

Detección Serológica y Molecular del Virus PVY^N y su variante PVY^{NTN} en Papa (*Solanum tuberosum L.*) y Hospedantes Alternos en Tapalpa, México

Miguel Hernández-de la Cruz, Juan Florencio Gómez-Leyva, Irma Guadalupe López-Muraira, María Susana Dimas-Estrada, Isaac Andrade-González, Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Lab. de Biología Molecular, km 10 Carr. a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México CP 45640; y **Javier Ireta-Moreno,** INIFAP, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, km 8 Carr. Tepatitlán a Lagos de Moreno, Tepatitlán, Jalisco, México CP 47600. Correspondencia: jfgleyva@hotmail.com

(Recibido: Enero 26, 2007 Aceptado: Abril 19, 2007)

Hernández-de la Cruz, M., Gómez-Leyva, J.F., López-Muraira, I.G., Dimas-Estrada, M.S., Andrade-González, I. e Irete-Moreno, J. 2007. Detección serológica y molecular del virus PVY^N y su variante PVY^{NTN} en papa (*Solanum tuberosum L.*) y hospedantes alternos en Tapalpa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 25:167-172.

Resumen. Se realizó un muestreo en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) para semilla en la zona productora de Tapalpa, Jalisco, México, así como de maleza e insectos asociados al cultivo con el objetivo de determinar la presencia del virus PVY^N y su variante PVY^{NTN}. Mediante técnicas serológicas y moleculares se analizaron 41 variedades de papa, 19 de Tapalpa, y 22 provenientes de Toluca, Estado de México. Con la técnica de DAS-ELISA, la variedad Malinche de Tapalpa fue positiva a PVY^N, mientras que Marinca proveniente de Toluca y Malinche, Gigant y Alpha de Tapalpa fueron positivas a PVY^{NTN} por RT-PCR. De las diferentes especies de malezas asociadas al cultivo de la papa, se encontró a *Solanum nigrescens* también conocida como hierba mora como reservorio natural de PVY^N. Se identificó al áfido *Myzus persicae* como portador del PVY^{NTN} y se considera como probable vector. Se clonó y secuenció un fragmento de 594 pb amplificado por RT-PCR para PVY^{NTN}. Se encontró un 98% de homología con un aislamiento de Canadá de acuerdo a la secuencia reportada en el NCBI. Estos resultados confirmaron la presencia de PVY^{NTN} en plantaciones comerciales de papa en Tapalpa, Jalisco, México.

Palabras clave adicionales: *Myzus persicae*, *Solanum nigrescens*, *Solanum nigrum*, DAS-ELISA, RT-PCR.

Abstract. Sampling for the presence of PVY^N virus and its variant PVY^{NTN}, as well as for weeds and insects associated with cultivation of potato (*Solanum tuberosum*), was carried out in fields intended for seed production in Tapalpa, State of Jalisco, Mexico. Forty one cultivars were analyzed, 19 from

Tapalpa and 22 from Toluca, State of Mexico, by serological and molecular techniques. DAS-ELISA immunoassays revealed that cv. Malinche from Tapalpa was positive to PVY^N, whereas a RT-PCR-based analysis identified the PVY^{NTN} variant in Marinca from Toluca, as well as in Gigant, Malinche, and Alpha from Tapalpa. Among the different weed species associated to potato crop, *Solanum nigrescens* locally known as hierba mora, was found to be a natural reservoir for PVY^N. The aphid *Myzus persicae* was identified to carry PVY^{NTN} variant and it is considered as a probable vector. A 594 bp fragment, derived from samples that resulted positive for PVY^{NTN} was amplified by RT-PCR, cloned and sequenced with 98% homology to an isolate from Canada, according to the sequence reported in the NCBI. These results confirmed the presence of the PVY^{NTN} variant in commercial potato fields in Tapalpa, Jalisco, Mexico.

Additional keywords: *Myzus persicae*, *Solanum nigrescens*, *Solanum nigrum*, DAS-ELISA, RT-PCR.

