaderos (entre 25 - 28°C) para que las plantas manifiesten sus síntomas aéreos.

Transmisión y propagación

Las enfermedades producidas por viroides pueden ser transmitidas de forma natural a través de semillas, polen, óvulos. El PSTVd se transmiten por polen y semillas verdaderas (24). En el pasado la tasa de transmisión por semillas se incrementó considerablemente de menos de un 5 % a un 90 - 100 % cuando algunos árboles infectados se convirtieron en asintomáticos (9 y 85).

A pesar de que los viroides son moléculas desnudas de RNA ellos se transmiten de forma mecánica a las plantas, a través de instrumentos y maquinarias de cultivo (81). Por ejemplo el PSTV puede ser transmitido por realizar cortes en un tubérculo sano con un cuchi-

llo previamente usado en uno infectado (27). En un estudio se demostró que el 100 % de las plantas fueron infectadas por un contacto excesivo de maquinarias y tuberías contaminadas con PSTV en plantas sanas. Esta transmisión es posible también a través de los jugos de las plantas infectadas, cuando se mutilan sus hojas (21). Entre un 80 - 100 % de la infección fue registrada por el roce entre plantas sanas y enfermas (44).

La transmisión del PSTV además ocurre vía semilla sexual o verdadera, en papa y tomate, la cual es la principal posibilidad de transmisión del viroide en las regiones y países, donde la enfermedad no ha sido informada anteriormente (34). En 1970 se informó un 11 % de transmisión a través de la semilla verdadera de papa (69), pero un año antes se obtuvo de un 87 - 100 % de transmisión a través de la semilla "**verdadera**" cuando ambos parentales estaban infectados (32). La tasa de infección no parece estar correlacionada con la variedad o edad de la semilla (3, 20, 69).

La propagación de la enfermedad a través de insectos vectores no es común, aunque experimentalmente pudieran ser transmitidos por áfidos. En un trabajo se demostró que la transmisibilidad del PSTV por el áfido *Myzus persicae* ocurre en plantas testigo y en la papa cuando las plantas que son fuentes de inoculación están doblemente infectados con PLRV y PSTV, pero no en el caso de que la fuente de inoculación contuviera sólo PSTV. Además se observó que la presencia de PSTV en el cuerpo de los áfidos no se pierde después de varios pases en plantas saludables, parece que el PSTV se encapsula en las partículas de PLRV.

El PSTV puede ser también transmitido por el áfido *Macrosiphum euforbiae* en la papa y el *Myzus persicae* en plantas de tomate con una frecuencia inferior al 6 % (8, 63).

Más débilmente, pero suficientemente exitoso, se transmite el viroide por injertos; menos exitoso, particularmente en condiciones de campo, la infección se transmite mediante la inoculación con jugo obtenido de plantas enfermas (frotando los cortes frescos de tubérculos o aspersión de las plantas y tubérculos germinados con jugos infecciosos).

La resistencia de las plantas a la infección se incrementa con el envejecimiento de las mismas (infectada o infectora), reducción de la humedad, intensidad de la luz y fertilidad del suelo (34).

Características físico-químicas

- 1- Es una molécula de RNA monoespiral cerrada covalentemente, compuesto por 359 nucleótidos con gran cantidad de bases apareadas lo cual determina su P.M. entre 100 - 130 KD, por eso precipita durante la ultracentrifugación, es circular y carece de cubierta protectora, no se conocen proteínas sintetizadas por él (63, 89).
- 2- El RNA no actúa como mensajero en el PSTV, él toma del hospedero y las sustancias necesarias para su mecanismo de replicación.
- 3- La infecciosidad se mantiene durante el tratamiento con fenoles, alcohol y en condiciones en las cuales se inactivan otros virus.
- 4- Varios tipos de purificación fueron ensayadas en los años 60 dando resultados contradictorios, algunos por ejemplo, obtuvieron que el PSTV en Nebraska fue causado por una cepa del virus X (4, 67); otros, que el desarrollo de un antisero contra él que reaccionó en una solución de plantas con PSTV no fue efectivo en una solución con PVX (1). Otro resultado fue que todo el ácido nucleico obtenido, era una nucleoproteína y en otras preparaciones a partir de tejidos de papa y tomate estaban casi libres de proteínas, además fueron considerablemente más infecciosas que el extracto crudo, susceptible a la ribonucleasa y altamente estable a la inactivación térmica (68).
- 5- Las moléculas de PSTV según la microscopía electrónica, tienen forma de bacilo alargado con un largo de 31 - 37 nm, además se encontraron moléculas anilladas que desnaturalizadas midieron 100 ± 6 nm (64).
- 6- La molécula de RNA puede presentar diferentes formas: en *Scopolia sinense* se han observado tres picos infecciosos diferentes (73), pero no se han realizado estudios para determinar su peso molecular ni han sido observadas por el microscopio electrónico. En tomate se han detectado dos formas, una lineal y otra circular a través del microscopio electrónico (64), aunque existe la contradicción en la cantidad relativa de ambas formas; algunos autores plantean que menos del 1% es lineal (63). Ambas formas han sido separadas, predominando la lineal sobre la circular en una proporción de 4:1, pero el carácter infeccioso de la lineal todavía se cuestiona.

