

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE POTYVIRUS QUE AFECTAN AL CULTIVO DEL PIMIENTO EN CUBA

Acela Díaz*, Madelaine Quiñones**, Annia Hernández*, Gloria del Barrio*

*Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 esquina J, Ciudad de La Habana, CP 10347, Cuba. Correo electrónico:acela@fbio.uh.cu;

**Grupo de Fitopatología. Dirección de Protección de Plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

RESUMEN: El género *Capsicum* (*Solanaceae*), es originario del continente americano y comprende alrededor de 25 especies, de las cuales cinco son cultivables. Las condiciones ambientales en que se desarrolla esta hortaliza, su forma de explotación, así como los tipos y variedades utilizadas, han traído consigo una amplia diversidad en cuanto a plagas y epifitias que causan importantes mermas en su producción. Entre ellas, las enfermedades virales constituyen la principal dificultad para el desarrollo del cultivo y de estas, las causadas por los miembros del género Potyvirus, se consideran entre las de mayor importancia económica. Este trabajo tiene como objetivo validar un ensayo de RT-PCR para el diagnóstico molecular de potyvirus, empleando cebadores genéricos. Los resultados evidencian que la RT-PCR resulta eficiente para el diagnóstico de potyvirus en el cultivo del pimiento con parámetros analíticos de desempeño superiores al 97%, validándose por primera vez en Cuba una técnica molecular para el diagnóstico de potyvirus. Además, se aportan nuevos elementos metodológicos en la validación de ensayos moleculares de nueva generación facilitando la reproducibilidad de los procedimientos en los laboratorios de diagnóstico.

(Palabras clave: potyvirus; pimiento; diagnóstico; RT-PCR)

EVALUATION OF ANALYTICAL PARAMETERS FOR THE MOLECULAR DETECTION OF POTYVIRUSES AFFECTING PEPPER CROPS IN CUBA

ABSTRACT: The genus *Capsicum* (*Solanaceae*) is originally from the American continent and includes around 25 species, but only 5 are used in agriculture. The environmental conditions in the development of this crop, the kind of exploitation, and the different cultivars have led to a large diversity of diseases causing important reductions in pepper production. Among them, the viral diseases are the first difficulty for the development of the crop. At the same time, pepper plants are primarily affected by potyviruses (*Potyviridae* family). The main goal of this work was the validation of a technique for the molecular diagnosis of potyviruses using RT-PCR with generics primers. The results showed that RT-PCR was efficient for potyvirus diagnosis in pepper plants with analytical parameters higher than 97%. It is the first time that a molecular technique is validated in Cuba for potyvirus diagnosis.

(Key words: potyvirus; pepper; diagnosis; PCR)

INTRODUCCIÓN

Las especies de pimiento (*Capsicum annum* L.), pertenecientes a la familia de las Solanáceas fueron introducidas en Europa desde América. Son origina-

rias de América Central y del Sur, siendo las primeras hortalizas empleadas como condimentos. Actualmente, en el comercio mundial de condimentos, ocupan el segundo lugar, tanto económica como productivamente, y se ubican después de la pimienta negra. El

pimiento dulce, cultivado en todo el mundo se consume también en estado fresco. Algunas variedades, con alto nivel de pungencia (picantes), además de utilizarse como alimento, se emplean como medicamentos. Tanto el pimiento pungente como el dulce, enriquecen la dieta por sus notables contenidos en vitaminas A y C (1).

En nuestro país, el pimiento ha ocupado, tradicionalmente, un área cultivada de 2000 ha, con una producción anual de unas 20 000 toneladas. Sin embargo, en los últimos años con el desarrollo de la agricultura urbana y periurbana, estos niveles se han incrementado considerablemente. Las variedades comerciales comúnmente utilizadas han sido la California Wonder, Español Liliana, Maor, Lical, SC 81, así como híbridos en el sistema de cultivos protegidos. En este cultivo, la productividad se ha visto afectada anualmente debido a la presencia de plagas y enfermedades que pueden ocasionar daños económicos de un 100% en la misma (2).