En México se cosechan cerca de 851,655 ton de papa (*Solanum tuberosum L.*) en aproximadamente 70,000 ha de cultivo (SIAP, 2007). La producción se destina básicamente al mercado nacional para consumo en fresco, para la industria y como semilla. Sin embargo, esta producción no es suficiente para abastecer la demanda nacional, por lo que se ha recurrido a la importación de 316,000 ton, cerca del 70% proviene de los Estados Unidos y el 28% de Canadá. Los principales estados productores de papa en México son: Sonora, Sinaloa, Coahuila, Nuevo León y Jalisco. La zona de Tapalpa, Jalisco, es una de las principales fuentes de semilla para el resto del país con una producción de 52,000 ton que representa el 80% de la producción de papa en Jalisco, y es considerada como libre de enfermedades cuarentenarias, por lo que es importante verificar el estado fitosanitario que guarda esta importante región productora de tubérculo semilla. El virus Y de la papa

(*Potato virus Y* = PVY) pertenece al género de los Potyvirus y es de amplia distribución en las zonas productoras de papa del mundo. Se conocen tres variantes o grupos basados en sus características serológicas y síntomas producidos en papa y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.): PVY^C, PVY^O y la variante inductora de necrosis sistémica de la nervadura PVY^N; de ésta última se ha reportado la variante necrótica del tubérculo o PVY^{NTN}. En México existen reportes para las variantes PVY^C y PVY^O mientras que la variante PVY^N se ha reportado esporádicamente en algunas regiones productoras de papa y es una enfermedad de importancia cuarentenaria (Cruz-Flores, 2001). El virus PVY^N tiene amplia distribución, se ha reportado en países europeos, Nueva Zelanda, y algunas regiones de África y Sudamérica; mientras que Canadá y EUA, los cuales son los principales proveedores de semilla de papa para México, mantienen regiones cuarentenadas por la presencia de este virus (McDonald y Kristjanson, 1993; Salazar, 1995; Singh, 1992). La variante PVY^{NTN} se ha reportado como la más agresiva y es causante de necrosis foliar y moteado, además de los síntomas visibles en el tubérculo en forma de anillos necróticos abultados en la superficie. En México sólo se ha reportado esta variante en importaciones de semilla de papa provenientes de Canadá (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2003) y recientemente en el municipio de Galeana, Nuevo León (Guerrero-Gámez *et al.*, 2005), por lo que existe el riesgo de diseminación de esta enfermedad y los daños causados pueden ser importantes debido a la disminución del rendimiento e impacto económico. El diagnóstico tradicional de virus en papa se realiza principalmente mediante el empleo de plantas indicadoras y métodos serológicos; sin embargo, algunos órganos de las plantas contienen bajas concentraciones de partículas virales, que impiden el correcto diagnóstico aún empleando microscopía electrónica o hibridación de ácidos nucleicos (Singh, 1998). La clasificación serológica de las variantes PVY^O, PVY^C, PVY^N y PVY^{NTN}, ha generado líneas de investigación y discusión debido a que los anticuerpos policlonales específicos para la proteína de la cápside no pueden separar variantes (Van den Heuvel *et al.*, 1994; Weidemann y Maiss, 1996), sin embargo, comercialmente existen diferentes anticuerpos específicos generados a partir de secuencias específicas en epítopos de la región N-terminal de la proteína de la cápside para las variantes PVY^O, PVY^C y PVY^N; estos anticuerpos monoclonales se han usado para separar e identificar estas variantes (Hataya *et al.*, 1994). La prueba de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) no logra diferenciar entre las variantes PVY^N y PVY^{NTN}, razón por lo cual se complica su diagnóstico. En países donde los problemas de virosis están presentes, se han empleado con éxito la técnica de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en la detección de algunos virus de RNA, así como en la identificación y variación genética de PVY y sus variantes en diferentes países. Weilguny y Singh (1998),

reportaron 61 aislados provenientes de Eslovenia caracterizados por RT-PCR con 3-oligos, lo que permitió la separación de las variantes PVY^N y PVY^{NTN}. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia del virus PVY y sus variantes PVY^N y PVY^{NTN} en plantaciones comerciales de papa, en la zona productora de Tapalpa, así como en plantas hospederas e insectos vectores empleando técnicas serológicas y moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material biológico. Se colectaron maleza y tubérculos de papa en cinco plantaciones comerciales del municipio de Tapalpa, Jalisco, durante los ciclos 2003 y 2004. Para la maleza se colectaron al menos cinco plantas por especie o familia, tomando como criterio aquellas plantas que mostraran alguna sintomatología viral. También se colectaron los insectos asociados al cultivo, los cuales se colocaron en etanol al 70% para su transporte al laboratorio. Por otra parte, se analizaron tubérculos semilla provenientes de Toluca, Estado de México las cuales formaron parte del programa de papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en Jalisco para esos mismos ciclos. Los tubérculos se mantuvieron durante dos meses en reposo hasta la obtención de brotes de 5 a 12 cm, los cuales se emplearon para el análisis por DAS-ELISA directo (Double Antibody Sandwich-ELISA) y RT-PCR, en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco.

