

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FCA**  
Facultad de  
Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

## TRABAJO DE DIPLOMA

Caracterización de potyvirus en *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT

**Autor: Elizabeth Valdés Claro**

**Tutores: Dr. C. Orelvis Portal Villafaña**

**MSc. José Efraín González Ramírez**

Santa Clara junio 2019  
Copyright©UCLV

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FCA**  
Facultad de  
Ciencias Agropecuarias

Department of Biology

## DIPLOMA THESIS

Caracterización de potyvirus en *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT

**Author: Elizabeth Valdés Claro**

**Thesis Director: Dr. C. Orelvis Portal Villafaña**

**MSc. José Efraín González Ramírez**

Santa Clara junio 2019  
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

## **Dedicatoria**

A quienes quisieron menguar mi esencia y se erigieron como derrota irrefutable ante mis triunfos... Con todos los ladrillos lanzados estoy construyendo un castillo. Gracias por su presencia en mi vida, son la causa de mi fortaleza.

## **Agradecimientos**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento. A mis padres, por ser el pilar más importante, y el pequeño motor impulsor de este gran motor que no detendrá su marcha. A mi hermano por ser el paradigma más genuino de superhéroe y mi reto inalcanzable. A mi tutor Orelvis Portal Villafaña por acojarme en los últimos momentos con desenfado, y guiarme hasta concretar mi formación. A Pepe (Jose Efraín González Ramírez) por el tiempo dedicado y el apoyo. A todos los trabajadores del INIVIT por contribuir de manera eficiente a la creación de este trabajo de diploma. A Freddy por la paciencia y el valor de estar a mi lado en esta etapa tan difícil. A mis amigos por confiar en mí y apoyarme en el cierre de este camino.

## Resumen

En Cuba, la presencia de potyvirus en el cultivo del ñame (*Dioscorea* spp.) ha aumentado debido a que este se ha venido propagando de forma agámica. En este trabajo, se caracterizaron los síntomas por especies y se implementaron las técnicas ELISA-DASI, *leaf-dip* y RT-PCR para el diagnóstico genérico de potyvirus y específico del *Yam mosaic virus* (YMV) y el *Yam mild mosaic virus* (YMMV). Se realizó un análisis filogenético de los potyvirus encontrados y finalmente se analizaron arvenses en las áreas de producción de semilla del INIVIT y sus alrededores. Se formaron 25 grupos síntoma-especie, la clorosis extendida y el mosaico ligero son los síntomas de mayor frecuencia de aparición. Según la prueba ELISA resultaron positivos a potyvirus 14 grupos síntoma-especie, donde *Dioscorea trifida* resulta la especie más susceptible ante las enfermedades virales presentes. En las muestras se encontraron partículas flexuosas que coinciden con el género de los potyvirus. El RT-PCR confirmó la presencia de potyvirus asociados a 12 de los 14 grupos síntoma-especie evaluados. El análisis Bayesiano sugirió que han existido múltiples introducciones del YMMV en Cuba, no siendo así para el YMV. Se identificaron 26 especies de arvenses pertenecientes a 15 familias, 10 de las cuales resultaron positivos a potyvirus según la prueba ELISA. Las familias *Asteraceae* y *Cyperaceae* resultaron las más susceptibles ante las enfermedades virales presentes, por lo que existe gran diversidad de arvenses que constituyen hospedantes alternativos de YMV y YMMV.

**Palabras clave:** Enfermedades virales, *Yam mild mosaic virus*, *Yam mosaic virus*

## **Abstract**

In Cuba, the presence of potyviruses in the cultivation of yams (*Dioscorea* spp.) has increased due to the fact that it has been spreading aggressively. In this work, the symptoms were characterized by species and the ELISA-DASI, leaf-dip and RT-PCR techniques were implemented for the generic diagnosis of potyvirus and specifically for *Yam mosaic virus* (YMV) and *Yam mild mosaic virus* (YMMV). A phylogenetic analysis of the potyviruses was carried out and finally weeds were analyzed in the seed production areas of INIVIT and its surroundings. Twenty-five symptom-species groups were formed, the extended chlorosis and the light mosaic are the symptoms of higher frequency of appearance. According to the ELISA test, 14 symptom-species groups were positive for potyvirus, where *Dioscorea trifida* is the most susceptible species to present viral diseases. In the samples, there were flexuous particles that coincide with the genus of the potyviruses. RT-PCR confirmed the presence of potyviruses associated with 12 of the 14 symptom-species groups evaluated. The Bayesian analysis suggested that it has been multiples introduction of YMMV in Cuba, but not for YMV. We identified 26 weed species belonging to 15 families, 10 of which were positive for potyviruses according to the ELISA test. *Asteraceae* and *Cyperaceae* were the most susceptible families to the viral diseases present, for which there is a great diversity of adversaries that constitute alternative hosts of YMV and YMMV.

**Keywords:** Viral diseases, *Yam mild mosaic virus*, *Yam mosaic virus*

## Tabla de contenido

	<b>Pág.</b>
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Revisión Bibliográfica</b>	4
2.1 Generalidades del género <i>Dioscorea</i> L	4
2.1.1 Descripción y caracterización	4
2.1.2 Origen y distribución	8
2.1.3 El ñame en Cuba	9
2.2 Problemas fitosanitarios que afectan el cultivo	10
2.2.1 Plagas y enfermedades	10
2.2.2 Virus que infectan el ñame ( <i>Dioscorea</i> spp.)	11
2.3 Manejo de enfermedades virales	20
<b>3. Materiales y Métodos</b>	22
3.1 Sintomatología en plantas de <i>Dioscorea</i> spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT	22
3.1.1 Caracterización de la sintomatología	22
3.1.2 Detección de potyvirus	22
3.2 Diversidad molecular de potyvirus asociados al cultivo del ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT	24
3.2.1 Amplificación del YMV y YMMV	24
3.2.2 Secuenciación y análisis filogenético de YMV y YMMV	24
3.3 Hospedantes alternativos de potyvirus asociados a <i>Dioscorea</i> spp.	25
3.3.1 Colecta y clasificación	25
3.3.2 Detección de potyvirus	25
<b>4. Resultados</b>	26
4.1 Sintomatología en plantas de <i>Dioscorea</i> spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT	26
4.1.1 Caracterización de la sintomatología	26
4.1.2 Detección de potyvirus	29
4.2 Diversidad molecular de potyvirus asociados al cultivo del ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT	31
4.2.1 Amplificación del YMV y YMMV	31
4.2.2 Secuenciación y análisis filogenético de YMV y YMMV	32
4.3 Hospedantes alternativos de potyvirus asociados a <i>Dioscorea</i> spp.	34
4.3.1 Colecta y clasificación	34
4.3.2 Detección de potyvirus	35
<b>5. Discusión</b>	38

5.1.	Sintomatología en plantas de <i>Dioscorea</i> spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT	38
5.1.1	Caracterización de la sintomatología	38
5.1.2	Detección de potyvirus	40
5.2	Diversidad molecular de potyvirus asociados al cultivo del ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT	41
5.3	Hospedantes alternativos de potyvirus asociados a <i>Dioscorea</i> spp.	42
6.	<b>Conclusiones</b>	44
7.	<b>Recomendaciones</b>	45
8.	<b>Referencias Bibliográficas</b>	
9.	<b>Anexos</b>	

## 1. Introducción

La crisis de alimentos que azota al mundo es y continuará siendo uno de los peores obstáculos para el desarrollo de la humanidad (González, 2012). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que para el año 2050 la población mundial necesitará un 70% más de alimentos. Esta crisis solo puede ser revertida con un incremento en la producción de alimentos, por lo que se hace imperiosa esta necesidad (Baloch *et al.*, 2009; Mejia, 2016).

Los cereales son los cultivos más importantes, luego las raíces y tubérculos con  $49 \times 10^6$  ha de área sembrada y una producción de  $635,3 \times 10^6$  t (Ortega, 1998; Harrison, 2002). En los cereales y tubérculos están representados los nueve alimentos base para que el hombre sobreviva (Mejia, 2016). Millones de personas de Asia, África y América Latina dependen de estos cultivos como fuente de alimento, forraje o ingresos económicos. Entre las raíces y tubérculos usados en la alimentación humana, el ñame (*Dioscorea* spp.) constituye un producto de alto valor nutricional para poblaciones rurales y urbanas.

Esta raíz tropical es la más importante después de la yuca y se considera sustituta de esta y la papa, pues proporciona alrededor de 200 calorías en la dieta diaria de más de 300 millones de personas en el trópico (González, 2012). Además, 100 g de ñame contienen 114 calorías, que representan el 6% del total diario necesario (Anexo I) (Zhao *et al.*, 2012). Los tubérculos de ñame presentan períodos relativamente largos de latencia. En consecuencia, pueden ser almacenados hasta por seis meses a temperatura ambiente, sin cambios significativos en sus propiedades nutricionales (Lebot, 2008).

Muchas especies del género *Dioscorea* se utilizan como materia prima en la industria farmacéutica para la síntesis de esteroides (Asiedu y Sartie, 2010). También, el ñame se ha utilizado para la producción de alcohol; sus bejucos se emplean para la elaboración de cuerdas y su follaje se dispone como alimento para aves de corral y el ganado. Los tubérculos de esta planta sirven como complemento en la medicina tradicional para el tratamiento de la indigestión, anorexia, diarrea y diabetes. En adición, algunas especies de este género tienen uso ornamental (Contreras, 2013).

Por tal motivo, el consumo del ñame al igual que su producción se han expandido. Se cultiva principalmente en países africanos, islas de las Antillas, países de Oceanía y en el continente americano en países como Colombia, Brasil, Venezuela, República Dominicana, Jamaica, Costa Rica, Puerto Rico, Panamá y Cuba (Opara, 2003; Arnau *et al.*, 2010). En nuestro país el ñame se cultiva tradicionalmente en las regiones oriental y central y su producción ha ayudado a la diversidad y estabilidad alimentaria. En los últimos años, se ha incrementado la demanda en el mercado nacional, logrando su

expansión y su utilización como producto de exportación (Borges *et al.*, 2009; González, 2012).

Este cultivo es afectado por varios virus que pertenecen a los géneros *Potyvirus*, *Potexyvirus*, *Badnavirus*, *Carlavirus*, *Cucumovirus* y *Comovirus*. Los virus pueden llegar a limitar la producción del cultivo y ocasionar daños enormes a la cosecha y pérdidas significativas. El virus más distribuido e importante que afecta el ñame es el *Yam mosaic virus* (YMV). Este puede causar clorosis, mosaicos severos, bandeado verde en las venas y atrofiamiento severo de las guías llevando a la reducción de la capacidad fotosintética del cultivo (González, 2005; Séka *et al.*, 2014). El *Yam mild mosaic virus* (YMMV) es el segundo de mayor prevalencia en el cultivo (Atiri *et al.*, 2003).

Las arvenses desempeñan una función importante como fuente de inóculo primario en la propagación y difusión de los virus que afectan a las plantas cultivadas (Agrios, 2005). Según Duffus (1971), las arvenses pueden cumplir tres funciones en la epidemiología de las enfermedades virales *i.e.* servir como reservorio de los virus, como reservorio de los vectores, o de ambos a la vez. La presencia de virus en arvenses puede ser un indicador de la alta incidencia de las enfermedades virales durante el crecimiento o desarrollo del cultivo. Las arvenses al ser reservorios virales mantienen una alta probabilidad de que exista un flujo viral entre las plantas de ñame, las arvenses asociadas y un mismo vector natural (Asala *et al.*, 2014).

El rendimiento del cultivo de ñame puede verse afectado no solo por la incidencia de plagas, sino también por la carencia de material de propagación de buena calidad. Tradicionalmente, este cultivo se propaga de forma agámica por fracciones de tubérculos, las que al sembrarse de un año para otro en el campo pueden ir acumulando entidades patógenas, por lo que es necesario un programa de rescate de semillas para incrementar las áreas de producción del cultivo (Rodríguez, 2000). La falta de semillas de calidad resulta el factor limitante de la producción local en el sector privado (Borges *et al.*, 2011).

El Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) se creó con el objetivo de solucionar estas problemáticas. De esta forma, el INIVIT provee a los productores de semillas de calidad, así como de una metodología de micropropagación y conservación que permita el manejo efectivo de la producción agrícola. Este Instituto ha permitido diversificar las producciones y crear un banco de germoplasma necesario para garantizar un aumento de la producción de ñame (Borges *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta que en las Biofábricas existe una metodología para la micropropagación de los principales genotipos comerciales de ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT y la demanda de este tubérculo en Cuba, resulta necesario

caracterizar los virus de mayor impacto negativo en el cultivo, por el peligro potencial que esto podría significar en la diseminación por todas las áreas cultivables en el país.

Ante esta problemática se planteó la siguiente hipótesis científica: La caracterización biológica y molecular de potyvirus en *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT pudiera contribuir a la implementación de tácticas eficientes de manejo de enfermedades virales en el cultivo.

### **Objetivo general**

Caracterizar los potyvirus en *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT.

### **Objetivos específicos**

1. Describir la sintomatología presente en plantas de *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT.
2. Caracterizar molecularmente los potyvirus asociados al cultivo del ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT.
3. Determinar los hospedantes alternativos de potyvirus asociados a *Dioscorea* spp.