A nivel mundial, los cultivares de pimiento se han visto severamente afectados por las epifitias de origen viral; donde se destacan fundamentalmente: el Virus Y de la Papa (PVY), el Virus del Mosaico del Pepino (CMV), el Virus del Estriado del Tabaco (TSV), el Virus del Bronceado del Tomate (TSWV), el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), el Virus del Mosaico del Tomate (ToMV), el Virus del Grabado del Tabaco (TEV) y el Virus del Moteado del Pimiento (Pep MoV) (3). Dentro de ellos, el PVY es considerado el potyvirus que mayormente afecta este cultivo en nuestro país (2), llegando a provocar pérdidas por encima del 30% de la producción cuando la infección se produce en épocas tempranas de crecimiento.

Los síntomas producidos como resultado de la infección con potyvirus pueden ser muy diversos y varían en dependencia de la especie afectada, el aislado presente y las condiciones ambientales. De manera general, en condiciones de campo, estos virus causan en las plantas infectadas un mosaico con moteado y arrugado de las hojas apicales y un bandeado oscuro de las venas de las hojas totalmente expandidas (4). También se ha demostrado que en ocasiones se puede encontrar una ausencia total de síntomas, aunque las plantas se encuentren infectadas por el virus (5). Esto podría estar dado porque las condiciones no sean las adecuadas para el desarrollo de los mismos o porque la planta infectada sea tolerante a la enfermedad y no los manifieste; hecho bastante frecuente en los virus vegetales (6).

En Cuba, en los últimos años se ha comenzado a observar un fuerte incremento de los síntomas asocia-

dos a estos virus en este cultivo, fundamentalmente en las zonas central y occidental del país (7), lo que supone la incidencia de nuevos potyvirus circulantes o variantes recombinantes de los virus ya presentes, comportamiento que es muy frecuente en esta familia viral (8).

De modo general, la problemática del diagnóstico de virus vegetales se ha abordado con diferentes enfoques, y todos han estado condicionados inevitablemente por el desarrollo y avance de la tecnología, transitando desde el análisis de síntomas en plantas indicadoras, la microscopía electrónica, el empleo de métodos serológicos e inmunoenzimáticos, donde se destacan el ELISA y sus variantes, hasta las técnicas moleculares de nueva generación. Las metodologías Inmunoquímicas y las de Biología Molecular, son las principales vías para la identificación y diagnóstico de los potyvirus (9,10,11,12,13,14). Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, este trabajo tiene como objetivo validar un ensayo de RT-PCR para el diagnóstico molecular de potyvirus, empleando cebadores genéricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de controles de referencia positivos y negativos para el ensayo

Se sembraron 100 plantas de *C. annuum* var. Español Liliana en suelo Ferralítico Rojo Compactado y se mantuvieron en condiciones controladas de casa de cristal. Transcurridos 15 días, se inocularon mecánicamente las primeras dos hojas verdaderas de cada planta, empleando carborundum en polvo como abrasivo. El inoculante se preparó partiendo de hojas de papa liofilizadas infectadas con PVY a una dilución de 1:5 en buffer fosfato de sodio (pH 7,2).

Veintiún días después, se colectó la segunda hoja abierta de la región apical de cada planta, para realizar la extracción de los ARN totales, los que se consideraron como los controles positivos del ensayo. Paralelamente se sembraron otras 100 plantas de la misma variedad en un suelo Ferralítico Rojo Compactado y se mantuvieron en condiciones controladas de casa de cristal separadas espacialmente de las plantas infectadas. Transcurridos 21 días, se colectó la segunda hoja abierta de la región apical de cada planta, para realizar la extracción de los ARN totales, los que se consideraron como los controles negativos del ensayo.

Establecimiento de las condiciones de realización de la RT-PCR

Para la extracción de ARN totales, se colectaron 0,5 g de hojas de cada planta (100 inoculadas y 100 sanas) y se maceraron en nitrógeno líquido. A conti-

nuación, el macerado se procesó siguiendo la metodología descrita por Krause-Sakate (15), basada en una precipitación con cloruro de litio. El precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsa (Sigma).

Para detectar la presencia de potyvirus en los controles de referencia mediante la RT-PCR se utilizaron los cebadores CP1 y CP2 (16) que se presentan en la Tabla 1.

Para el montaje de la técnica, se preparó la mezcla de la reacción de RT-PCR en un volumen final de 50 µL. La misma estuvo compuesta por 0,8 mM dNTPs (Promega), 0,6 µM de cada cebador, 2,5 mM de cloruro de magnesio 12 unidades del inhibidor de ribonucleasas RNAsin (Promega), 3 unidades de la enzima retrotranscriptasa AMV (Promega) y 2,5 unidades de la enzima Taq polimerasa (Promega) en buffer de reacción 10X (compuesto por buffer Tris-HCl 1M, pH 8,8; sulfato de amonio 1M; EDTA 0,5M, pH 8); agua libre de ribonucleasas (Sigma) y 2 µL del ARN extraído. El programa de amplificación establecido para el ensayo aparece en la Tabla 2.