Detección serológica (ELISA) de PVY^N. Las muestras de papa y maleza se analizaron por la técnica de ELISA tipo sandwich de doble anticuerpo (DAS), empleando el anticuerpo PVY policlonal SRA 20001 AGDIA (Elkhart, IN), el cual reacciona con todas las variantes de PVY, más un segundo anticuerpo monoclonal A con epítopos específicos para PVY^N (EAC 26000), así como un tercer anticuerpo Anti-A conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Para el análisis se realizaron muestras compuestas mezclando cinco muestras de tejido de diferentes brotes de los tubérculos semilla de una misma variedad. Se tomó lectura de la placa en un lector ELISA marca BIO-RAD (Microplate Manager, versión 5.2) a los 30 y 60 min, a una absorbancia de 405 nm, considerando positivas las muestras con una absorbancia igual o superior al testigo positivo. Las muestras positivas fueron separadas individualmente y se realizó nuevamente el ensayo para identificar el origen de la muestra.

Extracción y purificación de RNA. Se emplearon 0.5 g de tejido (hojas y brotes) ó 3 insectos los cuales se homogeneizaron en presencia de 1 mL de Trizol Reagen (TRIZOL, Invitrogen Carlsbad, CA), inmediatamente se adicionaron 200 µL de cloroformo y la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 500 µL de isopropanol frío, la mezcla se mantuvo en incubación por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado obtenido fue lavado con 200 µL de etanol al 75%. Los restos

de etanol y agua fueron evaporados por 6 min a 40°C en un concentrador de DNA al vacío (Centriprep DNA Systems). Finalmente el precipitado se resuspendió en 30 µL de agua milli-Q (MQ) estéril y se almacenó a 5°C. Se cuantificó la concentración de RNA mediante la lectura en un espectrofotómetro a 260 nm, mientras que la pureza se

determinó de la relación 260/280.

Síntesis del cDNA por reacción de la transcriptasa reversa.

La síntesis de cDNA se realizó empleando 1 µg de RNA desnaturizado a 65°C por 5 min, en un volumen total de 20 µL los cuales contenían: 5 µL Agua M.Q, 4.0 µL Buffer RT 5X (Invitrogen), 10 U de RNasin (Promega, Madison, WI), 200

Cuadro 1. Resultados para el diagnóstico de los virus PVY^N y PVY^{NTN} en diferentes variedades de papa (*Solanum tuberosum*) de Tapalpa, Jalisco y Toluca Edo. de México.

No.	Variedad	Procedencia	PVY ^N (DAS-ELISA)	PVY ^{NTN} (RT-PCR)
1	Malinche	Tapalpa, Jalisco	- ^a	-
2	Malinche 573268	"	+	+
3	Zafiro	"	-	-
4	575015	"	-	-
5	Norteña	"	-	-
6	Tollocan	"	-	-
7	Tollocan	"	-	-
8	Monserrat	"	-	-
9	Alpha	"	-	+
10	Ibis	"	-	-
11	Marinca	"	-	-
12	Aninca	"	-	-
13	Idiafrít 381381.13	"	-	-
14	Idiafrít 381381.13	"	-	-
15	Alpha	"	-	+
16	Gigant	"	-	-
17	Gigant	"	-	+
18	Alpha	"	-	+
19	Atlantic	Toluca, México	-	-
20	Malinche	"	-	-
21	Zafiro	"	-	-
22	Marinca	"	-	+
23	77-70-91	"	-	-
24	676171	"	-	-
25	676004	"	-	-
26	676002	"	-	-
27	ATIZ 001	"	-	-
28	ATIZ 002	"	-	-
29	ATIZ 003	"	-	-
30	ATIZ 004	"	-	-
31	ATIZ 005	"	-	-
32	ATIZ 006	"	-	-
33	ATIZ 007	"	-	-
34	ATIZ 008	"	-	-
35	ATIZ 009	"	-	-
36	ATIZ 010	"	-	-
37	ATIZ 011	"	-	-
38	ATIZ 012	"	-	-
39	ATIZ 013	"	-	-
40	ATIZ 014	"	-	-
41	ATIZ 015	"	-	-

^aPrueba positiva = +; prueba negativa = -.