- 7- La inactivación térmica determinada en el jugo infeccioso se produce entre 75 - 80°C y en proporciones tratadas con fenol entre 90 - 100°C, la conservación *in vitro* es a 4°C durante 4 ó 5 días; a -20°C el material vegetal fue infeccioso hasta 5 años.
- 8- No reacciona ante la DNA-asa y si ante la RNA-asa.
- 9- Composición, estructura primaria y replicación:
La secuencia de nucleótidos y la naturaleza del PSTV purificado han sido determinadas:
A:U- 29% (25)

G:C- 58 %
G:U- 13 %

No presentan cadenas poly A o poly C (29) como resultado del apareamiento intramolecular, el reordenamiento de las secciones de la doble hélice y los lazos internos forman una única estructura secundaria en forma circular.

La composición de nucleótidos es:

- 73 x AMP 20.3 %
- 77 x UMP 21.4 %
- 101 x GMP 28.1 %
- 108 x CMP 30.1 %

para un total de 359 nucleótidos.

Este viroide va a servir de modelo para formar una segunda y una tercera clase de viroides, diferenciados por su estructura, que son: ASBV y ASSV, como modelos y el cuarto grupo representado por el HLV.

Todos ellos contienen una hélice central

CCCCGG

GGUGGCG

y un segmento de oligonucleótidos que están en la misma posición relativa, aproximadamente 35 nucleótidos a partir del terminal 5' de la

U A

secuencia conservada GGA CCC CGGGG AAA
(35).

G C

La primera región interviene en el control de la replicación y la otra región esta relacionada con la expresión de los síntomas. **Replicación:** Los viroides para su replicación utilizan el modelo del círculo rodante (58), en el cual las cadenas multiméricas son sintetizadas copiando un cebador circular. Conceptualmente, este pro-

ceso es análogo a las reacciones de procesamiento (clivaje-ligamiento).

Diagnóstico y purificación

Las técnicas utilizadas para la detección y diagnóstico de plantas con virus y/o viroides pueden ser ampliamente distribuidas en cuatro categorías:

- **Biológicas:**

Fundamentalmente mediante el uso de plantas indicadoras. Estas pruebas son apreciables pero requiere de suficiente espacio, trabajo y tiempo.

- **Biofísicas:**

Se encargan de determinar su forma, tamaño, peso molecular, propiedades de la savia, inactivaciones con diferentes enzimas y productos; pero tienen como inconveniente que no identifican el virus o viroides, pero si establecen las diferencias entre ellos.

- **Bioquímicas:**

Dan la mayor información para la identificación del viroide o virus, aquí se aplican ensayos como electroforesis de geles de poliacrilamida, análisis de los ácidos nucleicos, entre otras.

- **Inmunológicas:**

Indispensables, principalmente el ELISA, son además muy seguras, rápidas y eficientes aunque no aplicables al PSTV por la ausencia de proteínas.

A menudo se combina más de una técnica para el diagnóstico de virus y viroides (2, 39).

En el caso del PSTV se informan diferentes pruebas biológicas, como son:

- Para el PSTV existen otras especies de la familia Solanácea como son el tomate, scopolia, tabaco y otros y cerca de 140 especies de otras familias, pero el empleo de scopolia y el tomate son las que han dado los resultados más positivos (14).
- Los primeros ensayos fueron realizados por Rymer y O'Brien utilizando el tomate (*Lycopersicum esculentum*) en variedades 'Rutgers' fundamentalmente, 'Shevone' y otras variedades se han incorporado al igual que las cubanas, 'Kubanskií', 'Shtambovii' y otras.
- La inoculación de estas plantas se realiza con el jugo de las plantas analizadas o aislamientos de RNA de ellas. Antes de la inoculación las hojas se polvorean

con Carborundum 600 Mesh, adicionándole además bentonita para inhibir la actividad de las nucleasas, aplicando de una a dos gotas del inóculo en dependencia del tamaño de la hoja (52).

La inspección visual para detectar las plantas enfermas no es confiable puesto que los síntomas pudieran estar enmascarados o ausentes (53).

La variedad 'Rutger' ha sido empleada como un indicador bastante fidedigno pero el tiempo requerido para el desarrollo de los síntomas y la severidad son dependientes de la cepa de PSTV y las condiciones ambientales (47, 88). También se describe una cepa **salvaje** que no produce síntomas en esta variedad y sólo puede ser detectada por protección cruzada (19).