## 2. Revisión Bibliográfica

### 2.1 Generalidades del género *Dioscorea* L.

#### 2.1.1 Descripción y caracterización

Los ñames (*Dioscorea* spp.), están clasificados en la familia *Dioscoreaceae* y representados por unas 644 especies, por lo que comprenden el género más grande de esta familia. Estas plantas son monocotiledóneas tropicales, escaladoras, dioicas, tubulares, anuales o perennes (Govaerts *et al.*, 2007; Mignouna *et al.*, 2007; Lebot, 2008). El ñame cultivado proporciona un alimento básico para millones de personas en África, América del Sur, Asia y el Pacífico (Risimeri, 2000), y constituye una fuente valiosa de alimento (**Tabla I**) en tiempos de hambruna y escasez (Kumar *et al.*, 2017; Sukal *et al.*, 2017). Además, proporcionan valiosos compuestos farmacológicamente activos (**Tabla II**) en la medicina tradicional (Lebot, 2008). La producción de ñame es más alta en África occidental, que representa el 95% de la producción total mundial (Mignouna *et al.*, 2008; Asiedu y Sartie, 2010; FAOSTAT, 2018).

**Tabla I.** Contenido de nutrientes del ñame en comparación con otros cultivos.

Composición	Cultivos comerciales						
	Maíz	Arroz	Trigo	Papa	Yuca	Frijol (verde)	Ñame
Agua	10	12	13	79	60	68	70
Proteína	9,4	7,1	12,6	2,0	1,4	13,0	1,5
Grasa	4,74	0,66	1,54	0,09	0,28	6,8	0,17
Carbohidratos	74	80	71	17	38	11	28
Fibra	7,3	1,3	12,2	2,2	1,8	4,2	4,1
Azúcar	0,64	0,12	0,41	0,78	1,7	0	0,5

Dentro del gran número de especies del género *Dioscorea* solo 25 son comestibles (González, 2012), y *Dioscorea* sect. *Rajania* es endémica de las islas del Caribe (Bahamas, Antillas Mayores y Antillas Menores). En Cuba se encuentran 17 especies nativas, 12 de ellas endémicas, más dos exóticas naturalizadas y tres ocasionalmente cultivadas (González, 2012; Contreras, 2013; Pérez-Camacho y Raz, 2017). Alrededor de 10 especies son económicamente importantes como plantas cultivadas. El cultivo de este tubérculo se clasifica como el cuarto cultivo de raíces más importante por su producción

después de la papa, boniato y yuca. En 2016, la producción mundial de ñame se estimó en alrededor de  $66 \times 10^6$  t (FAOSTAT, 2018).

**Tabla II.** Compuestos bioactivos comunes presentes en las distintas especies de *Dioscorea*.

Compuestos	Usos	Especies	Fuentes
Diosgenina	Síntesis de fármacos esteroideos	<i>Dioscorea deltoidea</i> Wall. ex Griseb	Asha y Nair (2005)
Sapogenina	Efecto antiinflamatorio	<i>Dioscorea</i> sp.	Martin (1969)
Saponina	Infecciones de la piel	<i>Dioscorea</i> sp.	Nayaboga (2014)
Cyanidin	Exhibe inhibidores de la tripsina	<i>Dioscorea</i> sp.	Hou <i>et al.</i> (2000)
Flavonoides	Infecciones de la piel	<i>Dioscorea belophylla</i> (Prain) Voigt ex Haines	Poornima y Ravishankar (2007)
Alantoina	Desintoxicación del amoníaco	<i>Dioscorea</i> sp.	Fujihara y Yamaguchi (1978)
Dioscorine	Control de la natalidad	<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	Adetoun y Ikotun (1989)
Compuestos ohenólicos	Infecciones de la piel	<i>Dioscorea pentaphylla</i> L.	Kumar y Jena (2014)

El ñame se propaga y se distribuye ampliamente en los trópicos y subtrópicos del mundo. Más de 300 millones de personas sobreviven a la pobreza debido a que el ñame es una fuente de alimentos y medio para generar ingresos (Mignouna *et al.*, 2003). En adicción, puede procesarse para su uso picado, hervido, asado o frito, y se puede secar para producir harina de ñame (Adeniji *et al.*, 2012; Oluwole *et al.*, 2013).

Su ubicación taxonómica, según Janssens (2001), es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Dioscoreales

Familia: *Dioscoreaceae*

Género: *Dioscorea*

La morfología de los tubérculos, la dirección del torcido del vástago, el dioecy y la forma del ala de la fruta/semilla son los caracteres fenotípicos más importantes para la

clasificación sistemática del género (Wilkin *et al.*, 2005). El género agrupa plantas geófitas herbáceas, monocotiledónea, que presentan algunas características de las dicotiledóneas, tales como reticulado veteado, acechado hojas nerviosas, haces vasculares dispuestos circularmente en el tallo, y el latón posición eral del pistilo. Generalmente dioicas, en Cuba son hermafroditas, aunque pueden llegar a ser excepcionalmente monoicas, con rizomas o tubérculos carnosos y sin zarcillos.

El tallo es anual o plurianual, voluble y trepador o procumbente, rara vez erecto o nulo. Generalmente se observan dos zonas, una de tallo rizomatoso subterráneo con tendencia a mantenerse perenne y otra de tallo aéreo herbáceo. Esta última parte del tallo es trepadora, busca apoyo en árboles y arbustos hasta alcanzar varios metros de longitud, se enrolla a la izquierda o derecha según la especie. Puede ser alado, con espinas o sin espinas, pubescente o no pubescente y circular, rectangular o poligonal en la sección transversal (Contreras, 2013).

Según Pérez-Camacho y Raz (2017), los haces vasculares comúnmente están dispuestos en dos círculos concéntricos. Las hojas no presentan estípulas (raramente con pseudoestípulas), son simples o digitado-compuestas, enteras o palmeado-lobuladas. Presentan un tamaño mediano, son largamente pecioladas y de forma acorazonada. Se disponen de manera opuesta y/o alterna en la misma planta. Las inflorescencias se ubican axilarmente, pueden llegar a ser solitarias o en fascículos de dos a ocho, en panícula, racimo o espiga de cimas, a menudo reducidas a una flor. Estas flores son pequeñas, unisexuales, actinomorfas (en Cuba) o ligeramente zigomorfas. Las flores masculinas se encuentran en gran número sobre panojas, constan de un cáliz con tres sépalos y una corola con tres pétalos; normalmente presentan verticilos cada uno con dos estambres.

El perianto es epígino, biseriado, rotáceo, campanulado, infundibuliforme o tubular; presenta seis tépalos, petaloides, concrecentes al menos en la base. Se distinguen seis estambres, biseriados, tres de estos a veces son estériles o incluso pueden llegar a estar ausentes. Los filamentos son libres o en ocasiones concrecentes en la base hasta formar un tubo, insertados en el perianto o en el tálamo. Presenta dos anteras locales, tetrasporangiadas, de dehiscencia longitudinal, las tecas son concrecentes o distintas, raramente separadas por un conectivo largo, apendiculado. El fruto es una cápsula loculicida (generalmente triloculares) o indehiscente, samaroide o abayado. Las semillas son pequeñas, planas (o globosas), con o sin ala; El endospermo es copioso, sin almidón, rodeando el embrión y de color claro (Contreras, 2013; Pérez-Camacho y Raz, 2017).

Algunas especies de *Dioscorea* producen bulbillos (tubérculos aéreos), mientras que otras forman tubérculos subterráneos de formas que van desde casi esférico hasta completamente irregulares, de color y tamaño variable dependiendo de la especie y las condiciones ambientales (Álvarez, 2000). El tubérculo está formado por la cabeza, el cuerpo y la cola, presenta raíces adventicias y una estructura llamada cormo. El tubérculo crece por un meristemo apical, generalmente con geotropismo negativo. Está cubierto por una corteza corchosa, derivada de un felógeno que permanece activo aún después de que se cosecha.

Debajo de la corteza se halla la zona cortical, formada por parénquima con bajo contenido de almidón e inmediata la zona de meristemos del que derivan las yemas. La mayor porción del tubérculo la ocupa el cilíndrico central, formado por parénquima rico en almidón, hay haces vasculares numerosos, que aparecen rodeados de parénquima menos denso, por lo que se destacan como áreas más claras en un corte transversal del tubérculo. Hay además fibras, cristales de oxalato de calcio y canales de mucílago y en algunas especies aparecen áreas con antocianinas que le dan un color morado a la pulpa, en donde el color básico de ésta varía del blanco al amarillo (Contreras, 2013). El tubérculo es la parte alimenticia que puede ser uno o varios y llegan a pesar hasta 20 kg. Los análisis nutricionales han mostrado que el tubérculo de ñame aventaja a otras raíces y tubérculos en contenido de aminoácidos y proteínas (Alvis *et al.*, 2009).

El género *Dioscorea* se divide en secciones taxonómicas: las 10 especies que se utilizan como cultivos alimentarios pertenecen a cinco secciones diferentes, a saber, *Enanthiophyllum* (*Dioscorea alata* L., *Dioscorea cayennensis* Lam., *Dioscorea nummularia* Lam., *Dioscorea opposita* thunb., *Dioscorea rotundata* Poir. y *Dioscorea transversa* R.Br.), *Combilium* (*Dioscorea esculenta* Lour.), *Opsophyton* (*Dioscorea bulbifera* L.), *Macrogynodium* (*Dioscorea trifida* L. f.) y *Lasiophyton* (*Dioscorea pentaphylla* L.).

Los ñames en la sección *Enanthiophyllum* producen de uno a tres tubérculos grandes y tienen tallos alados que se entrelazan a la derecha (en sentido contrario a las agujas del reloj), con bulbillos ocasionales. De manera similar, los ñames en la sección *Combilium* tienen tallos que también se enroscan a la derecha, pero tienen numerosos tubérculos más pequeños. Los ñames de la sección *Opsophyton* producen bulbillos aéreos con los tallos que giran hacia la izquierda (en el sentido de las agujas del reloj), mientras que *Macrogynodium* produce pequeños tubérculos, con tallos sin espinas que giran hacia la izquierda (Mignouna *et al.*, 2002; Girma *et al.*, 2016).

La sección *Lasiophyton* produce un grupo de tubérculos de tamaño mediano, con tallos que se entrelazan a la izquierda y con grandes espinas en el tallo (Lebot, 2008). Sin

embargo, aún quedan algunas controversias con respecto a la taxonomía del ñame, particularmente para los guinea ñames cultivados y sus parientes silvestres (Terauchi *et al.*, 1992; Ramser *et al.*, 1997; Mignouna *et al.*, 2002; Girma *et al.*, 2016).

Estudios citológicos sobre *Dioscorea* spp. determinaron el número del cromosoma básico de  $x = 9$  y  $x = 10$  en las especies de América, Europa y África, mientras que las especies de Asia y Oceanía tienen el número del cromosoma básico de  $x = 10$  (Essad, 1984). Sin embargo, investigaciones posteriores han revelado que *D. rotundata*, la cual se pensaba que era una especie tetraploide ( $2n = 40$ ), es un diploide con un número de cromosoma básico de  $x = 20$  (Scarcelli *et al.*, 2005). Del mismo modo *D. trifida* ( $2n = 80$ ), que se consideró octoploide, es en realidad un tetraploide con un número de cromosoma básico de  $x = 20$  (Bousalem *et al.*, 2006).

Se considera que *D. alata* tiene un número de cromosoma básico de  $x = 10$  (Mignouna *et al.*, 2008). Sin embargo, un estudio más reciente proporcionó evidencia genética para confirmar diploidía de plantas con  $2n = 40$  cromosomas, por lo tanto, apoyando la hipótesis de que las plantas con  $2n = 40$ ,  $60$  y  $80$  cromosomas son diploides, triploides y tetraploides, respectivamente, con el número cromosómico básico de *D. alata* siendo  $x = 20$  (Arnau *et al.*, 2010). Además, se han observado niveles variables de ploidía dentro de *D. nummularia* ( $2n = 3x = 60$  a  $2n = 6x = 120$ ) (Lebot *et al.*, 2017).

### **2.1.2 Origen y distribución**

Se cree que las principales especies cultivadas de ñame se originaron en las áreas tropicales de tres continentes separados, incluyendo (i) África (principalmente África occidental para *D. rotundata*, *D. cayennensis* y *D. dumetorum*), (ii) la región que comprende el sur Asia oriental y el Pacífico sur (*D. alata* y *D. esculenta*) y (iii) América del Sur (*D. trifida*). La ocurrencia de *Dioscorea* spp. en el sur de Asia, África y América del Sur son anteriores a la historia de la humanidad, con eventos de domesticación que ocurren independientemente en América, África, Madagascar, el sur y sureste de Asia y Oceanía (Ayensu y Coursey, 1972; Lebot, 2008; Arnau *et al.*, 2010; Bhattacharjee *et al.*, 2011).

Aunque todavía existe un debate sobre el origen de *D. alata*, ya que aún no se ha encontrado en su estado salvaje, los estudios que utilizan marcadores de AFLP (del inglés: *Amplified Fragment Length Polymorphism*) muestran que está estrechamente relacionado con *D. nummularia* y *D. transversa* (Malapa *et al.*, 2005), que están restringidas a las islas del sudeste asiático y Oceanía. Por lo tanto, por asociación, se ha propuesto que *D. alata* puede pertenecer a un grupo de genes del sur de Asia y el

Océano que se limita a las antiguas regiones sahulianas y balaceanas (Lebot, 1997; Arnau *et al.*, 2010).

El cultivo de ñame ocurre en muchas regiones tropicales. Sobre la base de los datos de producción anual publicados por las estadísticas de la FAO, el ñame se cultiva en 61 países diferentes (FAOSTAT, 2018). Sin embargo, esta no es una lista completa ya que algunos países (como China) no proporcionan estadísticas anuales de producción a la FAO. *D. alata* es la especie más ampliamente distribuida en los trópicos húmedos y semi-húmedos y, junto con *D. rotundata* y *D. cayennensis*, que son indígenas de África Occidental, es el ñame más importante en términos de cantidad producida y comercializada (Lebot, 2008; Asiedu y Sartie, 2010). *D. alata* (también conocido como ñame mayor) junto con *D. esculenta* (también conocido como ñame menor) es la especie de ñame cultivada más importante en el Pacífico. Si bien *D. esculenta* es importante como una especie de alimento básico y es la especie dominante cultivada por las comunidades dependientes del ñame de Papua Nueva Guinea, *D. alata* aún conserva un alto estatus de su uso en fines culturales y ceremoniales en todo el Pacífico (O'Sullivan, 2010).