μm dNTP's (Promega), 10 mM de DTT, 20 pmol del iniciador Mor2 (5' CAAACC ATAAGC CCA TTC ATC) complementario a los nucleótidos 8905-8925 del gen de la cubierta protéica del PVY^{NTN} (Moravec *et al.*, 2003) y 20 U de RT Super Script (M-MLV, Invitrogen, 18064-022). La reacción fue incubada a 42°C por 1 hora.

PCR específico para PVY^{NTN}. La PCR se preparó en un volumen de 25 μL , el cual contenía: 2 μL del cDNA, 13.5 μL agua MQ, 2.5 μL de buffer Taq polimerasa (Invitrogen), 2.0 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200 μM de dNTP's (Gibco-Life Technologies), 20 pmol de cada iniciador Mor2, Mor1 (5' AGG AGG AAG CAC TAA GAA G) y Mor3 (5' GCA CCA AAT CAG GAG ATT CTA CT) más 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó en un termociclador ProGene (Techne-112077), con el siguiente programa: desnaturación 94°C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturación a 94°C por 1 min, anillamiento a 60°C por 1 min, polimerización a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de amplificación fueron fraccionados en un gel de agarosa en TAE al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV.

Clonación y análisis de las secuencias. Los productos de 556 pb amplificados por RT-PCR fueron purificados a partir del gel de agarosa mediante el sistema de "GeneClean", clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega Madison, WI) y transformados en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α . El plásmido fue secuenciado en un secuenciador automático ABI PRISM 377 Perkin-Elmer (Cetus, Norwalk, CT) en ambas direcciones usando el Kit de secuenciación Dye Terminator Cycle Sequencing, Ready Reaction (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Se comparó la similitud de las secuencias obtenidas con las secuencias reportadas para el PVY^{NTN} en el banco de genes empleando la base de datos del NCBI, a través de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se identificaron las secuencias para la proteína de la cápside de PVY y sus variantes PVY^{O,C,N} y PVY^{NTN} se editaron con el programa Editseq y se agruparon mediante los algoritmos del programa de alineamiento de secuencias múltiples y pareado MegAlign 4.05 (DNASTAR, Madison, WI, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de virus por ELISA y RT-PCR. Se analizaron mediante la prueba de ELISA y RT-PCR 41 muestras de papa compuestas por 22 brotes de tubérculos semilla provenientes de Toluca, y 19 muestras de follaje de diferentes variedades de papa establecidas en campo en la zona productora de Tapalpa, Jalisco. De todas las muestras analizadas por ELISA para el virus PVY^N, solamente resultó positiva una muestra en follaje de la variedad Malinche, colectada en Tapalpa, Jalisco (Cuadro 1). Cinco muestras de Tapalpa correspondientes a las variedades Alpha, Gigant y Malinche y una de Toluca correspondiente a la variedad Marinca fueron positivas por RT-PCR para la detección de PVY^{NTN} (Fig. 1).

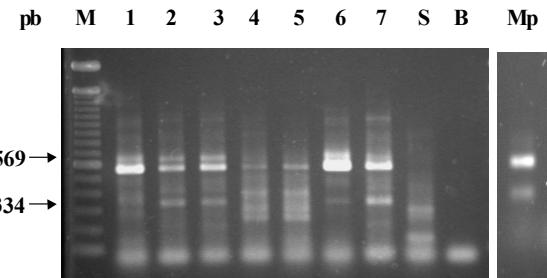


Fig. 1. Productos de amplificación de PVY^{NTN} en diferentes variedades de papa (*Solanum tuberosum*) e insecto mediante RT-PCR empleando los iniciadores Mor1, Mor2 y Mor3. Las flechas indican los fragmentos amplificados específicos a PVY^{NTN}. M, Marcador molecular 100 pb DNA ladder (Promega); 1, clon Malinche; 2, clon Marinca; 3, clon Gigant; 4, clon Alpha; 5, clon Alpha; 6, Afido (*Myzus persicae*); 7, clon Alpha; S, *Solanum tuberosum* sana (*in vitro*); B, Blanco (sin cDNA); Mp, *Myzus persicae*.