Estos bioensayos son afectados por temperaturas superiores a los 25°C. Los síntomas de la enfermedad son más severos en el follaje, estas temperaturas no sólo incrementan los síntomas del PSTV, sino que aumentan el título del viroide sintetizado en la planta, por lo que las plantas inoculadas se mantienen a 30°C hasta la aparición de los síntomas y la intensidad luminosa debe ser alta también (8000-14000 lux) (23).

Los síntomas se manifiestan como promedio a los 20 - 30 días después de inoculadas las plantas con el viroide, pero depende además de la cepa en cuestión, como regla general se observan sólo en las hojas por encima de las inoculadas, además las plantas que estén infectadas con cualquier cepa desarrollaran albinismo, en algunas ocasiones se observan necrosis, se detiene del desarrollo del brote y enanismo, los frutos son pequeños y frecuentemente sin semillas. Del 7 - 10 % de las semillas que se forman pueden estar infectadas.

Scopolia sinensis muestra lesiones locales y necrosis sistémicas, estas aparecen en formas de manchas pardas con distintos visos y límites imprecisos en las ramas laterales, tallos y pedúnculos de las hojas.

La manifestación sistémica se manifiesta como promedio entre los 20 - 35 días después de inoculadas en más de un 90 % de las plantas inoculadas. Estas desarrollan mejor los síntomas a temperaturas e intensidad luminosa más bajas, entre 18 - 21°C y 2000-4000 lux.

Detección por electroforesis R-PAGE

Debido a su forma circular y conformación, ha sido desarrollada la técnica de **electroforesis bidimensio-**

nal en geles de poliacrilamida, forma modificada denominada **Return** (65, 78), donde éste ha sido detectado en semillas verdaderas de papa y tubérculos en dormancia (79 a). Al principio el método requería varias etapas para extraer los ácidos nucleicos de bajo peso molecular, lo que hacía difícil su aplicación en gran escala. Posteriormente el método fue modificado, reduciéndose de cuatro a dos días y posteriormente a varias horas (62). En la R-PAGE, los ácidos nucleicos se someten a dos corridas electroforéticas, la primera bajo condiciones nativas (el extracto de RNA), donde los RNA se separan según su tamaño y la segunda, bajo condiciones desnaturalizantes (por incremento de la temperatura de 60 - 70°C y cambiando la fuerza iónica del buffer de corrida), aquí las moléculas circulares del viroide pierden su estructura primaria y retardan desproporcionalmente su migración en el gel; por otro lado los RNA que no presentan esa forma circular, porque no están cerrados covalentemente, se convierten en lineales y se mueven más rápidamente que las bandas del viroide. Aquí las bandas más bajas representan la forma circular solamente.

Este método a pesar de detectar el PSTV en muestras de semillas y en pequeñas cantidades de tejidos, es muy laborioso y caro, además otro factor limitante es la temperatura, ya que este viroide alcanza una concentración alta, detectable por electroforesis cuando las plantas han crecido a temperaturas superiores a los 25°C y aunque se han usado mucho en las últimas décadas, actualmente se emplean métodos más confiables y factibles.

Hibridación de ácidos nucleicos (NASH)

La hibridación de ácidos nucleicos (NASH) fue introducida por primera vez en 1981 (51) y en estos momentos se ha convertido en la más selectiva del mundo para la detección de viroides como el PSTV (37), haciéndose trabajos a gran escala para su detección (86), donde se analizaron más de 1000 muestras de papa por métodos biológicos e hibridación, dando resultados similares en un amplio rango de variedades. En 1993 se desarrollaron estas técnicas para la detección de viroides que implican la hibridación del ácido nucleico del viroide con su ADN complementario (39).

Esta técnica se basa en la propiedad que poseen los ácidos nucleicos de aparearse con sus moléculas

complementarias en determinadas condiciones. Se basa en la unión del ácido nucleico del genoma del patógeno, que previamente se fijan en un soporte, con moléculas marcadas radioactivamente o no, y sintéticas (p32 y dioxigenina, cDNA o cRNA), que son las denominadas sondas. Esta propiedad se ha utilizado en laboratorios para realizar hibridaciones de ácidos nucleicos en soluciones, este tipo de reacción se ha podido hacer sobre membrana de nitrocelulosa y de otros materiales capaces de fijar los ácidos nucleicos. La unión de las dos moléculas (hibridación) hace que se formen manchas en la membrana demostrando la existencia del patógeno.