### **2.1.3 El ñame en Cuba**

En Cuba, el ñame se cultiva tradicionalmente en las regiones oriental y central del país, en este cultivo los tubérculos subterráneos son la parte útil de la planta, tanto para el consumo, como para semilla en la próxima siembra. Este cultivo se ha venido propagando de forma agámica por fracciones de tubérculos, las que al sembrarse de un año para otro en campo pueden ir acumulando patógenos, por lo que es necesario un programa de rescate de semillas para incrementar las áreas de producción del cultivo (Rodríguez, 2000). El INIVIT mantiene un Banco de Germoplasma de *Dioscorea* spp. con aproximadamente 120 accesiones pertenecientes a seis especies según MINAG (2018), *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayennensis*, *D. bulbifera*, *D. esculenta* y *D. trifida*.

Se ha producido un incremento en cuanto a las áreas del cultivo del ñame y los volúmenes de producción cosechados. Analizando el período 1997-2004, el área destinada al cultivo del ñame ha crecido desde 2 100 hasta 7 500 ha mientras, que la producción aumentó de 6 400 a 17 000 t (MINAG, 2004). Sin embargo, podemos afirmar que los rendimientos se mantienen relativamente bajos pues solo alcanzan las 3,8 t ha<sup>-1</sup>, en buena parte debido a la carencia de semilla de calidad agronómica y con certificación fitosanitaria.

## 2.2 Problemas fitosanitarios que afectan el cultivo

### 2.2.1 Plagas y enfermedades

Los problemas fitosanitarios del cultivo son importantes en función de la disminución de la productividad y de las pérdidas observadas durante el transporte y almacenamiento con la consecuente depreciación del producto para los mercados internos y externos (Moura, 2005).

El ñame es susceptible a gran variedad de plagas y enfermedades durante el ciclo del cultivo y su poscosecha. En las áreas productoras del cultivo se ha informado la ocurrencia de plagas y enfermedades que constituyen una limitante en su producción (Degras, 1993; Mantell, 1994). Se estiman pérdidas en los rendimientos de alrededor del 25% causadas por plagas y enfermedades. Las principales plagas del ñame son los nematodos, hormigas, insectos y roedores (Onwueme, 1978; Onwueme y Charles, 1994; Sudheerm, 2015). Dentro de las enfermedades aparecen las causadas por hongos, bacterias y virus (Degras, 1993; Hughes *et al.*, 1997).

Los insectos que afectan al ñame son los escarabajos, las chinches y las hormigas. Los mismos se alimentan de los tubérculos afectándolos cuantitativa y cualitativamente, y creando puertas de entradas a otros organismos patógenos oportunistas, que provocan el deterioro posterior de la producción fundamentalmente durante la poscosecha (Adeniji, 1970). El escarabajo *Heteroligus meles* (Billberg) afecta al ñame en toda África mientras que *Heteroligus appius* (Burmeister) es importante en el sur de Nigeria (Coursey, 1967). La chinche del ñame, *Aspidiella hartii* Cockerell, infestan los tubérculos y, en ocasiones, el follaje, lo que causa un gran crecimiento. Los tubérculos almacenados son particularmente susceptibles al ataque. Las chinches del ñame se informan en África, Asia, América Central, las islas del pacífico y las Indias Occidentales (Salerno *et al.*, 2018).

El nematodo del ñame (*Scutellonema bradys* Steiner y Le Hew) y el nematodo de las agallas de las raíces (*Meloidogyne* spp.) son las plagas de mayor importancia de cultivo y están informadas en la mayoría de las áreas productoras (Kwoseh *et al.*, 2007). Varias especies de *Pratylenchus* son informadas afectando este cultivo en Puerto Rico y el sudeste asiático (Kermarrec *et al.*, 1991). Estos causan lesiones debajo de la piel del tubérculo que son amarillas al principio, y se convierten en manchas oscuras de color marrón oscuro que pueden cubrir la superficie del tubérculo en tubérculos muy infestados.

La infección a menudo comienza antes de la cosecha y continúa en el almacenamiento, lo que lleva a una pérdida de alimentos y material de siembra para el cultivo de la próxima temporada (Siddiqi, 1972). Las mayores pérdidas durante el período de almacenamiento poscosecha están relacionadas con la interacción entre nematodos (*S. bradys*, *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp.), hongos y bacterias, y en menor medida a factores ambientales como la humedad y la temperatura (Bridge, 1972).

La antracnosis es la enfermedad fungosa más importante del ñame, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Onwueme y Charles, 1994). Está distribuida en las regiones tropicales y es la enfermedad, causada por hongos, de mayor prevalencia en todas las regiones productoras (Adebanjo y Onesirosan, 1986). La enfermedad está asociada al surgimiento de manchas carmelitas en las hojas jóvenes que crecen a medida que estas maduran. Las hojas maduras de los cultivares susceptibles a la antracnosis se ennegrecen rápidamente en respuesta a la luz solar y la presencia de numerosas esporas de *C. gloeosporioides*, que germinan (Winch *et al.*, 1993). Otra enfermedad fúngica del ñame es la mancha y el tizón foliar causado por *Curvuloria* spp. (Onwueme, 1978).

Algunas enfermedades causadas por bacterias se han reportado en el ñame (Amusa *et al.*, 2003; Asare-Bediako *et al.*, 2007). Sin embargo, no se atribuyen pérdidas económicas de importancia a las mismas (Olivera *et al.*, 2005).

### **2.2.2 Virus que infectan el ñame (*Dioscorea* spp.)**

Los virus se encuentran entre los factores más importantes que amenazan la producción, la productividad del ñame y el movimiento seguro de los germoplasmas. Los virus que afectan al ñame se dividen en seis géneros principales: *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Badnavirus*, *Carlavirus*, *Cucumovirus* y *Comovirus*. Estos virus varían significativamente en su incidencia, distribución y gravedad en el rendimiento y la calidad del tubérculo en función de las agroecologías en que se cultivan los ñames (Yeyeh *et al.*, 2014). La detección de su ocurrencia y la evaluación de su variabilidad en las diferentes agroecologías de los trópicos y supratrópicos es el área principal de estudios (Lebas, 2002).

#### **Género *Badnavirus***

Los badnavirus (Familia: *Caulimoviridae*; Género: *Badnavirus*) son virus de ADN baciliformes sin envoltura con un genoma monopartito que contiene alrededor de 7,2 a 9,2 kb de ADNdc con tres a siete marcos de lectura abiertos. Son géneros genéticamente

y serológicamente diversos de virus que tienen partículas baciliformes de 25–30 × 120 nm.

Según Bhat *et al.* (2016), son uno de los grupos de virus de plantas más importantes y han surgido como patógenos serios que afectan el cultivo de varios cultivos hortícolas en los trópicos, especialmente banano, pimienta negra, cacao, cítricos, caña de azúcar, taro y ñame. Algunos virus del género *Badnavirus* también se conocen como virus endógenos integrados en sus genomas anfitriones y algunos de estos virus endógenos pueden activarse, por ejemplo, a través del estrés abiótico, dando lugar a formas episomales infecciosas. En el Caribe, un virus baciliforme se asoció con una enfermedad interna de la mancha marrón. *Dioscorea alata badnavirus* (DaBV) y el *badnavirus Dioscorea bulbifera* serológicamente relacionado (DbBV) se detectaron en un rango de especies de ñame de África Occidental utilizando antisueros específicos.

### **Género *Cucumovirus***

El *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), género *Cucumovirus*, es una especie con varias cepas o subespecies serológicamente y genéticamente distintas. Las partículas de los virus son isométricas y tienen un diámetro de aproximadamente 30 nm. La especie en su conjunto tiene un rango de hospedante muy amplio, pero tiende a haber cierta especialización dentro de las cepas o subespecies. Las infecciones por CMV en el ñame tienden a ser esporádicas, lo que sugiere que surgen de un encuentro casual entre un vector virulífero y la planta del ñame.

Sin embargo, ocasionalmente, la incidencia de CMV en el ñame puede ser alta a nivel local. Se han informado cepas de CMV que infectan *D. alata*, *D. trifida* y *D. rotundata* en África Occidental, el Caribe, América del Sur y el Pacífico Sur (Migliori y Cadilhac, 1976). El CMV ha sido detectado en Guadalupe, Costa de Marfil y Nigeria (Hughes *et al.*, 1997). Recientemente, análisis realizados en las principales zonas productoras en Ghana, Togo y Benin revelaron, por primera vez, la aparición de la infección por CMV en el ñame (Eni *et al.*, 2008).

La detección de este virus en los otros tres países africanos (Ghana, Togo y Benin) trajo la necesidad de desarrollar anticuerpos policlonales a partir de aislados de ñame de CMV para asegurar la detección de otros serotipos del CMV para los cuales no hay anticuerpos policlonales. La producción de anticuerpos policlonales contra el CMV mejora el monitoreo y la prevención de la propagación de la infección por CMV en regiones productoras de ñame (Eni *et al.*, 2010).

### **Género *Potexvirus***

El *Dioscorea latent virus* (DLV) es el único miembro del género *Potexvirus* que se sabe que infecta el ñame. Se ha informado en Puerto Rico y no causa síntomas en *D. composita* o *D. floribunda* (Lawson *et al.*, 1973). Puede transmitirse mecánicamente a varias especies de indicadores herbáceos como *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana megalosiphon*, causando nuevamente una infección sin síntomas. El DLV se encuentra a menudo en asociación con el *Dioscorea alata virus* (DAV) y la detección generalmente se realiza mediante ELISA (del inglés: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando un antisuero policlonal.

### **Género *Comovirus***

El *Dioscorea mottle virus* (DMoV) pertenece al género *Comovirus* que tiene partículas isométricas, de 20 a 30 nm de diámetro, y un genoma bipartito de ARN monocatenario. Se ha encontrado que el DMoV puede infectar a *D. alata* en Nigeria y es probable que se distribuya en África occidental. Los síntomas en *D. alata* incluyen clorosis leve (tensión de clorosis leve), moteado (moteado moteado) y necrosis (cepa de necrosis). Este virus es transmisible mecánicamente a partir de *D. alata*, y se cree que el vector natural es un escarabajo. El DMoV puede transmitirse mecánicamente a las plantas indicadoras *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Chenopodium murale*, *C. amaranticolor* y *C. quinoa*.

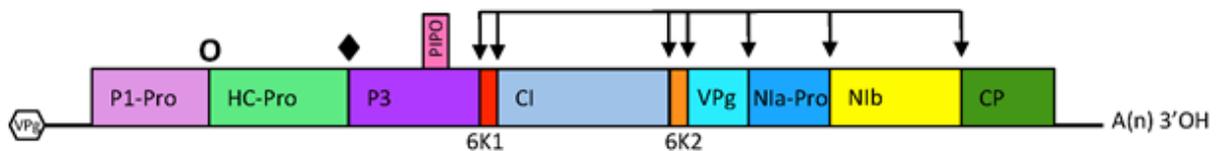
### **Género *Potyvirus***

Los potyvirus constituyen un grupo de virus importante que causa graves daños económicos a diversos cultivos. Se cree que son responsables de aproximadamente el 40% de todas las enfermedades de plantas de origen viral. Las partículas de potyvirus son barras flexuosas de 680 a 900 nm de longitud y contienen una molécula de ARN genómico monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 10 kb, que está recubierto por un solo tipo de proteína de la cápside (Kwak *et al.*, 2015). Se caracterizan por una región no traducida 5 '(UTR), un gran marco abierto de lectura (ORF; del inglés: *Open Reading Frame*) y una UTR 3'. Son el género de virus de ARN más grande y económicamente más importante de los grupos y familias de virus de plantas reconocidos.

### **Organización del genoma**

El genoma de los potyvirus posee una simple cadena de ácido ribonucleico (ARN) en sentido positivo (Adams *et al.*, 2011), con aproximadamente 10 000 nucleótidos (Riechmann *et al.*, 1992) y un único marco de lectura abierto (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Los miembros de este género presentan un genoma constituido por un marco

abierto de lectura, (ORF: del inglés: *Open Reading Frame*) que codifica 10 proteínas: P1, HC-PRO, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb y CP (**Fig. 1**). Recientemente fue descubierto el marco de lectura abierto PIPO (del inglés: *Pretty Interesting Potyviridae* ORF) mediante un alineamiento múltiple de 48 especies virales de la familia *Potyviridae* realizado por (Chung *et al.*, 2008) y la verificación de una sobreposición en parte del gene P3. PIPO está relacionada con el movimiento de los virus en la planta (Wei *et al.*, 2010; Wen y Hajimorad, 2010). Variantes de este marco de lectura abierto se han informado como PISPO (del inglés: *Pretty Interesting Sweet Potato Potyviral* ORF) en potyvirus del boniato (Mingot *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Mapa genético típico de un miembro del género *Potyvirus* (Wylie *et al.*, 2017).

Las funciones de las proteínas virales son:

P1: Procesamiento proteolítico, serín proteasa (Verchot y Carrington, 1995b), multiplicación viral (Verchot y Carrington, 1995a), potenciador de la supresión de PTGS (Kasschau y Carrington, 1998) y supresor *per se* en algunos casos (López-Moya *et al.*, 2015). Posible determinante de huésped (Valli *et al.*, 2007).

HC-Pro: Procesamiento proteolítico como cisteína proteasa de tipo papaína (Carrington *et al.*, 1989), transmisión por pulgones (Kassanis y Govier, 1971), movimiento célula-célula (Rojas *et al.*, 1997) y a larga distancia (Cronin *et al.*, 1995), supresor PTGS (Anandalakshmi *et al.*, 1998), sinergismo y determinante de huésped (Saenz *et al.*, 2002).