Por análisis serológico no fue posible detectar la presencia de PVY^N en cinco de seis muestras de papa positivas a PVY^{NTN} por RT-PCR empleando la combinación de los anticuerpos monoclonales 4C3 y 1F5, diseñados para detectar todas las variantes de PVY. Estos resultados podrían ser indicativos de baja concentración de partículas virales presentes en las muestras de Tapalpa o bien a la variación en el reconocimiento de los epítopos para los anticuerpos. Existen anticuerpos monoclonales que identifican específicamente PVY^O y PVY^N (Ellis *et al.*, 1997), pero PVY^O y PVY^C no son distinguibles serológicamente. Sin embargo, la aparición de las variantes de la raza necrótica PVY^{N-W} y PVY^{N-O} con serotipo PVY^O elimina la confirmación positiva por ELISA de PVY^O. Un análisis de secuencias de diversos aislamientos de PVY^{NTN} indican un posible origen híbrido por recombinación de RNA de PVY^O y PVY^N denominada PVY^{N-O} (Glais *et al.*, 2002; Nie y Singh, 2003), mientras que otros sugieren que podrían haber evolucionado por mutación a partir de aislamientos de PVY^N, más que de recombinaciones genómicas (Nie y Singh, 2003). Los iniciadores Mor2 y Mor3 amplifican por RT-PCR un fragmento de 569 pb que flanquea regiones conservadas de los genes de la cubierta protéica y del NIb en todos los aislamientos de PVY^{NTN}, mientras que el iniciador Mor1 está diseñado para evaluar las posibles recombinaciones del virus, ya que todos los aislamientos de PVY^{NTN} muestran una guanina en la posición 8611, por lo que la combinación de iniciadores Mor1 y Mor2 amplifican un fragmento adicional de 334 pb (Moravec *et al.*, 2003). Todas las muestras positivas amplifican un producto de 569 pb y el adicional de 334 pb, excepto las muestras de la variedad Alpha y Malinche (Fig. 1), esto podría indicar la presencia de dos variantes de PVY^{NTN} presentes en Tapalpa. El análisis de la secuencias de 569 pb mostró una homología del 98% con un aislamiento de PVY^{NTN} canadiense y forma un grupo distinto con las