Los productos de la PCR (10 µL cada producto) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en Tampón TBE (Tris, ácido bórico y EDTA) 1X teñido con 1 µg.mL⁻¹ de bromuro de etidio, de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (17). Se incluyó un marcador de peso molecular (*DNA Ladder*) 100 pb (Promega) con un rango de tallas de 100-1500 pb. Las bandas se visualizaron a una longitud de onda de 312 nm en un transiluminador (Uvitec)

y se fotografiaron con cámara digital (Hewlett Packard C6324 A) para registrar los resultados.

Establecimiento del límite de detección

Para establecer el límite de detección de la técnica, se determinó la concentración inicial del extracto de ARN, procedente de una de las muestras de pimiento previamente inoculadas y comprobada la infección mediante RT-PCR. La lectura de la D.O. se determinó a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro LassosSpec (Lasso Biotech, LTDA). Una vez calculada la concentración inicial de la muestra (17), se procedió a la realización de diluciones seriadas (de base 10) para la obtención de soluciones con concentraciones de ARN desde 1 µg hasta 100 pg. Estas soluciones se utilizaron como muestra para el ensayo de RT-PCR. Se realizaron dos repeticiones del experimento.

Evaluación de la repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad del ensayo, se seleccionaron 10 controles positivos y 10 negativos. Se realizaron tres repeticiones intraensayos (evaluación de una muestra tres veces en un mismo ensayo) y cinco interensayos (evaluación de las muestras en cinco ensayos diferentes). Se determinó el porcentaje de concordancia de los resultados obtenidos en los ensayos.

Determinación de los parámetros analíticos de desempeño del ensayo RT-PCR

Para la validación del método de diagnóstico se utilizaron los 200 controles de referencia positivos y

TABLA 1. Cebadores empleados para la amplificación de una región conservada de la proteína de la cápside de potyvirus./ *Primers for the amplification of a conserved region of the coat protein of the potyvirus*

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Posición en el Genoma	Tamaño del Producto Amplificado
CP2 (sentido)	CCAGTCAAACCCGAACAAAGG	8637-8657	596 pb
CP1(antisentido)	GGCATAGCGTGCTAAACCCA	9149-9168	

TABLA 2. Programa de amplificación establecido para el ensayo de RT-PCR./ *Amplification program for the RT-PCR assay*

No.	Pasos del Programa	Tiempo	Temperatura	Número de ciclos
1.	Retrotranscripción	1 hora	42°C	1
2.	Desnaturalización	2 minutos	94°C	1
3.	Desnaturalización	30 segundos	94°C	35
4.	Anillamiento	1 minuto	54°C	35
5.	Extensión	1 minuto	72°C	35
6.	Extensión final	7 minutos	72°C	1

negativos de pimiento (100 de cada uno), previamente descritos. Se calcularon los índices o parámetros de desempeño analíticos del ensayo RT-PCR, según la metodología establecida por Peralta y Villoch (18) (Tabla 3).

TABLA 3. Índices o parámetros evaluativos determinados para el ensayo de RT-PCR en un solo paso para el diagnóstico específico de PVY./ *Evaluation indexes or parameters for the one-step RT-PCR assay for the specific diagnosis of PVY*

Parámetros	Ecuación*
Especificidad diagnóstica	$D-SP = Vn/(Vn+Fp)$
Sensibilidad diagnóstica	$D-SN = Vp/(Vp+Fn)$
Eficacia	$E = Vp+Vn/Vp+Vn+Fp+$
Valor predictivo de positividad	$Vpp = Vp/(Vp+Fp)$
Valor predictivo de negatividad	$Vn = Vn/(Vn+Fn)$

* Vp: verdaderos positivos, Vn: verdaderos negativos, Fp: falsos positivos, Fn: falsos negativos

Análisis biométricos

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la Prueba de Comparación múltiple de proporciones, completada con una Prueba de Tukey. Además se realizó la Prueba de comparación de porcentajes, todas ellas contenidas en el paquete STATISTICA (versión 6,2).