P3: Amplificación viral (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1993), determinante de patogenicidad (Saenz *et al.*, 2000).

6K1: Determinante de patogenicidad (Merits *et al.*, 2002). Recientemente descrita como proteína madura *in vivo* en plantas infectadas con PPV (Waltermann y Maiss, 2006).

CI: Replicación viral, actividad helicasa (Lain *et al.*, 1991), movimiento célula-célula (Carrington *et al.*, 1998; Sorel *et al.*, 2014).

6K2: Amplificación viral (Merits *et al.*, 2002). Anclaje del complejo de replicación a membrana (Schaad *et al.*, 1997a).

VPg: Unión covalente al extremo 5' (Oruetxebarria *et al.*, 2001), traducción del ARN

genómico (Schaad *et al.*, 2000), determinante de huésped (Schaad *et al.*, 1997b). A menudo se encuentra fusionada a NIa-Pro. Localizada en el núcleo formando inclusiones nucleares junto a NIb.

NIa-Pro: Serín proteasa con cisteína en el sitio activo, encargada del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral (Riechmann *et al.*, 1992). Generalmente fusionada a VPg por baja eficiencia del procesamiento entre ambas.

NIb: ARN polimerasa dependiente de ARN (Hong y Hunt, 1996), forma inclusiones nucleares, está relacionada con la replicación del genoma.

CP: Ensamblaje viral (Voloudakis *et al.*, 2004), transmisión por pulgones (Harrison y Robinson, 1988), movimiento célula-célula y sistémico (Dolja *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1997), amplificación viral (Mahajan *et al.*, 1996) y determinante de patogenicidad.

PIPO: Movimiento viral (Wei *et al.*, 2010; Cheng y Wang, 2017).

### **Los potyvirus del ñame**

Varios miembros del género potyvirus se informaron en afectaciones al cultivo del ñame, entre los que destacan: YMV, *Dioscorea alata potyvirus* (DaV), *Dioscorea greenbanding mosaic virus* (DGBMV), *Nigerian yam mosaic* (YV-N), *Dioscorea greenbanding virus* (DGBV), *Dioscorea trifida potyvirus* (DTV), *Dioscorea alata ring mottle virus* (DARMV), *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) y *Dioscorea dumetorum potyvirus* (DDV) (Lebas, 2002).

El YMV es el virus mejor caracterizado en el cultivo. Su primer informe se realizó afectando *D. cayennensis* en Costa de Marfil y se ha encontrado posteriormente afectando otras especies de ñame (Bousalem *et al.*, 2000). Es un virus de ARN de simple cadena, sus viriones tienen una longitud de 785 nm, se transmite tanto mecánicamente como por áfidos vectores. Puede causar clorosis y mosaicos severos, bandeado verde en las venas, atrofiamiento severo de las guías llevando a la reducción de la capacidad fotosintética del cultivo. Con efectos perjudiciales sobre el rendimiento del tubérculo (Odu *et al.*, 2001; Séka *et al.*, 2014).

Los aislados de YMV se separaron en dos serogrupos, basado en su reacción con anticuerpos monoclonales. La secuencia nucleotídica completa del aislado de Costa de Marfil se ha comparado con posteriores secuencias de nuevos aislados revelándose la presencia de motivos conservados característicos del género de los *potyvirus* (Aleman *et al.*, 1996; Duterme *et al.*, 1996). La variabilidad genética entre diferentes aislados se considera alta, lo cual se atribuye a eventos de recombinación, así como a la acumulación de mutaciones (Bousalem *et al.*, 2000).

Varios potyvirus están relacionados al YMV serológicamente y en cuanto a rango de hospedante. Un ejemplo es DGBMV en África Occidental relacionado serológicamente con el YMV y que parece idéntico al YV-N, pero nunca se ha encontrado en *D. trifida* y nunca en combinación con el CMV (Porth *et al.*, 1987). Entre los virus que afectan el cultivo el YMV es el agente causal de la enfermedad viral más importante y puede causar severas pérdidas en el mismos; se han documentado reducciones en los rendimientos de entre 50 y 65% en cultivares de *D. rotundata* en Nigeria (Adeniji *et al.*, 2012).

El YMMV es el segundo de mayor prevalencia en el cultivo después del YMV. El YMMV se ha informado en *D. alata* en África, Asia y Oceanía (Atiri *et al.*, 2003). Fue originalmente descrito como Virus I del ñame, pero es sinónimo del *Dioscorea alata virus* (DaV) (Mumford y Seal, 1997; Odu *et al.*, 1999), luego que se mostraron las primeras evidencias moleculares para la clasificación del YMMV como un potyvirus distinto. Análisis de la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína de la cápside del YMMV revelan sustanciales diferencias tanto del YMV como del JYMV. El YMMV es transmitido por áfidos vectores y de forma mecánica, aunque con baja eficiencia (Odu *et al.*, 1999).

### **Hospedantes alternativos de potyvirus**

Las arvenses relacionadas con el ñame pueden convertirse en fuente de inóculo para las plantas durante la próxima temporada de crecimiento (Alegbejo y Kashina, 2000; Asala *et al.*, 2014). Estudios realizados Gumedzeo (2002), Moran *et al.* (2002) y Amusa *et al.* (2003) identificaron virus de ñame en arvenses que no estaban asociadas con campos de cultivo. Sin embargo, Mukhtar *et al.* (2012) identificaron el YMV en 16 muestras de arvenses y en alrededores de los campos de ñame.

### **Enfermedades virales en el germoplasma cubano de ñame**

En Cuba, Hernández *et al.* (2001) informaron una sintomatología asociada a la presencia de partículas similares a las descritas para el grupo de los potyvirus. Borges *et al.* (2011) determinaron reacciones positivas para el YMMV en un clon de *D. alata* en la región de Baracoa, mediante el uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

### **Diagnóstico de las enfermedades del ñame**

La detección rápida y precisa de los virus del ñame es vital para la gestión y el control de la enfermedad, pero el diagnóstico de los virus del ñame plantea una serie de problemas. La variabilidad de los síntomas causados por cambios en los factores ambientales, las diferencias en los cultivares o variedades de ñame y/o las cepas de los virus hacen que los diagnósticos de campo no sean confiables. Varios métodos para la detección e

identificación de virus en muestras de plantas, en general, se han desarrollado y utilizado con éxito.

La elección de qué método utilizar para un experimento específico depende en gran medida de: la sensibilidad y la especificidad, el período de tiempo en el que se completa la prueba, la disponibilidad de las instalaciones y la información disponible sobre el patógeno en estudio. En general, las técnicas de diagnóstico en la detección de virus se dividen en dos categorías debido a las propiedades intrínsecas del propio virus.

Los métodos se basan en la detección de la proteína de la cápside y ácidos nucleicos genómicos como ensayos de ELISA e inmunotransferencia (DIBA), cuyo límite de detección de la proteína viral (LOD) es de 1 a 10 ng/ml de savia, y la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT)-PCR, siendo esta última más sensible que otros métodos que alcanzan un LOD de 1 fg/ml de ARN de virus (Fenby *et al.*, 2010).

En general, los diferentes métodos para la detección e identificación de un patógeno se pueden agrupar en una de las tres categorías: 1) bioensayo 2) inmunoensayo 3) técnicas basadas en ácido nucleicos (Naidu y Hughes, 2001; Craig *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2014; Kumlachew, 2015; Martinelli *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2016).

### **Bioensayo**

Hasta el momento en que se desarrollaron métodos basados en proteínas y ácidos nucleicos, la observación visual y el uso de plantas herbáceas indicadoras se habían utilizado para la detección e identificación de patógenos causantes de enfermedades (De Leeuw, 1972). La sintomatología y los estudios de transmisión se utilizaron como un método biológico para el diagnóstico de la enfermedad del virus del ñame (Terry, 1976). Los síntomas en las plantas se usan comúnmente para caracterizar una enfermedad que tiene etiología viral y para el aislamiento de plantas enfermas en un intento por controlar la enfermedad. La inspección visual es relativamente fácil cuando los síntomas son características claras de una enfermedad específica. Sin embargo, muchos factores, como la cepa del virus, el cultivo/variedad de la planta huésped, el momento de la infección y el medio ambiente pueden influir en los síntomas que se presentan (Matthews, 1980).

Además de estos, los síntomas pueden ser muy leves e inconclusos, o las plantas infectadas pueden no tener síntomas, como resultado, este método de diagnóstico no es lo suficientemente eficiente ni lo suficientemente consistente como para ser usado de manera rutinaria para la identificación y detección de virus, y por lo tanto no son útiles para la certificación de material de siembra de ñame.

Sin embargo, el bioensayo mediante el uso de una serie de plantas indicadoras sigue siendo una herramienta indispensable para la detección e identificación de virus de plantas y los síntomas originales siguen siendo de gran importancia para la denominación de virus de plantas (Mulholland, 2009). Estos métodos siguen siendo útiles en las etapas preliminares de la investigación de nuevos virus.

### ***Inmunoensayos (Serología)***

La serología se usa hace casi cien años. Se utilizan dos tipos de anticuerpos en el desarrollo de pruebas de sero-diagnóstico, anticuerpos policlonales y monoclonales, preparados por diferentes protocolos. Los antisueros policlonales son inespecíficos y contienen anticuerpos contra todos los epítomos disponibles en el antígeno. Esta capacidad los hace útiles cuando la naturaleza del antígeno es desconocida y menos sensible a los cambios de antígenos y proporciona una señal más robusta debido a la detección de múltiples epítomos.

Los anticuerpos monoclonales son para la serología una revolución mucho más profunda que el método policlonal. Su principio es: los antígenos más a menudo, incluso los más simples, como los virus, tienen varios sitios antigénicos distintos y estimulan la proliferación inmune en varios clones animales de linfocitos B productores de anticuerpos, cada uno correspondiente a un patrón antigénico particular. Los inmunoensayos son una herramienta útil para detectar y controlar las enfermedades virales, y en particular las que infectan el ñame, y para las pruebas de rutina de las muestras de ñame para detectar la presencia de virus.

Los métodos de detección serológica se han convertido en un método de rutina para detectar virus de plantas en las últimas décadas y se ha demostrado que son métodos de diagnóstico efectivos en vectores de campo y virus (Souiri *et al.*, 2014). Se ha demostrado que dot-ELISA, ofrece el mismo resultado que la PCR y la secuenciación de nucleótidos para la detección del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en vectores de mosca blanca (Xie *et al.*, 2013).

Las pruebas serológicas más comunes para virus de plantas incluyen pruebas de precipitación y aglutinación, microscopía electrónica inmunoabsorbente, ELISA e inmunoensayo de transferencia de puntos. Los inmunoensayos utilizan la capacidad de los anticuerpos producidos en animales para unirse al virus de interés. Entre las herramientas serológicas, ELISA es a menudo el método de elección debido a su alta sensibilidad, simplicidad, reproducibilidad y versatilidad en la selección de una gran cantidad de muestras (Cho, 1990). Además, la detección indirecta de virus basada en ELISA es más sensible que el Dot Immunobinding Assay (DIA) y se sugiere que la

sensibilidad de DIA aumente junto con el aumento en la cantidad de extracto de muestra (Mervat y Fath, 2006).

El ELISA ha sido muy popular para la detección de virus en material vegetal, vectores de insectos, semillas y propágulos vegetativos desde que Clark y Adams (1977) introdujeron la virología de las plantas. Las pruebas serológicas que utilizan ELISA han aumentado la sensibilidad y la especificidad de detección debido a la potencia de los anticuerpos policlonales y monoclonales producidos en animales en respuesta a los patógenos.

El uso del antisuero producido contra el virus dirigido simplifica el estudio para comprender la relación serológica de los virus aislados (Makkouk y Kumari, 1998). ELISA funciona según el principio de que los antígenos (virus en el extracto de la muestra) o los anticuerpos se inmovilizan en la superficie del soporte de la fase sólida (membrana de nitrocelulosa de polystyrene o placa de microprocesador) y para eliminar los antígenos no unidos o los anticuerpos de la placa o membrana, dejando solo las sustancias específicas.

Las dos formas de ELISA (directa e indirecta) varían según la forma en que se detecta un complejo antígeno-anticuerpo, pero la teoría subyacente y los resultados finales son los mismos. En un procedimiento de ELISA directo, los anticuerpos unidos a la superficie de los pocillos de la placa de microtitulación capturan el virus en la muestra de prueba y luego el virus capturado se detecta y se incuba con un conjugado anticuerpo-enzima seguido de la adición de reactivos de desarrollo de color. Los anticuerpos que capturan y detectan pueden ser iguales o de diferentes fuentes. En el caso de ELISA indirecto, el anticuerpo en complejo con un antígeno se detecta con un anticuerpo conjugado con enzima.

### ***Técnicas basadas en ácidos nucleicos***

La técnica más común basada en ácidos nucleicos es el PCR. Se utilizó por primera vez para amplificar las secuencias genómicas de la globulina beta para el diagnóstico de la anemia de células falciformes (Saiki *et al.*, 1985). Desde entonces, se ha empleado ampliamente para la detección y diferenciación de patógenos de plantas (Lopez *et al.*, 2003). Es la consecuencia de la necesidad de una mayor sensibilidad y precisión de los métodos de detección.

La evaluación visual de las plantas para la enfermedad sospechosa generalmente da casi el mismo resultado con la prueba de PCR si se observa el síntoma típico de la enfermedad en la planta. Pero es digno de confirmar la evaluación visual mediante

pruebas basadas en ácido nucleico (PCR), si la enfermedad no se detecta visualmente (Njukeng *et al.*, 2014; Aihebhoria *et al.*, 2017).

El PCR es una técnica particularmente atractiva para el diagnóstico de virus de plantas porque puede amplificar el ácido nucleico objetivo a partir de una concentración extremadamente baja en una mezcla compleja de secuencias heterólogas (Henson y French, 2008).