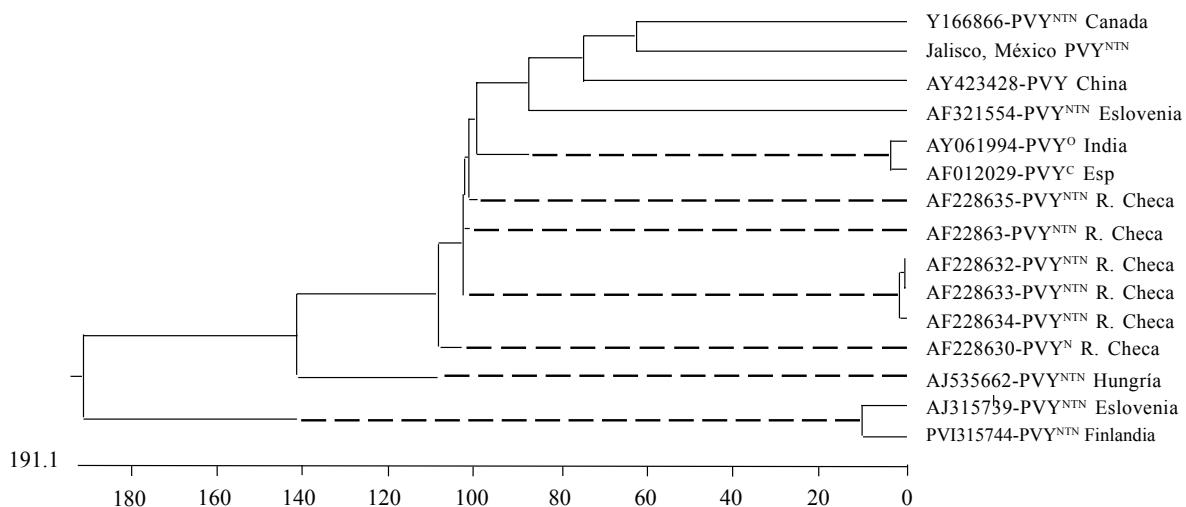


Fig. 2. Árbol filogenético obtenido a partir de similitud en la secuencia de la cápside del virus PVY^{NTN} del aislamiento de Tapalpa, Jalisco, México, y otros virus de papa (*Solanum tuberosum*).

secuencias reportadas para aislamientos europeos (Fig. 2). Esto sugiere la posibilidad de que el aislamiento presente en Jalisco sea de origen Canadiense, sin embargo, tampoco se descarta la posibilidad de que provenga del norte de México o California en EUA, donde también se ha detectado la presencia de PVY^{NTN} (Guerrero-Gámez *et al.*, 2005). En el caso de la variedad Marinca que resultó positiva a PVY^{NTN}, el tubérculo no mostró la presencia de anillos necróticos típicos de la enfermedad, mientras que las muestras de follaje positivas de Tapalpa mostraron un moteado suave en todos los casos, y en algunas ocasiones asociado a la presencia del virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) y al síndrome conocido como punta morada.

Hospedantes alternos e insectos vectores. El análisis serológico para detectar PVY^N en 50 ejemplares de maleza correspondiente a 14 especies presentes en Tapalpa, confirmó como positiva a la especie *Solanum nigrescens* Mart. y Gal. (Cuadro 2) también conocida como hierba mora o mora silvestre. Esta misma muestra fue negativa a PVY^{NTN} mediante el análisis por RT-PCR. Se conoce que especies muy relacionadas a la encontrada en Tapalpa, como *S. nigrum* L. y otras solanáceas, son reservorios de PVY^{NTN} (Pepelnjak, 1996), por lo que se deberán tomar las debidas precauciones en el control de esta maleza para evitar su diseminación. Con la finalidad de evaluar los posibles vectores de PVY^{NTN} en papa, se analizó mediante RT-PCR poblaciones del áfido *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) presentes en las plantas con síntomas de PVY^{NTN}, detectando la presencia del virus en el grupo de áfidos (Fig. 1). Se conoce que estos insectos son importantes como vectores de los virus que infectan a las plantas y transmiten de manera no persistente la gran mayoría de virus (alrededor de 170) portados en el estilete, y que en determinadas condiciones podría ser un vector eficiente para trasmitir a PVY^{NTN} a otras plantaciones,

ya que se encontraron altas concentraciones de partículas virales de acuerdo a un estimado en la intensidad de los fragmentos amplificados con los iniciadores Mor1 y Mor3.

CONCLUSIONES

Se identificó la presencia del virus PVY^{NTN} en plantaciones comerciales de papa en Tapalpa, Jalisco, México, en las variedades Malinche, Alpha y Gigant, así como en la variedad Marinca proveniente de Toluca, Estado de México. La variedad Marinca, portadora del virus llegó a México procedente de Cuba, razón por la que se desconoce el origen de las

Cuadro 2. Resultados para el diagnóstico del virus PVY^N en maleza de papa (*Solanum tuberosum*) en Tapalpa, Jalisco, México.

Familia	Especie	PVY ^N (DAS-ELISA)
Convolvulaceae	<i>Ipomoea purpurea</i>	- ^z
	<i>Merremia quinquefolia</i>	-
Asteraceae	<i>Conyza bonariensis</i>	-
	<i>Taraxacum officinale</i>	-
	<i>Helenium quadridentatum</i>	-
	<i>Parthenium hysterophorus</i>	-
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	-
Poaceae	<i>Urochloa mollis</i>	-
Solanaceae	<i>Solanum torvum</i>	-
	<i>Solanum nodiflorum</i>	-
	<i>Solanum rostratum</i>	-
	<i>Solanum nigrescens</i>	+
	<i>Nicandra physalodes</i>	-
Amarantaceae	<i>Amaranthus hybridus</i>	-

^zPrueba positiva = +; prueba negativa = -.

infecciones primarias. La secuencia del virus encontrado mostró alta homología con un aislado Canadiense, por lo que la presencia del virus podría deberse a importaciones de papa provenientes de ese país. Se determinó a la maleza *S. nigrescens* como reservorio de PVY^N, mientras que el áfido *M. persicae* podría ser vector importante en la diseminación de PVY^{NTN}, además de la movilización de los propios tubérculos-semilla infectados. Este es el primer reporte de la presencia del virus causante de anillos necróticos de la papa en Jalisco, México.