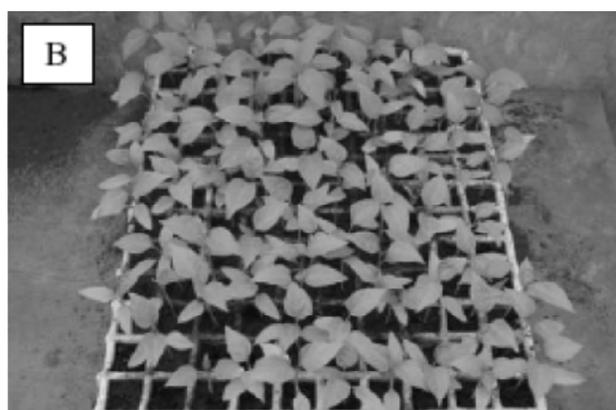


FIGURA 1. Plantas de *Capsicum annuum* var. Español Liliana. A. Plantas sanas (controles negativos), B. Plantas infectadas con potyvirus mostrando síntomas típicos (controles positivos)./ *Capsicum annuum* var. Español Liliana plants. A. Healthy plants (negative controls), B. Potyvirus-infected plants showing typical symptoms (positive controls).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Controles de referencia

Las muestras foliares de pimiento inoculadas, mostraron síntomas típicos de infección por potyvirus, lo que se denota por la aparición de mosaico, arrugamiento en las hojas y retardo en el crecimiento (Figura 1B). En los controles negativos no aparecieron síntomas visibles (Figura 1A) lo que permite emplearlos como controles negativos en la validación de la metodología evaluada.

Al evaluar las plantas inoculadas, mediante la RT-PCR, se evidencia que se logró un 97% de infección de las plantas de pimiento inoculadas, lo que indica que la forma de inoculación (mecánica utilizando carborundum) y cantidad de inóculo (30 μ L) empleado fue adecuada. Estos métodos también han sido utilizados en estudios relacionados con otras interacciones planta-patógeno (9, 10, 19, 20), demostrándose en todos los casos su eficiencia para estos fines.

Determinación del límite de detección del ensayo

El ensayo de RT-PCR propuesto mostró un bajo límite de detección del genoma viral en el macerado de la planta (2 ng.mL⁻¹) (Fig. 2), lo que puede atribuirse básicamente a la amplificación cebador-dependiente, la que está directamente relacionada con el correcto diseño de los oligonucleótidos y la adecuada selección de la diana a amplificar.

Los ensayos de PCR muestran en general bajo límite de detección debido al principio de amplificación y a que no necesitan la completa integridad del agente

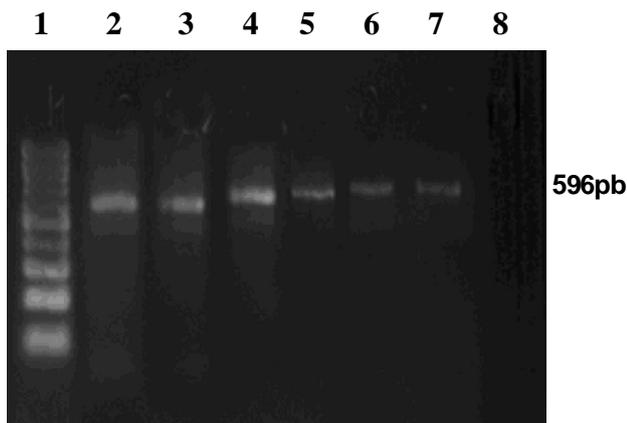


FIGURA 2. Ensayo para la determinación de la sensibilidad analítica. Análisis electroforético de los productos de la RT-PCR de un fragmento de la proteína de la cápsida de potyvirus. Gel de agarosa al 1,5% mostrando los productos de la PCR (10µL) obtenidos con los cebadores Cp1 y Cp2. Marcador de Peso Molecular (1), 200 µg.mL⁻¹ (2), 20 µg.mL⁻¹ (3), 2 µg.mL⁻¹ (4), 200 ng.mL⁻¹ (5); 20 ng.mL⁻¹ (6); 2 ng.mL⁻¹ (7); 200 pg.mL⁻¹ (8). / *Assay for the determination of the analytical sensibility. Electrophoretic analysis of the RT-PCR products obtained from the amplification of a fragment of the potyvirus coat protein. Agarose gel (1,5%) showing the PCR products (10µl) obtained with the Cp1 and Cp2 primers. Molecular weight marker (1), 200 µg.mL⁻¹ (2), 20 µg.mL⁻¹ (3), 2 µg.mL⁻¹ (4), 200 ng.mL⁻¹ (5); 20 ng.mL⁻¹ (6); 2 ng.mL⁻¹ (7); 200 pg.mL⁻¹ (8).*