La aparición del PCR en el diagnóstico de virus de plantas ha mejorado mucho la sensibilidad de la detección de virus (Choi *et al.*, 1999). También, es posible utilizar las buenas cualidades de ELISA y PCR en combinación para aprovechar y aprovechar las ventajas de las dos técnicas a la vez para la detección de patógenos presentes en la célula huésped a una concentración muy pequeña (Mumford y Seal, 1997).

Se ha establecido un ensayo de RT-PCR múltiplex de un solo tubo para la detección simultánea del YMV, YMMV, CMV y el DaBV (Maroya *et al.*, 2014).

### **2.3 Manejo de enfermedades virales**

El diagnóstico de los virus que producen las enfermedades en las plantas constituye el punto de partida para adoptar medidas adecuadas de manejo. El diagnóstico de forma rápida y precisa, evita el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos como plaguicidas, reduce los efectos negativos en el medio ambiente, permite la optimización de los recursos y a la vez origina información respecto a la interacción patógeno-hospedante. El conocimiento sobre transmisión y el ciclo de infección de los virus es importante para controlar su propagación. Los agricultores de los países en desarrollo a menudo carecen de tales conocimientos y creen que los pesticidas pueden controlar estas enfermedades (Schreinemachers *et al.*, 2015; Arana, 2016).

Los virus afectan severamente el crecimiento y producción de las plantas, los daños son mayores cuando las plantas son afectadas en los primeros estadios de desarrollo. Al no existir medidas de control curativo la lucha contra estos patógenos se basa en medidas preventivas y principalmente en evitar que entren en contacto con la planta (Rosales *et al.*, 2011). Según Kenyon *et al.* (2014), entre las principales medidas para el manejo de virus transmitidos de forma no persistente se encuentran: la utilización de semillas sanas, la protección de los semilleros con mallas, el monitoreo y control de los insectos vectores.

El control de los vectores se realiza mediante trampas de colores, la eliminación de las plantas infectadas, la introducción o incremento de las poblaciones de controles biológicos de los vectores. Otra medida es la utilización de barreras vivas no hospedantes del virus, la destrucción de los restos de cultivos previos, el trasplante a campos

separados de cultivos susceptibles. Cuando las poblaciones de los vectores estén reducidas y no estén migrando se recomienda el uso de cobertores plásticos, la eliminación de hospedantes alternativos de virus y vectores, así como el establecimiento de periodos libres de arvenses y cultivos susceptibles.

En el caso de los *Potyvirus*, se recomienda para el manejo del PVMV en el cultivo del pimiento, el uso de barreras vivas de maíz (*Zea mays* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), así como establecer un marco de plantación que permita la cobertura completa del campo sin afectar los rendimientos por la competencia entre plantas, porque bajo estas condiciones las poblaciones de áfidos tienden a disminuir (Alegbejo y Abo, 2002). Tecson-Mendoza *et al.* (2008), plantean que la transformación de plantas mediante el empleo del gen de la cp es el mejor método encontrado para la protección de las plantas de papaya frente a PRSV.

En Cuba, se obtuvieron resultados satisfactorios en el manejo de PRSV mediante la aplicación del inhibidor viral I-Cetas 07 (López *et al.*, 2009). Cabrera *et al.* (2013) demostraron que la adición de barreras de maíz intercaladas en plantaciones de papaya reduce las afectaciones producidas por el PRSV. En el país se desarrolla un programa de mejoramiento genético tradicional del cultivo del pimiento en el Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova” (IIHLD), donde se obtuvieron los seis primeros híbridos cubanos (RTx638, RTxLB, 638xRT, RTx625a, RTx625 y 638xNv) y dos cultivares (638 y RT), con resistencia a potyvirus que se proponen para incorporarse al sistema productivo del pimiento (Rodríguez *et al.*, 2014; Arana, 2016).

### **3. Materiales y Métodos**

#### **Ubicación de los ensayos y experimentos**

Las colectas de las plantas de *Dioscorea* spp. y las arvenses se llevaron a cabo en las áreas de producción del INIVIT, Santo Domingo, Cuba. El INIVIT está localizado a 22° 35' LN y 80° 13' LO, a 45,35 msnm, media anual de precipitación acumulada de 1 348 mm y temperatura de 24 °C. Esta área se seleccionó por ser uno de los institutos responsables de la producción de semilla básica de ñame en Cuba. El trabajo de investigación que requirió el ELISA, se desarrolló en el INIVIT. Mientras que los RT-PCR se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Las muestras que se utilizaron en la microscopía electrónica se analizaron en el Instituto de Patología Vegetal, del Centro de Investigaciones Agropecuarias, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IPAVE-CIAP-INTA), Argentina.

#### **3.1 Sintomatología en plantas de *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT**

##### **3.1.1 Caracterización de la sintomatología**

Con el objetivo de determinar la presencia de enfermedades virales pertenecientes al género de los potyvirus en el cultivo de ñame (*Dioscorea* spp.) se realizaron colectas de muestras de hojas. Estas colectas se realizaron en áreas donde se ubicaban cinco especies y dos subespecies de una de estas. Como criterios de selección de síntomas se tomaron las muestras foliares que difieren de lo descrito Pérez-Camacho y Raz (2017). Los muestreos se realizaron en las campañas 2014-2015, 2015-2016 y 2016-2017, a partir de los 60 días después de plantado el cultivo, con periodicidad mensual hasta la total decadencia de las plantas. Las muestras tomadas se clasificaron por tipo de síntoma y especie.

##### **3.1.2 Detección de potyvirus**

###### **ELISA**

Para el diagnóstico de potyvirus en las muestras tomadas se empleó un sistema de diagnóstico ELISA (Clark y Admas, 1977), con la variante ELISA-DASI (del inglés: ELISA *Double Antibody Sándwich Indirect*) utilizando reactivos anti-Poty (Agdia, EE.UU.), según recomendaciones del fabricante, con dos repeticiones por muestra. Se determinó la absorbancia a 405 nm en un lector automatizado de placas Biotek® ELx-800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EE.UU.). Como criterio de positividad se tomaron los valores de absorbancia superiores al duplo de la media de los controles negativos.

## Microscopía electrónica

Se utilizó la técnica *leaf-dip*, según el procedimiento descrito por Truol *et al.* (2009). Los *dip* se realizaron a partir de muestras previamente liofilizadas y contrastados con acetato de uranilo 2%, y citrato de plomo (Sigma, EE.UU.). Para examinar las preparaciones se utilizó el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL, Japón).

## RT-PCR

Para la detección molecular mediante RT-PCR, la purificación de ARN se realizó a partir de 100 mg de hojas de ñame positivas a potyvirus según ELISA y mantenidas a - 80 °C, con el RNeasy® *Plant Mini Kit* (Qiagen, Alemania), según recomendaciones del fabricante. La concentración de ARN total extraído se determinó a partir de la densidad óptica obtenida a 260/280 nm, en un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf, Alemania).

El ADNc se sintetizó a partir de 1,50 µg de ARN total, mediante el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EE.UU.). Seguidamente, se generaron fragmentos de ADNc, que se emplearon en las reacciones de PCR.

Para detectar el producto de la amplificación se verificaron 2 µL de cada reacción en una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1x (890 mM Tris-borato, 890 mM Ácido bórico y 20 mM EDTA). Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mastercycler® personal* (Eppendorf, Alemania). Los productos se tiñeron con *Midori Green Advanced DNA Stain* (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Alemania) y visualizados en luz ultravioleta (Sambrook y Rusell, 2001).

A partir de los ADNc obtenidos, la presencia del potyvirus se verificó mediante la amplificación del gen que codifica para la proteína de la cápside. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos genéricos a potyvirus N1b 2F/N1b 3R (Zheng *et al.*, 2010), que flanquean un fragmento de 350 pb del extremo del gen de la replicasa viral N1b.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL y para ello se usaron: 1 µL de ADNc, tampón comercial 1x, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleótido y 1,25 U de Top Taq™ ADN polimerasa (Qiagen, Alemania). Las condiciones para las reacciones de PCR incluyeron un ciclo inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, de hibridación a 58 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 1 min, y una extensión final de 10 min a 72 °C.

## **3.2 Diversidad molecular de potyvirus asociados al cultivo del ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT**

### **3.2.1 Amplificación del YMV y YMMV**

A partir de los ADNc obtenidos que resultaron positivos a la presencia de potyvirus se verificó la presencia del YMV y del YMMV, mediante la amplificación del gen que codifica para la proteína de la cápside. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos específicos YMV sentido: 5'-ATCCGGGATGTGGACAATGA-3' y YMV reverso: 5'-TGGTCCTCCGC CACATCAA-3') y YMMV sentido: 5'-GGCACACATGCAAATGAAAGC-3' y (YMMV Reverso: 5'-CACCAGTAGAGTGAACATAG-3'), que amplifican un fragmento de 250 pb y 500 pb, aproximadamente (Mumford y Seal, 1997).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL y para ello se usaron: 1 µL de ADNc, tampón comercial 1x, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleótido y 1,25 U de Top Taq™ ADN polimerasa (Qiagen, Alemania). Las condiciones para las reacciones de PCR para YMV incluyeron un ciclo inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación a 55 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min, con una extensión final de 10 min a 72 °C. En el caso del YMMV, un ciclo inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

### **3.2.2 Secuenciación y análisis filogenético de YMV y YMMV**

Los amplicones del tamaño esperado para potyvirus, se purificaron directamente mediante el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Alemania), aunque en algunas ocasiones cuando no era posible eliminar la presencia de bandas inespecíficas, se realizó la purificación de los fragmentos a partir de su corte en los geles mediante el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Alemania). Posteriormente, los productos purificados se secuenciaron utilizando los mismos cebadores del RT-PCR en un secuenciador ABI Prism 3.730 xl (PE Applied Biosystems, EE.UU.) de la compañía Macrogen (Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas con cada cebador se editaron mediante el *software BioEdit* 6.0.6 y *Chromas* 1.45, construyéndose secuencias consenso y confirmándose su identidad con genes virales por comparación con las bases de datos moleculares (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide.cgi>). Para complementar estas comparaciones se utilizó el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). En adición, todas las secuencias de YMV y YMMV disponibles en la base de datos del GenBank se

seleccionaron para análisis posteriores. Estas secuencias y las obtenidas en este trabajo se alinearon mediante MUSCLE (Edgar, 2004), mediante el software SeaView software v. 4.4.2 (Gouy *et al.*, 2009). El modelo de sustitución se estimó mediante el software jModelTest v. 2.1.9 (Darriba *et al.*, 2012). Los árboles filogenéticos se obtuvieron usando inferencia Bayesian en Mr. Bayes 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012).

### **3.3 Hospedantes alternativos de potyvirus asociados a *Dioscorea* spp.**

#### **3.3.1 Colecta y clasificación**

Se colectaron todas las especies de arvenses con o sin síntomas de virus en las áreas de producción de semilla del INIVIT, así como en los alrededores. Se delimitó un transepto en forma de X en el cultivo de ñame, colectando en 10 puntos sobre las diagonales del campo y en los cinco puntos de la X (Asala *et al.*, 2014). El material colectado se clasificó según Greuter y Rankin-Rodríguez (2016), y con la ayuda de un especialista del Centro de Estudios del Jardín Botánico de Villa Clara.

#### **3.3.2 Detección de potyvirus**

La presencia de potyvirus en las arvenses se diagnosticó de forma similar que las muestras de hojas de ñame tomadas, según el protocolo mediante ELISA propuesto en el epígrafe 3.1.2. De igual forma, como criterio de positividad se tomaron los valores de absorbancia superiores al duplo de la media de los controles negativos.

## 4. Resultados

### 4.1 Sintomatología en plantas de *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT

#### 4.1.1 Caracterización de la sintomatología

Se colectaron 200 muestras foliares, de estas 90 pertenecen a *D. alata*, 50 a *D. cayennensis* subsp. *rotundata*, 25 de *D. cayennensis* subsp. *cayennensis*, 20 corresponden a *D. esculenta*, 10 de *D. bulbifera* y cinco de *D. trifida*). Las colectas se clasificaron en siete síntomas diferentes: mosaico severo extendido sobre la hoja (MS), enrollamiento y clorosis de las hojas (EC), bandeado amarillo internerval (BA), mosaico ligero (ML), islas verdes a relieve (IV), clorosis extendida (CE) y deformación foliar (DF) (Fig. 2).