Agradecimientos. Se agradece a la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria por el apoyo económico, así como a la Ing. Magali Hernández-Valencia por el apoyo técnico. Este artículo es parte de la tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias del primer autor.

LITERATURACITADA

- Cruz-Flores, M. 2001. Diagnóstico de Potyvirus Y de la Papa Variante Necrótica (PVY^N), en Tubérculo Semilla de Papa (*Solanum tuberosum L.*) Canadiense. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Chapingo, México. 31 p.
- Ellis, P., Stace-Smith, R., and De Villiers, G. 1997. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. Plant Disease 81:481-484.
- Glais, L., Tribodet, M. y Kerlan, C., 2002. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): Evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. Archives of Virology 147: 363-378.
- Guerrero-Gámez, C.E., Mauleón-Gutiérrez, H., Alvarado-Gómez, O.G., Leos-Martínez, J., Zúñiga, G.A., Villarreal-García, L.A. 2005. Detección molecular del virus PVY^{NTN} en semilla de papa de importación y en lotes comerciales en Nuevo León, México. XXXII Congreso Nacional de Fitopatología. Chihuahua, Chihuahua, México. Resumen, L-19.
- Hataya, T., Inoue, A.K., Oshima, K., and Shikata, E. 1994. Characterization and strain identification of a potato virus Y isolate non-reactive with monoclonal antibodies specific to the ordinary necrotic strains. Intervirology 37:12-19.
- McDonald, J.G., and Kristjansson, G.T. 1993. Properties of strains of potato virus Y^N in North America. Plant Disease 78:87-89.
- Moravec, T., Cerovská, N., and Boonham, N., 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY^{NTN}) using three-primer PCR based in the coat protein gene. Journal of Virological Methods 109:63-68.
- Nie, X., and Singh, R.P. 2003. Specific differentiation of recombinant PVY^{N-O} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 113: 69-77.
- Pepejnjak, M. 1996. Incidence of PVY^{NTN} on some Solanaceae species (other than potato) in Slovenia. In: Proc. 13th Triennial Conference of European Association Potato Research. Veldhoven, The Netherlands. 122 p.
- Ramírez-Rodríguez, V.R., Flores-Olivas, A., Cruz-Flores, M., Ochoa-Sánchez, J.C., Frías-Treviño, G. y Martínez-Soriano, J.P. 2003. Detección del virus PVY en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum L.*) provenientes de Canadá y México. Memorias del XXX Congreso Nacional y V Congreso Internacional de Fitopatología. Abril 5 al 10 de 2003. Isla del Padre, Texas, USA. Editado por Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C. pag. 22.
- Salazar, L.F. 1995. Los Virus de la Papa y su Control. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 226 p.
- SIAP, 2007. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Obtenido de la red: www.siap.sagarpa.gob.mx (Consulta Marzo 15, 2007).
- Singh, R.P. 1992. Incidence of tobacco veinal necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) in Canada in 1990 and 1991 and scientific basis for eradication of the disease. Canadian Plant Disease Survey 72:113-119.
- Singh, R.P. 1998. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. Journal of Virological Methods 74:125-138.
- Van den Heuvel, J.F.J.M., Van den Vlugt, R.A.A., Verbeek, M., De Haan, P.T., and Huitinga, H. 1994. Characteristic of a resistant-breaking isolate of potato virus Y causing tuber necrotic disease. European Journal Plant Pathology 100:347-356.
- Weilguny, H., and Singh, R.P., 1998. Separation of Slovenian isolates of PVY^{NTN} from the North American isolates of PVY^N by a 3-primer PCR. Journal of Virological Methods 71:57-68.
- Weidemann, H.L., and Maiss, E., 1996. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. Journal Plant Disease Protection 103:337-345.