Este método reemplaza gran cantidad de técnicas convencionales, el tiempo de conservación de la muestra es mayor y se pueden enviar a grandes distancias, además en estos momentos es la técnica más selectiva para la detección de viroides, a pesar del relativo corto tiempo de vida, además posee una ventaja sobre la electroforesis, ya que se puede determinar en presencia de que cepa nos encontramos (*severa* o *salvaje*), ya que difieren en algunos nucleótidos reflejándose en la posición relativa de las bandas.

Otras técnicas se han derivado como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha sido usada en el estudio y diagnóstico de muchos patógenos virales con DNA como genoma (61), sin embargo la mayoría de los patógenos virales y subvirales de plantas de importancia tienen ARN como genoma (43), por lo que uno de los métodos más empleados para identificar estos patógenos de importancia es combinada con la reverso transcriptasa (RT-PCR) (84).

Variaciones anatomo-fisiológicas producidas por el PSTVd (34)

1- Actividad fermentativa:

Hay reducción temporal de la actividad de las peroxidasas alargándose de 7 - 14 días en dependencias de las condiciones de cultivo de las plantas, después esta actividad se eleva entre un 20 - 90 % más que en las plantas sanas. Durante la inoculación de la papa y del tomate con otros virus esta depresión inicial de la actividad peroxidasa no se observó.

2- Intercambio acuoso:

Hay variación significativa del intercambio gaseoso en las plantas infectadas, por la amplificación de la intensidad transpiratoria durante el día (45-130 %) en

comparación con las plantas sanas, esto conlleva a la reducción de su hidratación, alterando muchos procesos en la planta, además esto está relacionado con la alteración del movimiento de los estomas; los cuales incluso en las horas más calurosas del día no se quedan abiertos en gran cantidad y grado, comparados con las plantas sanas.

3- Clorofilas y carotenoides:

Se reducen las clorofilas y el contenido de carotenoides se incrementa sensiblemente en el año de infección. Las hojas de las plantas enfermas contienen significativamente mayor cantidad de azúcares y almidón. El retardo del reflujo de los hidratos de carbono está relacionado con la reducción de las actividades amilasas, particularmente β -amilasa.

4- Anatomía:

Engrosamiento de las láminas foliares en la envoltura porosa de células del mesófilo, hay variaciones en la estructura interna del pecíolo, el xilema está fuertemente desarrollado y más débil el floema, el nucleolo también está aumentado.

Cambios citopatológicos inducidos por PSTV en *Scopolia sinensis*

En las hojas de esta planta los síntomas más comunes fueron la proliferación en la membrana citoplasmática en forma de disco o vesícula de variados tamaños. En estas membranas, los tonoplastos y el retículo endoplasmático se encontraron depósitos electro-densos a diferencia del plasmalema donde raramente se vio.

Existen formas amorfas electrodensas (47 %) en las vacuolas, éstas se encuentran también en el tejido sano, pero en muy baja proporción (3 %), además aumentaron considerablemente a medida que se acercaron a las zonas donde se ubicaron las lesiones locales. Las células parenquimáticas estaban llenas de cuerpos electro-densos, mayoritariamente de forma ovalada o esférica, interconectadas a través de fibrillas, no encontradas en tejidos sanos. No se observaron marcados cambios citopatológicos en los órganos.

Prevención, erradicación y control

El control de PSTV es costoso, ya que requiere de procedimientos y equipos sofisticados, por lo que su

erradicación se hace impracticable en países como China, donde está diseminado, los cuales están trabajando en la incorporación de resistencia al PSTV en sus genotipos de papa (30), a pesar que en *Solanum acaule* (bit) se encontró resistencia aunque no haya detalles exactos (53).

En 1984, se observó que en distintos clones de *Solanum berthaultii* difirieron en su comportamiento frente al PSTV, unos clones parecían ser hipersensibles, mientras que otros mostraron síntomas necróticos o fueron completamente asintomáticos, encontrándose dos clones resistentes (69).

La infección y ensayos de diagnósticos llevados a cabo por cuarentena con técnicas modernas, previo a la liberación de las distintas variedades, protege al cultivo del peligro de introducción y propagación de este viroide.

Otra forma de evitar su propagación es reemplazar la semilla de papa por tubérculos limpios y certificados, así como la separación de las plantaciones de tubérculo-semilla de las de consumo, también la utilización de otros cultivos como barreras, es una medida que también contribuye a evitar su propagación, al igual que evitar el contacto mecánico entre las maquinarias del agricultor, los surcos de plantas, mediante el empleo de una distancia de siembra adecuada.

Se deben alejar lo más posible las personas y animales del campo, evitar los períodos de áfidos vectores o que su población se mantenga por debajo de cierto nivel crítico.