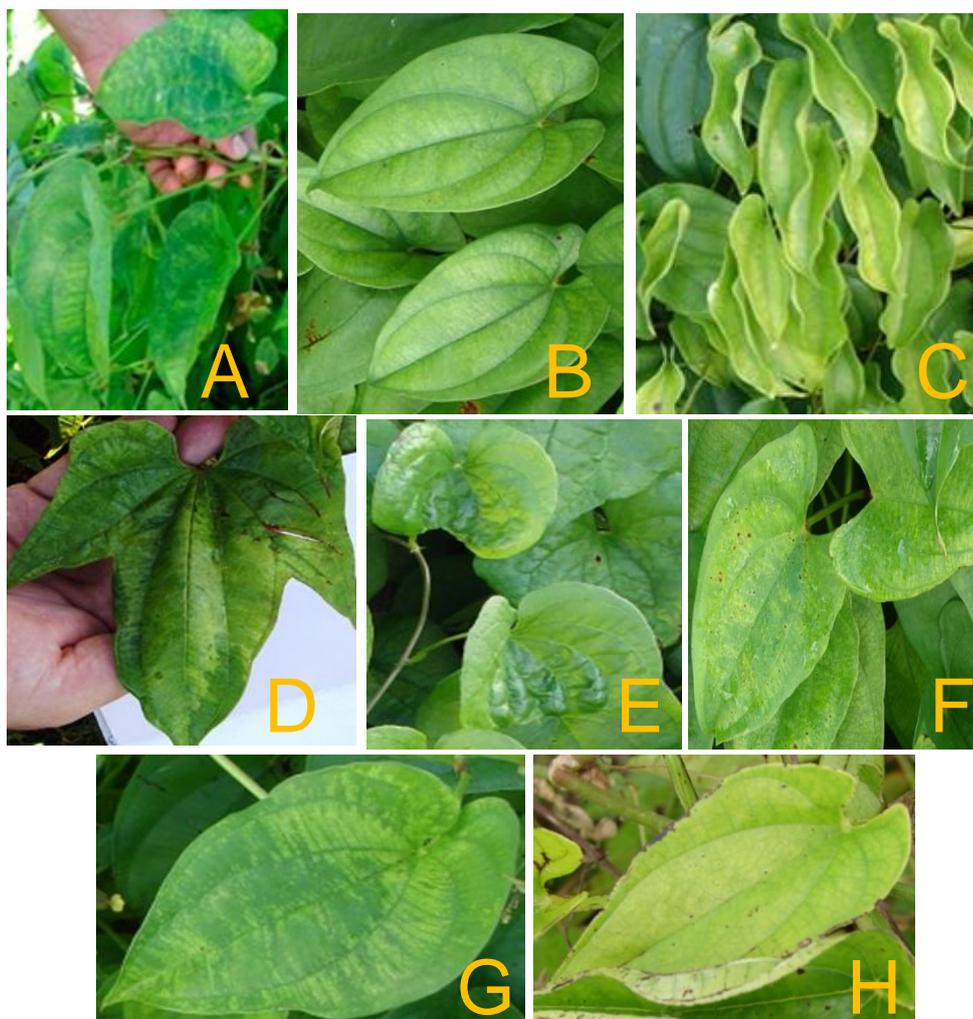
Se formaron un total de 25 grupos síntoma-especie. En todas las especies presentes se encontraron al menos tres de los síntomas descritos, aunque en ningún caso se estableció alguna secuencia de aparición entre ellos. No se encontró la presencia simultánea de dos síntomas en una misma planta, pero esto fue posible en una misma parcela (16 plantas del mismo cultivar) en las que se divide el banco de germoplasma de INIVIT. La **tabla III** muestra el total de muestras clasificadas en cada grupo descrito.

**Tabla III.** Número de muestras colectadas por especie.

	Total de muestras	MS	EC	BA	ML	IV	CE	DF
<i>D. alata</i>	90			28	25	2	6	9
<i>D. cayennensis</i> subsp. <i>rotundata</i>	50	7	19		6		6	2
<i>D. cayennensis</i> subsp. <i>cayennensis</i>	25	1		2	1		12	9
<i>D. esculenta</i>	20					8	7	5
<i>D. bulbifera</i>	10			1	1		6	2
<i>D. trifida</i>	5	3			1		1	

Para diferenciar síntomas similares en especies o subespecies diferentes se empleó la inicial minúscula de la especie (o subespecie). Esto es, BA-a y BA-c identifican al bandeado amarillo en *D. alata* (Fig. 2A) y *D. cayennensis* subsp. *cayennensis* respectivamente (Fig. 2G) respectivamente; ML-a y MS-t para el mosaico ligero en *D. alata* (Fig. 2B) y mosaico severo en *D. trifida* (Fig. 2D). El síntoma de enrollamiento y clorosis de las hojas (Fig. 2C) se manifestó a lo largo de secciones de las guías de la planta en *Dioscorea cayennensis* subsp. *rotundata*, mientras que el mosaico severo en

*Dioscorea trifida* apareció en la totalidad de las hojas. Los síntomas restantes aparecieron en pequeños grupos de hojas e indistintamente en las cinco especies y dos subespecies cultivadas en el INIVIT (**Fig. 2E, F y H**).



**Figura 2.** Síntomas más comunes colectados por especie de ñame en el INIVIT. A. Bandeado amarillo en *D. alata* (BA-a), B. Mosaico ligero en *D. alata* (ML-a), C. Enrollamiento y clorosis en *D. cayennensis* subsp. *rotundata* (EC-r), D. Mosaico severo en *D. trifida* (MS-t), E. Islas verdes en *D. esculenta* (IV-e), F. Mosaico ligero en *D. cayennensis* subsp. *cayennensis* (ML-c), G. Bandeado amarillo en *D. cayennensis* subsp. *cayennensis* (BA-c) y H. Clorosis extendida en *D. bulbifera* (CE-b).

En algunas de las especies predominó la aparición de un síntoma. El mosaico severo extendido sobre la hoja caracterizó el 60% de las muestras en *D. trifida*. Este síntoma solo se registró en dos especies, *D. trifida* y *D. cayenesis* (*D. cayennensis* subsp. *rotundata* y *D. cayennensis* subsp. *cayennensis*).

Por otra parte, la clorosis extendida apareció en el 60% de las muestras tomadas en *D. bulbifera*. En las demás especies la formación de grupos fue más homogéneo apareciendo hasta cinco síntomas. En *D. esculenta* el síntoma de islas verdes a relieve sobre las hojas resultó el de mayor frecuencia de aparición. Fuera de esta especie solo se encontró en muestras de *D. alata*.

El síntoma de enrollamiento y clorosis en las hojas solo apareció en *D. cayennensis* subsp. *rotundata* donde resultó el de mayor frecuencia de aparición con un 38%; este síntoma solo estuvo asociado a esta especie. La clorosis extendida y el mosaico ligero son los síntomas de mayor frecuencia de aparición en todo el estudio (38 y 34 veces, respectivamente). La incidencia de ambos fue mayor en *D. alata*, aunque en esta especie se manifestó en mayor proporción el bandeo amarillo internerval (31,1%).

La revisión seriada de las plantas sintomáticas permitió establecer diferentes patrones para algunos de los grupos especie-síntoma establecidos. En los casos de BA-a, ML-a y MS-r se observó que estos síntomas en las plantas podían extenderse a un pequeño grupo de hojas cercanas. En algunos casos estos desaparecían sin llegar a ocupar las guías, las hojas más jóvenes de las guías generalmente no presentaban síntomas similares.

En el caso de EC-r (**Fig. 3A**) nunca se observó su desaparición, ocupando secciones completas de las plantas. Debido al crecimiento de las guías, en las secciones más jóvenes de estas se podían encontrar hojas asintomáticas. El grupo MS-t resultó ser el más agresivo de todos. Posterior a su aparición, se observó su desarrollo hasta ocupar casi la totalidad del área foliar y de la planta (**Fig. 3B y C**).



**Figura 3.** Evolución de los síntomas. A, EC-r a lo largo de secciones de las guías. B, MS-t ocupando todo el limbo foliar y C, ocupando toda la guía.

#### 4.1.2 Detección de potyvirus

##### ELISA

De los 25 grupos síntoma-especie 14 resultaron positivos a potyvirus según la prueba ELISA (**Tabla IV**). En todos los ensayos realizados el límite de corte se determinó entre 0,2 y 0,22 VA. En todas las especies estudiadas se pudo encontrar reacciones positivas, sin embargo en esto no fue posible para dos tipos de síntomas (CE y DF). En las muestras positivas se alcanzaron resultados por encima de estos valores hasta 1,2 VA.

**Tabla IV.** Detección de potyvirus mediante ELISA en muestras de ñame.

	MS	EC	BA	ML	IV	CE	DF
<i>D. alata</i>			(++)	(++)	(+)	(-)	(-)
<i>D. cayennensis subsp. rotundata</i>	(+)	(++)		(+)		(-)	(-)
<i>D. cayennensis subsp. cayennensis</i>	(+)		(+)	(+)		(-)	(-)
<i>D. esculenta</i>					(+)	(-)	(-)
<i>D. bulbifera</i>			(+)	(+)		(-)	(-)
<i>D. trifida</i>	(+++)			(+)		(-)	

(-) VA menor al límite de corte. (+) VA mayor al límite de corte. (++) VA dos veces mayor al límite de corte. (+++) VA cuatro veces mayor al límite de corte.

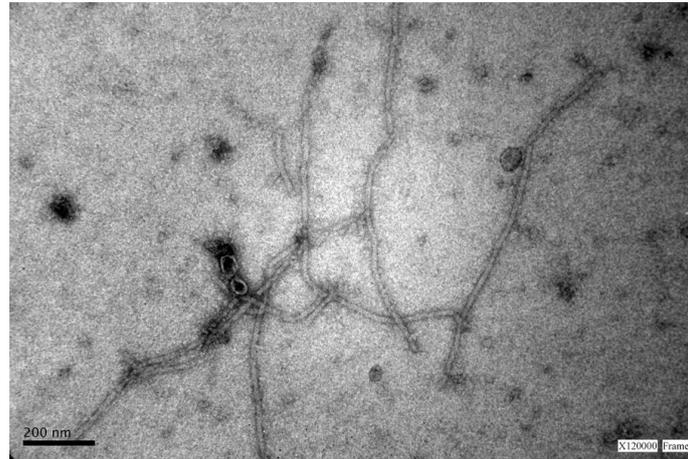
Los resultados de las lecturas de valores de absorbancia permiten establecer reacciones cualitativamente diferentes entre los grupos síntoma-especie estudiados. En los casos de BA-a, ML-a y EC-r oscilaron entre 0,42 y 0,6, mientras que para MS-t resultaron superiores a 0,85 hasta 1,2, o sea, entre dos, tres veces o más de cuatro veces el valor del límite de corte, respectivamente. Todos los restantes VA positivos resultaron superiores. La concentración de partículas virales es, aproximadamente, el doble en el caso de MS-t con respecto a BA-a, ML-a y EC-r y el cuádruplo, con respecto a los demás grupos Poty-positivos.

Los resultados de los análisis ELISA realizados a las muestras sintomáticas nos permiten concluir que *D. trifida* resulta la especie más susceptible ante las enfermedades virales presentes, mientras que *D. alata* y *D. cayennensis subsp. rotundata* presentan una relación intermedia entre tolerancia y susceptibilidad con los mismos.

##### Microscopía electrónica

En todas las muestras analizadas se encontraron partículas flexuosas de entre 650 y 950 nm que coinciden con las descritas para el género *Potyvirus* (**Fig. 4**). En ningún caso

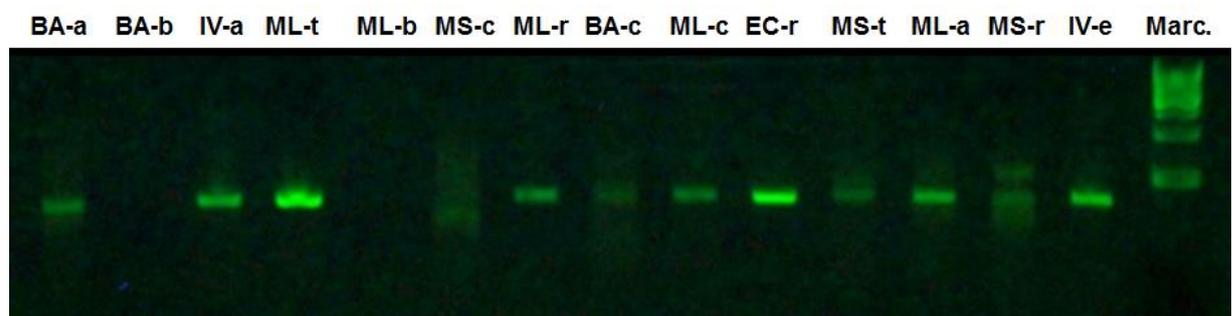
pudo encontrarse partículas de morfología y tamaño asociados a alguno de los otros grupos virales descritos en *Dioscorea* spp. fuera de la familia *Potyviridae*. Indistintamente, se encontraron algunas partículas de igual morfología, pero de menor tamaño, entre 450 y 650 nm.



**Figura 4.** Micrografía electrónica de partículas virales perteneciente a la muestra 3-3ª que corresponde con la especie *D. alata*.

#### RT-PCR

En la reacción de RT-PCR se obtuvo la amplificación de la banda de la talla esperada (350 pb) en 12 de los 14 grupos síntoma-especie evaluados (**Fig. 5**). El fragmento obtenido confirmó la presencia de potyvirus asociados a los grupos síntoma-especie analizados. En las corridas de los productos de amplificación de las muestras pertenecientes a los grupos BA-b y ML-b no se logró obtener las bandas esperadas.

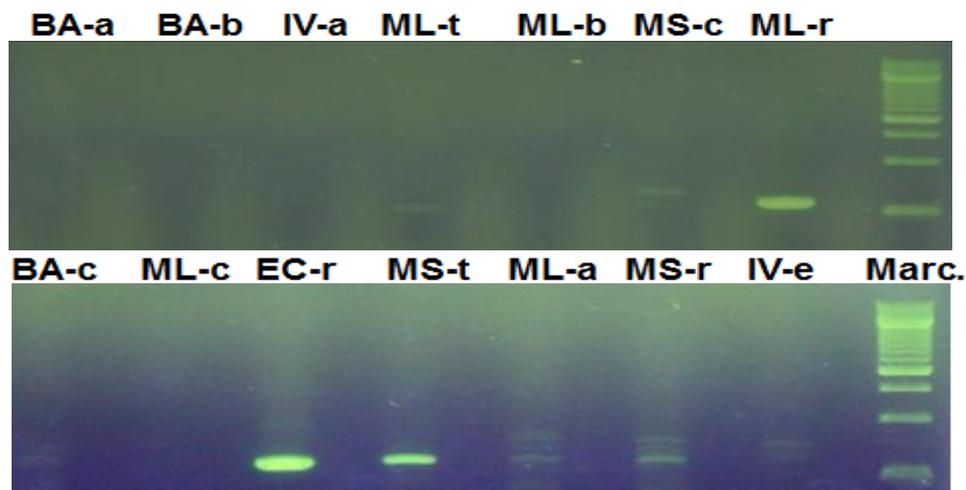


**Figura 5.** Análisis electroforético en gel de agarosa 2%, de los productos de RT-PCR, para detectar la presencia de potyvirus. Marc. Marcador de peso molecular 1kb (GIBCO).