a detectar. No obstante, ensayos de este tipo pueden no alcanzar todo el potencial de detección esperado debido a diferentes factores, entre los que se destacan: la presencia de inhibidores de la reacción, el inadecuado diseño de cebadores o la no optimización del ensayo.

Evaluación de la repetibilidad

Los resultados de las réplicas efectuadas intraensayos e interensayos para determinar la repetibilidad del método de RT-PCR en una sola etapa evaluada, presentaron un 100% de concordancia, tal como se muestra en la Figura 3. Por lo que se demuestra su eficiencia y no fue necesario realizar análisis estadísticos que determinaran la presencia de diferencias significativas.

Determinación de los parámetros de desempeño analíticos del ensayo RT-PCR

Los resultados de la evaluación de los controles positivos y negativos por la metodología de diagnóstico propuesta, se muestran en la Tabla 4; los parámetros de desempeño analíticos determinados sobre la base de estos resultados se observan en la Tabla 5.

El método establecido, en el que utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa para determinar la presencia de potyvirus en plantas de pimienta, mostró una eficacia de 97%, cifra que demuestra la factibilidad de su aplicación en el

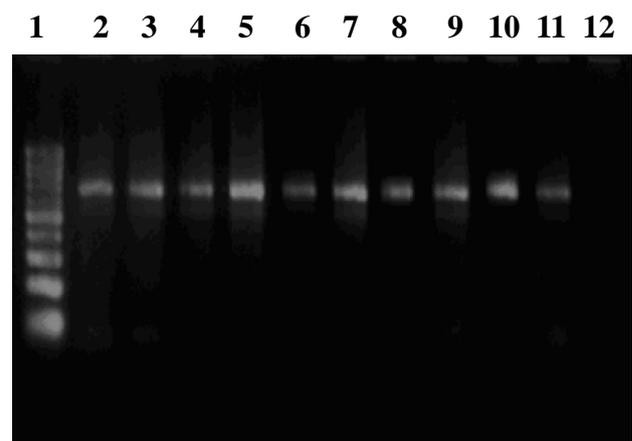
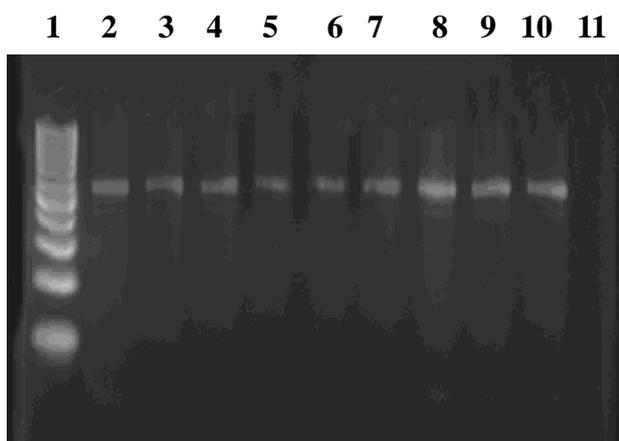


FIGURA 3. Resultados de la repetibilidad del método de RT-PCR evaluado. Análisis electroforético de los productos de la RT-PCR de un fragmento de la proteína de la cápsida de potyvirus. Gel de agarosa al 1,5% mostrando los productos de la PCR (10µL) obtenidos con los cebadores Cp1 y Cp2. Marcador de Peso Molecular (1), ARN totales extraídos a partir de los controles positivos (2-11), control negativo (12). / *Repeatability results of the RT-PCR evaluated. Electrophoretic analysis of RT-PCR products from the amplification of a fragment of the potyvirus coat protein. Agarose gel (1,5%) showing PCR products (10µl) obtained with Cp1 and Cp2 primers. Molecular weight marker (1), Total extracted RNA from positive controls (2-11), negative control (12).*