La limpieza temprana (antes del cerrado del follaje) en combinación con el aislamiento, además de una recogida temprana, limita la propagación de la infección. En algunos informes, se demostró que el PSTV fue erradicado de áreas donde estuvo presente una vez, plantando semillas de alta calidad libre del viroide y aplicando las regulaciones para la certificación de semilla y el uso de métodos sensitivos de testaje para prevenir la reintroducción del viroide en el cultivo (79 b).

La desinfección juega un importante papel en la prevención de la enfermedad. El hipoclorito de sodio al 2 - 3 % es efectivo en la inactivación del PSTV de la maquinaria agrícola utilizada (60, 79, 80). El uso de piperonilbutóxido al 1%, que es un insecticida, previene la infección con PSTV en *Scopolia sinensis* cuando se asperjan las hojas aunque en extensiones muy grandes no es efectivo.

El flameado, que es efectivo para otros virus sumergiéndolo en alcohol al 95 % aquí no es tanto, ya que este viroide es muy inestable a la inactivación por calor, permanece infestivo 3 horas a 120°C y sólo el uso de hipoclorito al 2-3 % en los instrumentos de laboratorio ha sido efectivo para su eliminación (79 b, 80).

En los 70 plantearon la posible erradicación por termoterapia y cultivo de yemas axilares aunque se obtuvieron muy pocas plantas libres del viroide (81), actualmente se conoce que las plantas que fueron tratadas con calor existe una alta concentración del mismo, esto conllevó al tratamiento en frío antes de la escisión de los meristemos, cuando las plantas madres han brotado entre 6-10°C de dos a cuatro meses aproximadamente, el porcentaje de plántulas sanas que se obtuvieron fue bastante elevado (62).

También se han realizado estudios de inhibición del viroide por expresión de RNA en plantas transgénicas, donde se logró disminuir su concentración, incorporando el RNA en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (46).

Pero sólo el tratamiento con bajas temperaturas, basadas en las experiencias anteriores de los tratamientos con calor, además de un experimento llevado a cabo en Fredericton, Canadá, donde tubérculos sobrantes de la cosecha que quedaron en el campo a condiciones climáticas muy duras con temperaturas que oscilaron entre 13.1 - 15°C entre los meses de octubre a febrero, quedaron libres del PSTV.

Para este experimento se tomaron diferentes tejidos vegetales de dos cultivares, esos tejidos fueron tomados de hojas y tubérculos infectados con el viroide, estos tejidos se expusieron a diferentes ciclos de congelación - descongelación bajo condiciones controladas. La congelación se realizó a -18°C y -20°C de 12 - 18 horas y la descongelación a 5°C por 6 horas para completar un ciclo. Después de 4 ciclos no se detectó PSTV por R-PAGE y DOT-BLOT en los tubérculos; pero en las hojas después de tres ciclos el patógeno persistió.

Bibliografía

- 1- Bagnall, R. H., 1967. Serology of the potato spindle tuber virus. *Phytopathology* 57: 533-534.
- 2- Ball, T. C. y col. 1974. *Virology* 61:486-492.
- 3- Banthri, E. E. y col. 1993. Potato Health Management. Ed. Randall C. R., p. 178.