## 4.2 Diversidad molecular de potyvirus asociados al cultivo del ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT

### 4.2.1 Amplificación del YMV y YMMV

En la RT-PCR para la detección del YMV se obtuvo la amplificación de la banda de la talla esperada (586 pb) en seis de los 14 grupos síntoma-especie evaluados (**Fig. 6**).



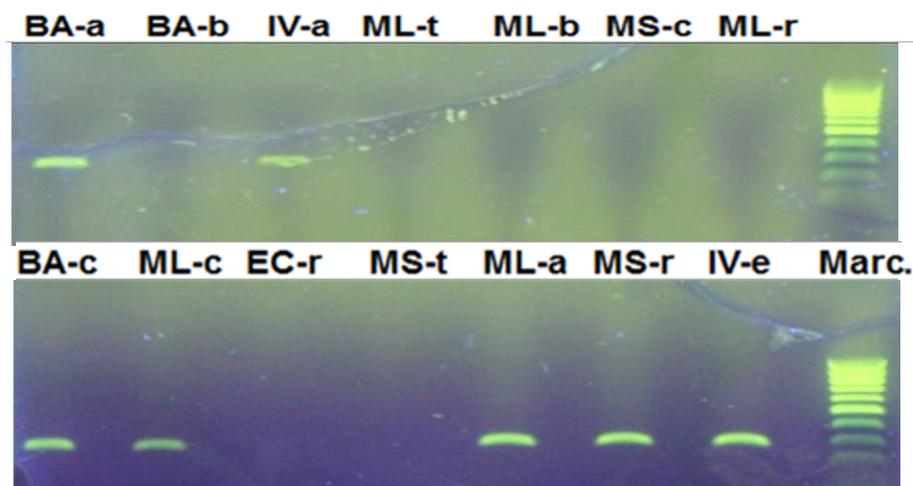
**Figura 6.** Análisis electroforético en gel de agarosa 2%, de los productos de RT-PCR, para detectar la presencia de YMV. Marc. Marcador de peso molecular 1kb (GIBCO).

El fragmento obtenido confirmó la presencia de YMV en los mismos. Se pudo determinar la presencia de YMV en ML-t, ML-r, EC-r, MS-t, ML-a, MS-r, lo cual comprende tres de las especies conservadas en el banco de germoplasma de ñame del INIVIT, excepto *D. esculenta* y *D. bulbifera*.

En la RT-PCR para la detección del YMMV se obtuvo la amplificación de la banda de la talla esperada (289 pb) en siete de los 14 grupos síntoma-especie evaluados (**Fig. 7**).

El fragmento obtenido confirmó la presencia de YMMV en los grupos síntoma-especie analizados. Se pudo determinar la presencia de YMMV en BA-a, IV-a, BA-c, ML-c, ML-a, MS-r y IV-e lo cual comprende tres de las especies conservadas en el INIVIT. No se detectó su presencia en *D. bulbifera* y *D. trifida*.

Todas las muestras que resultaron positivas a YMV o YMMV según RT-PCR habían sido igualmente clasificadas según el ensayo ELISA-DASI, lo cual indica la posibilidad de su empleo como punto de partida en el establecimiento de programas de certificación de semilla libre de YMV o YMMV en cultivares comerciales de *D. alata* o *D. cayennensis* subsp. *rotundata*.



**Figura 7.** Análisis electroforético en gel de agarosa 2%, de los productos de RT-PCR, para detectar la presencia de YMMV. Marc. Marcador de peso molecular 1kb (GIBCO).

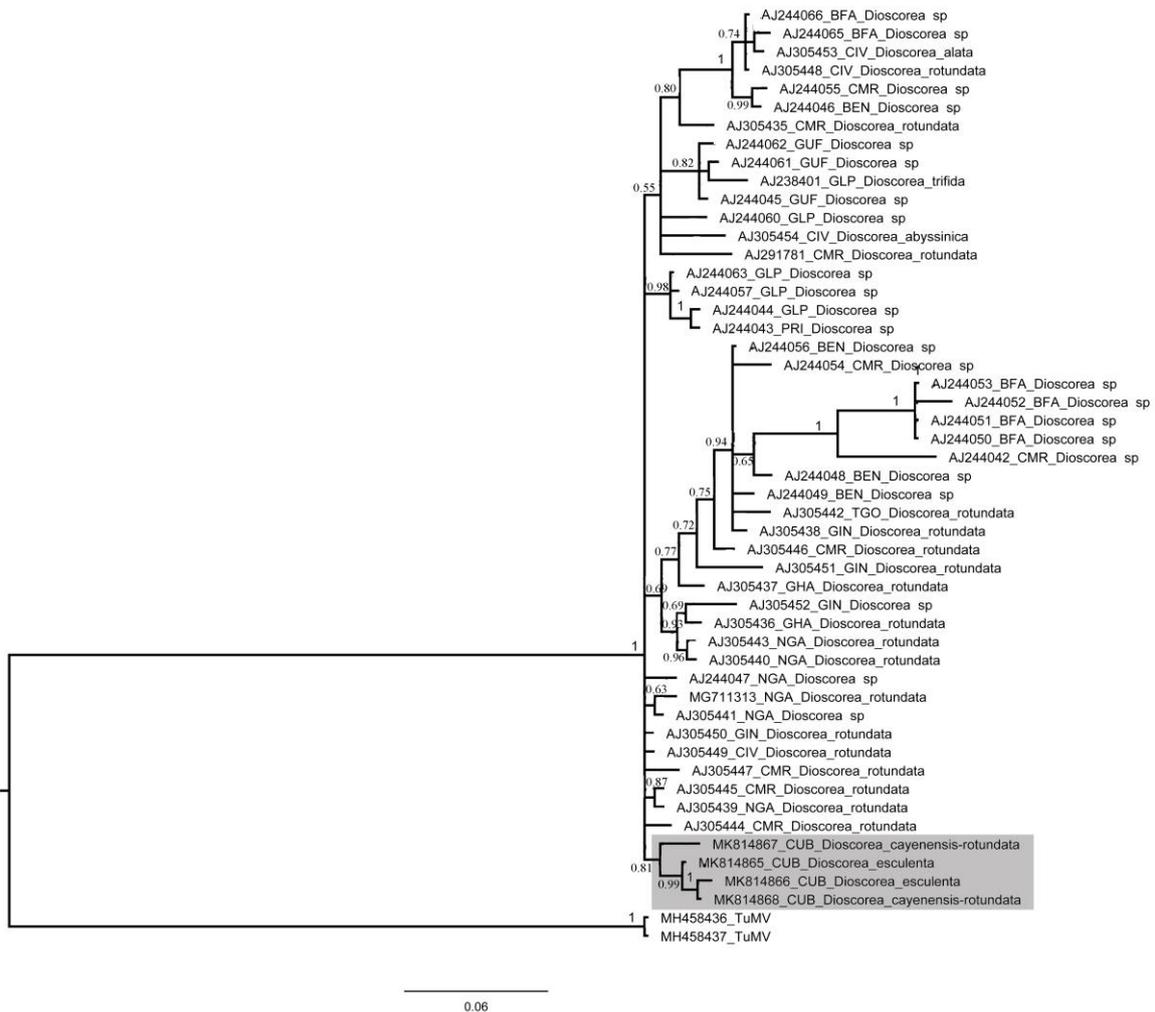
En tres años de evaluaciones resultó imposible la detección del YMV o del YMMV en muestras de *D. bulbifera*. Dos de los grupos síntomas-especies evaluados (ML-a, MS-r) resultaron positivos a ambos virus indicando la presencia de infecciones mixtas de YMV y YMMV.

#### 4.2.2 Secuenciación y análisis filogenético de YMV y YMMV

Las 13 muestras positivas mediante RT-PCR al YMV y YMMV se secuenciaron y como resultado se identificaron cuatro aislados de YMV (MK814865-MK814868) y siete de YMMV (MK780003-MK780009). El análisis Bayesiano de estas secuencias y todas las correspondientes a estos virus en la base de datos Genbank mostró varias ramas.

En el caso del YMV, el árbol filigenético (**Fig. 8**) ilustra que los aislados cubanos se encuentran formando una rama totalmente diferente, aunque presentan similitudes con aislados de Camerúm y Nigeria.

En el caso del YMMV, el árbol filigenético (**Fig. 9**) muestra que los aislados cubanos están formando varias ramas. El aislado MK780004 presenta similitud con aislado de Guadalupe y Vanuatu. La similitud de MK780006 y MK780008 es con aislados de Brasil, Guayana Francesa, Martinica y Guadalupe. Además, existen otros cuatro aislados (MK 780009, MK780003, MK780005 y MK780007) que se encuentran agrupados y separados del resto de los aislados cubanos, con cierta similitud con una aislado de Costa de Marfil.



**Figura 8.** Árbol filogenético consenso obtenido a partir de un análisis Bayesiano de la secuencia parcial de la proteína de cápside de aislados cubanos del YMV y otros presentes en la base de datos del Genbank. La longitud de los brazos y su significación se indican en los nodos para una provabilidad posterior mayor de 0,5. Para cada aislado, se indica el número de acceso en Genbank, origen geográfico y la especie donde se aisló. El *Turnip mosaic virus* (TMV) se usó como secuencia fuera de grupo para la comparación.

Como se puede apreciar en la **figura 9**, existe una mayor diversidad entre los aislados del YMMV que lo que se aprecia para el YMV (**Fig. 8**). Los aislados cubanos del YMMV se encuentran bien dispersos en el árbol filogenético, pero siempre cercanos a aislados de África y de las Islas del Caribe, no siendo así con los aislados de Asia.



**Figura 9.** Árbol filogenético consenso obtenido a partir de un análisis Bayesiano de la secuencia parcial de la proteína de cápside de aislados cubanos del YMMV y otros presentes en la base de datos del Genbank. La longitud de los brazos y su significación se indican en los nodos para una provabilidad posterior mayor de 0,5. Para cada aislado, se indica el número de acceso en Genbank, origen geográfico y la especie donde se aisló. El *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) se usó como secuencia fuera de grupo para la comparación.

### 4.3 Hospedantes alternativos de potyvirus asociados a *Dioscorea* spp.

#### 4.3.1 Colecta y clasificación

Existe una diversidad de 26 especies de arvenses que forman parte de la flora acompañante del ñame en las áreas de producción de semilla del INIVIT, así como en los alrededores (**Tabla V**). Estas especies pertenecen a 26 géneros y 15 familias. La familia más representada fue *Poaceae* con siete representantes. El resto de las familias solo

está representado por una especie con excepción de *Asteraceae* y *Euphorbiaceae* que tienen cuatro y tres representantes, respectivamente.

**Tabla V.** Especies de arvenses que forman parte de la flora acompañante del ñame en las áreas de producción de semilla del INIVIT.

Especie	Familia	Nombre común
<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Escoba amarga
<i>Sonchus oleraceus</i> L.		Cerraja
<i>Ageratum conyzoides</i> L.		Celestina azul
<i>Lagascea mollis</i> Cav.		Romerillo cimarrón
<i>Lepidium virginicum</i> L.	<i>Brassicaceae</i>	Mastuerzo
<i>Cyperus rotundus</i> L.	<i>Cyperaceae</i>	Cebolleta
<i>Commelina erecta</i> L.	<i>Commelinaceae</i>	Canutillo
<i>Ipomoea trifida</i> (Kunth) G. Don	<i>Convolvulaceae</i>	Marrullero
<i>Cucumis dipsaceus</i> Ehrenb. ex Spach	<i>Cucurbitaceae</i>	Pepino cimarrón
<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	<i>Euphorbiaceae</i>	Hierba lechosa
<i>Chamaesyce hyssopifolia</i> (L.) Small		Hierba lechera
<i>Acalypha alopecuroides</i> Jacq.		Rabo de gato
<i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willd.	<i>Fabaceae</i>	Adormidera
<i>Malvastrum coromandelianum</i> (L.) Garcke	<i>Malvaceae</i>	Malva negra
<i>Boerhavia erecta</i> L.	<i>Nyctaginaceae</i>	Tostón
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	<i>Poaceae</i>	Don Carlos
<i>Dactyloctenium aegyptium</i> (L.) Willd.		Pata de gallina
<i>Sporobolus tenuissimus</i> (Schrank) Kuntze		Espartillo
<i>Urochloa reptans</i> (L.) Stapf		Gramma de Castilla
<i>Echinochloa colona</i> (L.) Link		Mete bravo
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.		Pata de gallina
<i>Leptochloa panicea</i> (Retz.) Ohwi		Plumilla
<i>Portulaca oleracea</i> L.	<i>Portulacaceae</i>	Verdolaga
<i>Spermacoce tetraquetra</i> A. Rich.	<i>Rubiaceae</i>	
<i>Corchorus siliquosus</i> L.	<i>Sparmanniaceae</i>	Malva té
<i>Kallstroemia maxima</i> (L.) Hook. & Arn.	<i>Zygophyllaceae</i>	Abrojo

#### 4.3.2 Detección de potyvirus

De las 26 especies, 10 resultaron positivas a la presencia de potyvirus según la prueba ELISA (**Tabla VI**). En todos los ensayos realizados el límite de corte se determinó entre

0,2 y 0,25 VA. En ocho familias se encontraron reacciones positivas, sin embargo esto no fue posible para los siete restantes (*Brassicaceae*, *Commelinaceae*, *Convolvulaceae*, *Fabaceae*, *Nyctaginaceae*, *Poaceae* y *Rubiaceae*). En las muestras positivas se alcanzaron resultados por encima del límite de corte, con valores hasta 0,90 VA.