TABLA 4. Valores básicos para estimar los parámetros de desempeño de la detección de potyvirus mediante RT-PCR en plantas de pimiento./ *Basic values for the estimation of the performance parameters in the detection of potyvirus by RT-PCR in pepper plants*

		Controles de referencia	
		Infectados	Sanos
Resultados RT-PCR	Positivos	97 Vp	0 Fp
	Negativos	3 Fn	100 Vn

TABLA 5. Parámetros de desempeño determinados para la detección de potyvirus mediante la metodología propuesta./ *Performance parameters assessed for the detection of potyvirus using the proposed methodology*

	Eficacia E= 98,5 %
Sensibilidad diagnóstica D-SN= 97%	Valor predictivo positivo VPP=100%
Sensibilidad analítica A-SN= 0,2 ng	Valor predictivo negativo VPN= 97 %
Especificidad diagnóstica D-SP=100%	Repetibilidad 100% concordancia en ensayos inter e intraensayos

establecimiento de métodos de biología molecular para el diagnóstico en fitopatología.

Estos resultados se corresponden con los informados por Soto *et al.* (19), Iglesia *et al.* (21) y Soto (22), en los que se proponen ensayos moleculares para la detección de fitopatógenos, apoyándose en la metodología para validar métodos de diagnóstico descrita por Peralta y Villoch (18). Asimismo, estudios realizados por Martínez (23), en los que se evalúan muestras provenientes de los programas de mejoramiento genético de tomate en Cuba, demostraron la utilidad de los parámetros analíticos estimados en la validación de los métodos moleculares para el diagnóstico de enfermedades asociadas a las plantas.

La presencia de tres falsos negativos, puede estar relacionada con la sensibilidad de la técnica utilizada y con errores experimentales en el proceso de extracción de ARN, que es una de las fases más críti-

cas en este trabajo. En este sentido, la técnica ELISADAS ha sido muy utilizada para la detección de potyvirus en plantas (5,24,25), sin embargo, en la actualidad las técnicas de biología molecular desempeñan una función importante en el diagnóstico de estas entidades (13,16,26,27). Estas técnicas son superiores a las inmunoquímicas en especificidad y sensibilidad, además de ofrecer mayores posibilidades de detección y brindar una información más completa sobre los patógenos en cuestión

Aunque existen numerosos ejemplos de validación de diagnosticadores de uso humano y veterinario (27), estos son prácticamente inexistentes en la bibliografía con relación a los medios de detección de fitopatógenos y las técnicas moleculares en general. Lo más común es referir el límite de detección de la técnica y su especificidad analítica, encontrándose algunos ejemplos que informan los porcentajes de coincidencia con otros ensayos o la ocurrencia de falsos positivos o falsos negativos (28), sin que con ello lleguen a una verdadera evaluación de los medios y métodos en cuestión.

Estos resultados tienen importancia y aplicación práctica, demostrando la eficiencia de la técnica RT-PCR para el diagnóstico molecular de potyvirus en el cultivo del pimiento en Cuba. Además, aportan nuevos elementos metodológicos en la validación de ensayos moleculares de nueva generación, garantizan la calidad del diagnóstico, enriquecen los elementos para la estandarización de este tipo de ensayo y facilitan la reproducibilidad de los procedimientos en los laboratorios de diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria por su apoyo en el desarrollo de este trabajo, el que forma parte de la Maestría en Microbiología, Mención en Virología de Acela Díaz de la Osa, desarrollada como producto de la colaboración entre ambas instituciones.

REFERENCIAS

1. Innes NL. Growing Vegetables for Home and Market. FAO Diversification booklet 11. Rome: FAO. 2009; p. 91.
2. Rodríguez, Y, Depestre T, Gómez O. Obtención de líneas de pimiento (*Capsicum annum*) progenitoras de híbridos F1 resistentes a enfermedades virales, a partir del estudio de cuatro