- 4- Benson, A. P. and R. P. Singh. Seed transmission of potato spindle tuber in tomato. (Abstr) *Am. Potato J.* 41:294.
- 5- Boletín Acción Regional del Precodepa fase 1994-1997.
- 6- Cultivo de tejido en la agricultura Fundamentos y aplicaciones. Edits Wiliam M Roca, Luis A M roginski, CIAT, Cap. 19 "Cultivo de tejido para la producción de semilla básica de papa", 1991.
- 7- Darnell, J. E. and Doolittle, W.F. 1986. Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1271.
- 8- De Bokx, J. A. and Piron, P. G. M., 1981. Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Neth. J. Plant Pathol*, 87,31.
- 9- Desjardins, P. R. 1987. Avocado sunblotch. In "The viroids". Ed. T.O. Diener, p.299-313, Plenum Press, New York.
- 10- Diener, T.O. and Raymer, W.B., 1967. *Science* 158: 378-381.
- 11- Diener, T.O. and Raymer, W.E., 1971b. Commonw Mycol. Inst./ Assoc. Appl. Biol.Des. Plant viruses, No. 66, p. 4.
- 12- Diener, T.O. 1971. Potato Spindle Tuber "virus".I.V. A Replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45: p. 411-428.
- 13- Diener, T.O. 1972. *Virology* 50: p. 606-609.
- 14- Diener, T.O., Hadidi, A., Owens, R.A. 1977. Method for studying viroids. *Methods in Virology* 6: 185-217.
- 15- Diener, T.O. 1979. Viroids and viroid diseases. A wiley-interscience Publication. New York-Toronto.
- 16- Diener, T.O. 1983. Viroids. *Adv. Virus Res.*, 28, 241.
- 17- Diener, T.O. 1987. The Viroids. Plenum Press, New York, 344p.
- 18- Diener, T.O. 1991. Subviral pathogens of plants. Viroid and viroidlike satellite RNAs. *Fase B, J*, 5: 2808-2813.
- 19- Fernow, K. H. 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology* 57:1347-1352.
- 20- Fernow, K. H., Peterson, L.C. and Plaisted, 1970. Spindle tuber virus in seed and pollen of infected potato plants. *Am. Potato J.* 47:75-80.
- 21- Folsom, D., 1923. Potato Spindle tuber. Maine. *Agr. Exp. Sta. Bull.* 312.
- 22- Garg, Y. D. Degeneration of potato varieties in western Maharashtra. *J. Indian Potato Assoc.* 14:127-128.
- 23- Gransmick, M E. and Slack, S.A. 1985. Symptom Expression Enhanced and low concentration of PSTV amplified in tomato with high light intensity temperature.
- 24- Gransmick, M.E. and Slack, S.A., 1986. Effect of Potato Spindle Tuber viroid on sexual reproduction and viroid transmission in true Potato seed. *Can. J. Bot.*, 64, 336.
- 25- Gross, H. J., *et al.*, 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of Potato Spindle Tuber Viroid. *Nature (London)* 273, 203.
- 26- Goss, R.W. and Deltier, G.L. 1925. Further studies on the effect of environment on potato degeneration diseases. *Neb. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.*, 29:1-32.
- 27- Goss, R.W., 1926. Transmission of potato tuber disease by cutting knives and seed pieces contact. *Phytopathology* 16: 299-304.
- 28- Goss, R.W., 1930. The symptoms of spindle tuber and unmottled curly dwarf of the potato. *Neb. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.*, 47.
- 29- Hadidi, A., Modak, M. J. and Diener, T.O., 1977. Synthesis of DNA transcripts of PSTV. *FEBS. Lett* 75: 123-127.
- 30- Hooker, W.J., 1981. Compendium of potato disease. American Phytopathology Society. CIP. p.89.
- 31- Hunter, J.E. and Rich, A.E., 1964. The effect of potato spindle tuber virus on growth and yield of Saco potatoes. *Am. Potato J.* 41 : 113-116.
- 32- Hunter, J.E., *et al* 1969. Seed transmission of potato spindle tuber virus. *Am. Potato J.* 46 : 247-250.
- 33- Inouye, T. and Osaki. T., 1980. The first record in the literature of the possible plant viroid disease that appeared in "Manyoshu" A Japanese classic anthology, as far back as the time of VIII century. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 46, 19.
- 34- Indicaciones metodológicas para el diagnóstico e identificación de los viroides de la fusiformidad de los tubérculos de papa, 1989.