- sub-poblaciones. *Cien Inv Agron.* 2007;34(3):237-242.
3. Ha C, Reville P, Harding RM, Vu M, Dale JL. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Arch Virol.* 2007;153:45-60.
 4. Agrios GN. *Plant Diseases caused by Viruses.* Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academia Press. 2005; p. 724-820.
 5. Aramburu J, Galipienso L, Matas M. Characterization of potato virus Y isolates from tomato crops in northeast Spain. *Eur J Plant Pathol.* 2006;115:247-258.
 6. Martínez Y, Fonseca D, Peralta EL. Conocimiento y diagnóstico del virus del bronceado del tomate (TSWV), una necesidad de la agricultura cubana. *Rev Protección Veg.* 2005;20(1):11-19.
 7. Rodríguez Y, Rangel E, Centeno F, Mendoza A, Parra A. Virus diseases affecting sweet pepper (*Capsicum annuum*) in Quibor Valley, Venezuela. In: Proc. Of the 16th Int. Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas. November, 2002; p.12.
 8. Glais L, Tribodet M, Kerlan C. Genomic variability in *Potyvirus* Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants single to multiple recombinants between PVY^o and PVY^N isolates. *Arch Virol.* 2002;147:363-378.
 9. Chen J, Zheng HY, Shi YH, Adams MJ, Wei CB, Lin L, et al. Detection and characterisation of a second potyvirus from Thunberg fritillary in China. *Arch Virol.* 2006;151:439-447.
 10. Huang CH, Hu WC, Yang TC, Chang YC. Zantedeschia mild mosaic virus, a new widespread virus in calla lily, detected by ELISA, dot blot hybridization and IC-RT-PCR. *Plant Pathol.* 2007;56:186-189.
 11. Melcher U, Muthukumar V, Wiley GB, Min BE, Palmer MW, Verchot-Lubicz J, et al. Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. *J Virol Methods.* 2008;152:49-55.
 12. Balijja A, Kvarnheden A, Turchetti T. A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *J Virol Methods.* 2008;152:32-37.
 13. Kreuze JF, Perez A, Untiveros M, Quispe D, Fuentes S, Barker I. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology.* 2009;388:1-7
 14. Hua X, Meachama T, Ewinga L, Gray SM, Karaseva AV. A novel recombinant strain of Potato virus Y suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Res.* 2009;143:68-76.
 15. Krause-Sakate R, Mello RN, Pavan MA, Zambolim EM, Carvalho MG, Lê Gall O, et al. Molecular characterization of two Brazilian isolates of *Lettuce mosaic virus* with distinct biological properties. *Fitopatol Bras.* 2001;26(2):153-157.
 16. Rigotti S, Gugerli P. Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. *J Gen Virol.* 2007;140:90-94
 17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (second ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; 1989.
 18. Peralta EL, Villoch A. Validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados para el diagnóstico de fitopatógenos. En: Resúmenes del X Congreso Latinoamericano de Fitopatología, #153, Guadalajara, México; 1999.
 19. Soto M, González L, Peralta EL, Pérez R. Empleo de plantas de pepino como amplificador biológico para la detección del viroide del enanismo del lúpulo (HSVD) en cítricos. *Rev Protección Veg.* 2008;23(1):1-10.
 20. Mota LDC, Della Vecchia MGS, Gloria R, Kitajima EW, Rezende JMA, Camargo LEA, et al. Pfaffia mosaic virus: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. *Plant Pathol.* 2004;53:368-373.
 21. Iglesia-Lozano A, Díaz M, Peralta EL, Pazos V, Álvarez E. Diagnóstico del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar (*Leifsonia xyli* subsp *xyli*) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (NPCR). *Rev Protección Veg.* 2003;18(1):19-22
 22. Soto M. Caracterización molecular de variantes de secuencias del viroide del enanismo del lúpulo

- (HSVd). Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de La Habana. Cuba; 2005.
23. Martínez Y. Contribución al conocimiento de geminivirus que afectan el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. CENSA, Habana. 1998.
24. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the Microplae Meted of Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (Elisa) for the Detection of Plant Viruses. *J Gen Virol.* 1977;34:475-483.
25. Díaz de la Osa A. Diagnóstico molecular de Potyvirus en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L) en Cuba. Tesis presentada en opción al Título Académico de Maestro en Microbiología. Universidad de La Habana. Cuba; 2009.
26. González L. Principales técnicas moleculares aplicadas al estudio de las plantas. Facultad de Biología, Universidad de La Habana; 2006.
27. Wiedbrauk DL, Stoerker J. Quality assurance in the molecular virology laboratory. In: Wiedbrauk DL, Farkas DH, editord. *Molecular methods for virus detection.* Academic Press. 1995; Cap. 2:25-37.
28. Dieffenbach CW, Dveksler GS. Setting up a PCR Laboratory. *PCR Methods and Applications.* 1-17, 1993.

(Recibido 14-12-2009; Aceptado 19-5-2010)