- 36- Keese, P. and Symons, R. H., 1987. The structure of viroids and virosoids in "Viroids and Viroid-like pathogens" (J. S. Semancik, Ed) pp 1-47. CRC Press Inc. Boca Ratón Fla.
- 37- Khurana, S. M. Paul. and M.N. Singh. 1988. Yield loss potential of potato viruses X and Y in indian potatoes. **J. Indian Potato Assoc** 15 27-29.
- 38- Khurana, S. M. P. *et al.* 1990. Proc. Symp. Genetic Eng. Tissue Culture for Crop Pest and Disease Management, TNAU Coimbatore, June , I . 30-31 (abstr).
- 39- Khurana, S.M.P.1989. PSTV and other viroid - like infection in solanaceous plant in Shimla hills. Proc . Indo-US work workshop on viroids and diseases of uncertain etiology, IARI , New Delhi, nov 15-18, p p 8-9 (abstr).
- 40- Khurana, S.M.P. and Garg, L.D. 1993. Vol 7. Potato (eds. K.L. and Grewal, J.S), Malhotra Publ. House, New Dheli, P P 529-566.
- 41- Korschinerk , I. *et al.* 1991. **J. Virol. Methods** 31,139-146.
- 42- Leontieva, Y.; Veretenovidnost, A. 1971. Kiubnisi (gotika)- odno 12 esnovnij virusnij zabolievanii Kaetofelia v Ppovoizhe. Autoreferat de Ktoskoi dissertatsii , Pushikin, ,
- 43 - La papa en la década de 1990. Situación y perspectivas de la economía de la papa a nivel mundial. Centro Internacional de la Papa, Organización de las Naciones Unidas, para la agricultura y la alimentación. Roma,1995.
- 44 - Langeleved, S. A. *et al.* 1991. **J. Virol. Methods** 72: 1531-1541.
- 45- Matthews, R. E. F. 1991. Plant Virology, 3th ed ; Academic Press, New York, 835 pp.
- 46- Martin, W. H. 1922. Spindle tuber a new potato trouble. Hints to potato growers. New Jersey State Potato Assoc. 3, No. 8.
- 47- Matouse, J. *et al.* 1994. Inhibition of viroid infection by antisense RNA expression in transgenic plants . **Biol. Chen. Hope Seyler** 375: 775-777.
- 48- Morirs, T.J. and Smith, E. M. 1977. Potato Spindle Tuber disease. Procedures for the detection of viral RNA and certification of disease- free Potato tubes. **Phytopathology** 67. 145-150 .
- 49- Muhlback, H.P., Faustmann, O. and Sanger, H.L. 1983. Conditions for optimal growth of PSTV infected potato cell suspension and detection of viroid complementary longer than unit lenght RNA in these cells. **Pl. Mol. Biol.** 2 . 239-247.
- 50- Nicolas, O. and Laliberte, J. F. 1991. **J. Virol. Methods** 32. 57-66.
- 51- Owens, R. A. y Diener T. O. 1981. **Sciens** 213: 670-672.
- 52- Owens, R.A.; Khurana, S. M. P. *et al.* 1992. A new mild strain of PSTV isolated from wild *Solanum ssp.* in India. **Plant Dis.** 76 527-529.
- 53- Pfannestiel, M. A. and Slack S. A. 1980. Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid. **Phytopathology** 70. 922-926.
- 54- Phadtare , S.G. , Khurana , S.M.P., Garg , I.D. and Bhardwaj, 1989. Stem necrosis a viral disease of potatoes in Central India. **J. Indian Potato Assoc.** 16. 164-165 (Abstr).
- 55- Potato Viruses and Viral Diseases. 1992 . Technical Bulletin No 35 De. by S. M. Khurana
- 56- Raymer , W. B. and O'Brien, M..J. 1962. Transmission of potato spindle tuber virus to tomato. **Am. Potato J.** 39. 401-408.
- 57- Rhodes, R.E. 1982. The Incredible Potato. **Natl. Geographic.** 161. 668-694.
- 58- Robertson, H. D. and Branch, A. D. 1987. The viroid replication process. In Viroids and Viroid-like Pathogens edt J.S. Samancik pp 49-69. CRC. Press Inc., Boca Raton , Florida.
- 59- Robertson, N. L. ; French, R. and Gray, S. 1991. **J. Gen. Virol.** 72. 1473-1477.
- 60- Roistacher, C. N. , Calavan, E. C. and Blue, R.L. 1969. Citrus exocortis virus chemical inactivation on tools, tolerance to heat and separation of isolates. **Plant Dis. Reprtr.** 53. 333-336.
- 61- Rybicki, E. P. and Hunges, F. L. 1990. **J. Gen. Virol.** 71. 2519-2526.
- 62- Salazar, L. F. *et al.* 1982. En Hooker, W.J. pp 118-119.
- 63- Sanger, H.L., Klotz, G.; Riesner, D.; Gross, H. J. and Kleinschmith, N. K. 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecular existing as highly base-paired rod-like structures. Proc. Natl.

- 64- Sanger, H. L. 1982. Biology, Structure, function and possible origin of viroids, in Singh, R.P., A.P. Benson and F. M. Saloma, 1966. Purification and electron microscopy of potato spindle tuber virus (Abstr.). *Phytopathology* 56: 901-02 Encyclopedia Plant Physiology, Nucleic Acids and Proteins in Plants II, Parthies, B. and Boulter, D. Eds., New series 148, Springer. Verlag., Berlín, 368.
- 65- Schumacher, J., Meyer, N., Reisner, D. and Wein-deman, H. L. 1986. Diagnostic procedures for detection of viroids and viruses with circular RNAAs by "Return"- gel electrophoresis *J. Phytopatology* 115: 332-342.
- 66a- Schultz, E. S. and Folsom, D. 1923. A "Spindle Tuber" disease of irish Patotoes. *Science* 57:149.
- 66b- Schultz, E. S. and Folsom, D. 1923. Trans-mission, variation and control of certain degeneration diseases of irish potatoes. *J. Agr. Res.* 25: 43-117.
- 67- Singh, R. P., Benson, A. P. and Saloma, F. M. 1966. Purification and electron microscopy of potato spindle tuber virus. (Abstr). *Phytopathology* 56: 901-902.
- 68- Singh, R.P. and Bagnall, R. H. 1968. Infectious nucleic acid from host tissues infected with potato spindle tuber virus. *Phytopathology* 58:686-699.
- 69- Singh, R. P. 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *Am. Potato J.* 27:225-227.
- 70a- Singh, R.P. and Clark, M. C. 1971. Infectious low-molecular weight ribonucleic acid from toma-to. *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 44:1 1077-1082.
- 70b- Singh, R. P., Finnie, R. E. and Bagnall, R.H. 1971. Losses due to the potato spindle tuber virus. *Am. Potato J.* 48:262-267.
- 71- Singh, R. P. and Finnie, R. E. 1973. Seed trans-mission of potato spindle tuber metavirus through the ovules of *Scopolia Sinensis* . *Can. Plant. Dis. Surv.* 53:153-154.
- 72- Singh R. P.; Lee, C. R. and Clark, M. C. 1974. Manganese effect on the local lesion symptom of potato spindle tuber "virus " in *Scopolia Si-nensis*. *Phytopathology* 64:1015- 1018.
- 73- Singh R. P.; Michniewicz, J. J. and Narang, S. A. 1976. Separation of potato spindle tuber vi-roid ribonucleic acid from *Scopolia Sinensis* into three infectious form and purification and oli-gonucleotide pattern of fraction II RNA. Part IX Can. *J. Biochem* 54: 600-608.
- 74a- Singh, R. P. 1977. Infectivity of potato spindle tuber viroid in potato plant parts. *Phytopathology* 67: 12-15.
- 74b- Sing, R. P. 1977. Piperonil butoxideas a protec-tat against potato spindle tuber viroid infection. *Phytopathology* 67: 933-935.
- 75- Singh, R.P. 1979. Potato Spindle Tuber Viroid. *JIPA* 6 (1): 20-35.
- 76a- Singh, R. P. 1983. Viroids and and their poten-tial danger to the potatoes in hot climates. *Can. Plant Dis. Surv.* 63:13-18.
- 76b- Singh, R. P. 1984. Bibiliography of viroid rewiew through 1983. *Can. Plant Dis. Surv.* 64: 15.
- 77- Singh, R. P. and Slack, S. A. 1984. Reactions of tuber bearing *Solanum* species to infection with potato spindle tuber viroid. *Plant Dis.*, 68, 784.
- 78- Singh, R. P. and Boucher, A. 1987. Electropho-retic separation of severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* 77: 1588-1591.
- 79a- Singh, R. P.; Boucher, A. and Seabrook, J. E. A. 1988. Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from single true potato seed by return electrophoresis. *Phytopathology* 77:1588-1591.
- 79b- Singh, R. P. ; Dehaan, T. L. and Jaswal, A. S. 1988. A survey of the incidence of potato spindle tu-ber viroid in Prince Eward Island using two tes-ting methods. *Can. J. Plant Sci.* 68: 1229-1236.
- 79c- Singh, R. P. and Boucher, A. 1988. Loss of pota-to spindle ruber viroid from tuber tissues after repeated freezing. *Can. J. Plant Sci.* 69: 121-123.
- 80- Singh, R. P.; Boucher, A. and Somerville, T. H. 1989. Evaluation of chemicals for disinfection of laboratory equipment exposed to potato spindle tuber viroid. *Am. Potato J.* 66: 239-245.

Humberto Izquierdo Oviedo

*Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana
Dimitrova" Universidad de La Habana.*

- 81- Singh, R. P. 1989. Plants Viroids : A biochemical novelty. Chapter 8 Volume 1: Structure and Replication .
- 82- Singh, R. P , 1990. Techniques in the study of viroids diseases of tropical and subtropical plants. Review.
- 83- Singh, R.P. and Khurana, S. M. P. 1993. Advances in Horticulture. Vol 7. Potato Viral and all disease of potato. (Eds. K.L. Chandra et al).
- 84- Tien, P. and Chen, W. 1988. Studies on apple scar skin viroid. In Abstracts of Papers, Yamashita Viroid Diseases Workshop, Possible Viroid Etiology and Detection. pp 18-26.
- 85- Vush, R; Rosner, A; and Stein, A. 1990. **Ann. Appl. Biol.** 117: 561-569.
- 86- Wallace, J. M. and Drake, R. J. 1962. A high rate of seed transmission of Avocado sunblotch virus from symptomless trees and the origin of such tree. **Phytopathology** 52: 237-241.
- 87- Welnicki, M. and Hiruki, C. R. 1992. J. Virol. Methods 39:91-99.
- 88- Werner, H. O. 1924. Spindle tuber , the cause of runout potatoes "Nebraska". **Potato Improv. Assoc.** 6 : 57-59.
- 89- Yang, T. C. and Hooker, W. J. 1977. Albinism of potato spindle tuber viroid infected **Rutgers** tomato in continuous light. **Am. Potato J.** 54: 519-530.
- 90- Zaitlin, M. and Hariharasubramanian, V. 1972. Agar electrophoresis analysis proteins from plants infected with tobacco mosaic and potato spindle tuber viruses. **Virology** 47: 296-305.

Yovany Quiñones Ocegüera,