**Tabla VI.** Detección de potyvirus mediante ELISA en arvenses.

Familia	Especie	V.A.
<i>Asteraceae</i>	<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	0,1
	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	<b>0,26</b>
	<i>Ageratum conyzoides</i> L.	0,17
	<i>Lagascea mollis</i> Cav.	<b>0,31</b>
<i>Brassicaceae</i>	<i>Lepidium virginicum</i> L.	0,12
<i>Cyperaceae</i>	<i>Cyperus rotundus</i> L.	<b>0,90</b>
<i>Commelinaceae</i>	<i>Commelina erecta</i> L.	0,1
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Ipomoea trifida</i> (Kunth) G. Don	0,16
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis dipsaceus</i> Ehrenb. ex Spach	<b>0,30</b>
	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbia heterophylla</i> L.
	<i>Chamaesyce hyssopifolia</i> (L.) Small	0,12
	<i>Acalypha alopecuroides</i> Jacq.	<b>0,27</b>
	<i>Fabaceae</i>	<i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willd.
<i>Malvaceae</i>	<i>Malvastrum coromandelianum</i> (L.) Garcke	<b>0,26</b>
<i>Nyctaginaceae</i>	<i>Boerhavia erecta</i> L.	0,11
<i>Poaceae</i>	<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	0,11
	<i>Dactyloctenium aegyptium</i> (L.) Willd.	0,09
	<i>Sporobolus tenuissimus</i> (Schrank) Kuntze	0,08
	<i>Urochloa reptans</i> (L.) Stapf	0,08
	<i>Echinochloa colona</i> (L.) Link	0,11
	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	0,12
	<i>Leptochloa panicea</i> (Retz.) Ohwi	0,06
	<i>Portulacaceae</i>	<i>Portulaca oleracea</i> L.
<i>Rubiaceae</i>	<i>Spermacoce tetraquetra</i> A. Rich.	0,16
<i>Sparmanniaceae</i>	<i>Corchorus siliquosus</i> L.	<b>0,29</b>
<i>Zygophyllaceae</i>	<i>Kallstroemia maxima</i> (L.) Hook. & Arn.	<b>0,31</b>

Los resultados de las lecturas de valores de absorbancia permiten establecer reacciones cualitativamente diferentes en cuanto a la posible presencia de virus entre las arvenses. La lectura de absorbancia en el caso de *C. rotundus* resultó de 0,90, siendo tres veces o

más al valor del límite de corte (0,25). Los restantes valores de absorbancia en las muestras positivas oscilaron entre 0,26 y 0,31, aproximadamente.

Los resultados de los análisis ELISA realizados a las arvenses nos permiten concluir que *Asteraceae* y *Cyperaceae* resultan las familias más susceptibles ante las enfermedades virales presentes, mientras que el resto de las familias presentan una relación intermedia entre tolerancia y susceptibilidad con los mismos. A pesar de que la familia *Poaceae* fue la de mayor representación entre las plantas recolectadas, ninguna especie resultó positiva a la presencia de potyvirus.

## 5. Discusión

### 5.1 Sintomatología en plantas de *Dioscorea* spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT

#### 5.1.1 Caracterización de la sintomatología

La amplia variabilidad genética **constantada** por la diversidad de especies de *Dioscorea* evaluada, así como el número diverso de virus presentes pueden provocar la gran diversidad de síntomas encontrados en las plantas de ñame. Eni (2008) describió hasta 10 síntomas diferentes cuando evaluó cuatro especies de ñame en Benin, Togo y Ghana. Toualy *et al.* (2014) describieron ocho síntomas diferentes en zonas productoras de ñame en Costa de Marfil.

Filho *et al.* (2013) al evaluar síntomas foliares de cultivares de *D. trifida* en el nordeste de Brasil encontraron más del 90% de incidencia de mosaicos fuertes. Este resultado es similar al obtenido en dicha especie (el mosaico severo extendido sobre la hoja caracterizó el 60%) en nuestro trabajo. En una evaluación de la incidencia de enfermedades virales en *D. esculenta* en la provincia de Kerala, India, se describió la aparición de este síntoma en más del 40% de las plantas evaluadas (Sudheerm, 2015). Lo que sugiere sensibilidad de esta especie ante estas enfermedades virales.

Eni *et al.* (2008) solo encontraron el síntoma de enrollamiento y clorosis asociado *D. rotundata* al evaluar 628 muestras foliares en granjas de campesinos en Ghana, el cual tampoco apareció en otras especies como *D. alata* y *D. cayensis* en áreas de producción de Benin. Fatogoma *et al.* (2014) también informaron este síntoma como el de mayor incidencia en cultivares del complejo *D. cayenensis-rotundata* en plantaciones de la provincia de Bringakro, Costa de Marfil.

Varios estudios anteriores han señalado al mosaico ligero como el síntoma de mayor frecuencia asociado a enfermedades virales en ñame (Eni, 2008; Toualy *et al.*, 2014). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo, aunque no señalan el síntoma de clorosis extendida como un síntoma asociado a enfermedades virales en el ñame.

***D. alata* y *D. cayenensis* subsp. *rotundata* son las especies de mayor variabilidad genética en el banco de germoplasma del INIVIT (MINAG, 2018). En este sentido, el hecho de que se encontraran algunos síntomas que no se extendían por las guías sugiere una mayor variabilidad en la interacción virus-hospedante. Los diferentes mecanismos de defensa de las planta, así como factores ambientales pudieran estar**

relacionados con esta respuesta diferencial (Ramage y Cherry, 2015; Li *et al.*, 2018; Paudel y Sanfaçon, 2018).

Diversos estudios apuntan a que el mecanismo de PTGS (del inglés: *Posttranscriptional gene silencing*) es una de las herramientas con que las plantas logran disminuir la magnitud de los síntomas producidos por infecciones virales sistémicas estableciendo así una relación de tolerancia (Ghoshal y Sanfaçon, 2015; Tu *et al.*, 2015; Moon y Park, 2016). Otro factor que puede influir en la remisión de los síntomas es la temperatura ambiental (Paudel y Sanfaçon, 2018). Del Toro *et al.* (2015) informaron que, para virus de ARN, a temperaturas por encima de 30 °C pueden disminuir o desaparecer totalmente los síntomas en hospedantes susceptibles-tolerantes. Debido al período de cultivo del ñame (marzo-diciembre), la mayor parte de nuestras observaciones se realizan en cuando la temperatura máxima del día sobrepasa ese valor.

En el caso de EC-r el factor ambiental parece ser menos determinante. Resultados similares a los obtenidos en el grupo MS-t se informaron por Mambole *et al.* (2014) y Seal *et al.* (2014) al describir la aparición de mosaicos muy severos y extendidos a toda la planta inducidos por potyvirus en *D. trifida* en el arco de las Antillas.

La manifestación de síntomas es el resultado de la interacción de, al menos, tres factores e.g. los virus (Sorel *et al.*, 2014; Valli *et al.*, 2017), el hospedante (Villordon y Clark, 2014; Weber y Bujarski, 2015) y las condiciones ambientales (Del Toro *et al.*, 2015) y pueden manifestarse o no (Roossinck, 2015; Garcia-Ruiz, 2018) sin que se establezca una relación directa entre estos y las enfermedades en cuestión. Es por esto que no debe considerarse como un elemento definitivo para el diagnóstico de enfermedades virales en el cultivo. Sin embargo, si puede considerarse como criterio de selección negativa en áreas destinadas a la producción de semilla para la eliminación de plantas que presenten síntomas asociados a enfermedades virales.

La selección de plantas libres de virus constituye un pilar fundamental para cualquier esquema de producción de semilla, aunque las metodologías de diagnóstico empleadas al efecto influyan en la calidad de los resultados finales. La selección de plantas asintomáticas puede ser una práctica elemental para la obtención de la semilla del próximo ciclo, esta es una práctica muy utilizada por campesinos en Nigeria (Nahanga y Becvarova, 2014) y en Gabón (Ondo-Ovono *et al.*, 2016). Otros estudios coinciden en señalar la necesidad de, al menos, utilizar esta como punto de partida en los esquemas de producción de semilla (Aighewi *et al.*, 2015; Asala y Ebukiba, 2016; Aiheborhia *et al.*, 2017). A falta de otros métodos para la obtención de material de propagación libre virus, los productores pueden establecer un sistema de “certificación” mediante observaciones

periódicas de la sintomatología presente en sus plantaciones marcando las plantas donde no se observen síntomas durante todo el ciclo (selección positiva), a partir de las cuales obtener el material de plantación para la próxima temporada. En las especies de ñame de mayor importancia económica cultivadas en Cuba, esto podría combinarse con métodos que permitan aumentar el índice de multiplicación.

### 5.1.2 Detección de potyvirus

La existencia de 11 grupos síntoma-especie negativos a potyvirus según ELISA puede estar motivada por la presencia de enfermedades virales pertenecientes a otros géneros virales informados en *Dioscorea* spp. o a factores abióticos que afecten el metabolismo de las plantas (Newton *et al.*, 2012). En estudios realizados en el sudeste del Pacífico (Sukal, 2018), África subsahariana (Eni, 2008), se ha señalado al CMV o a varios badnavirus como los causantes de sintomatologías similares a las descritas en este trabajo, por lo cual, se hace necesario comenzar estudios dirigidos a la detección de otras enfermedades virales dentro de las especies de ñame cultivadas en Cuba.

Estudios realizados sobre la incidencia de potyvirus en el ñame en sudeste del Pacífico (Lebas, 2002), África subsahariana (Eni, 2008; Eni *et al.*, 2013), India (Sudheerm, 2015) y en Sudamérica (Filho, 2013) no informan la clorosis y la deformación foliar asociada a potyvirus en ñame, lo que coincide con los resultados obtenidos. Sin embargo, Payares *et al.* (2014) si lo señalan asociado a la incidencia de virus de este género en el departamento de Sucre, Colombia.

Según la ley de Lambert Beer para valores de absorvancia entre 0,1 y 1 es posible establecer una correlación lineal entre estos y la concentración de la sustancia blanco (Abu-Reid y Mohamed-Tageldin, 2017; Casasanta y Garra, 2018), por lo que se inferió que la concentración de partículas virales es el doble y el cuádruplo en algunos casos (MS-t).

La concentración de proteína viral dentro de la célula del hospedante es el resultado de la interacción del o los virus con los mecanismos de defensa de las plantas, específicamente de los mecanismos de silenciamiento de ARN (Olspert *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2017) y puede ser considerada como una medida de la tolerancia (Hafrén *et al.*, 2015; Ramage y Cherry, 2015; Roossinck, 2015) o susceptibilidad del hospedante (Valli *et al.*, 2014; Tu *et al.*, 2015; Nagy, 2016). Esto puede ser la causa de la susceptibilidad de *D. trifida* o tolerancia en el caso de que *D. alata* y *D. cayenensis* subsp. *rotundata*.

Aunque las partículas virales encontradas en este estudio (tamaño entre 450 y 650 nm) son características de los potyvirus, partículas similares se obtuvieron por Mandal *et al.* (2012), en muestras de cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.), asociadas a macluravirus o pertenecientes al *Chinese yam necrotic mosaic virus* (CYNMV) en *D. opposita* en Corea del Sur (Kwon *et al.*, 2016). Esto puede sugerir la presencia de algún miembro de la familia *Macluravirus*, las cuales se han informado afectando al ñame (Wylie *et al.*, 2017; Lan *et al.*, 2018). Estos virus se transmiten al igual que los potyvirus, de forma no persistente a través de áfidos (Wylie *et al.*, 2017), por lo que son encontrados en infecciones mixtas con estos y, además, con badnavirus (Minutillo *et al.*, 2015; Filloux *et al.*, 2018). Lan *et al.* (2018) informaron la presencia del *Yam chlorotic necrosis virus* (YCNV) en infecciones mixtas con el YMV en las especies de *Dioscorea* spp. cultivadas en la provincia de Yunan, China.

El fragmento obtenido por RT-PCR coincidió con lo descrito por Zheng *et al.* (2010), corroborando la presencia de potyvirus asociados a los grupos síntoma-especie analizados. Los resultados obtenidos en las muestras de los grupos BA-b y ML-b puede estar provocado por la degradación del ARN, pues en ambos casos se trata de una muestra única (Tabla III) colectadas y conservadas hasta el final del ciclo del cultivo.

La principal ventaja del uso de estos cebadores radica en su capacidad para detectar varias especies de este género viral (Sokhandan-Bashir *et al.*, 2013) y la posibilidad de amplificar un fragmento pequeño, que no requiere de una enzima de alta fidelidad. Al respecto, Zheng *et al.* (2010) argumentaron la capacidad estos cebadores para amplificar el ADNc de todos los miembros reconocidos del género *Potyvirus*, incluyendo especies no reconocidas previamente como el *Commelina mild mosaic virus* (CMMV) detectado por primera vez en Australia (Zheng *et al.*, 2011). Todo lo anterior permite concluir que la reacción de RT-PCR utilizada constituye una herramienta de diagnóstico muy valiosa que podría ser empleada en la certificación de las líneas de plantas donantes para los programas de producción de semilla libre de estos agentes fitopatógenos.

## **5.2 Diversidad molecular de potyvirus asociados al cultivo del ñame del Banco de Germoplasma del INIVIT**

En el RT-PCR para la detección del YMV el fragmento obtenido coincidió con lo descrito por Mumford y Seal (1997), corroborando la presencia de YMV. Similares resultados informaron Eni *et al.* (2012) al comparar su empleo con el TAS-ELISA (del inglés: *Triple Antibody Sandwich* ELISA) y PAS-ELISA (del inglés: *Protein A-Sandwich* ELISA). Por lo que pueden considerarse como una herramienta de diagnóstico confiable coincidiendo con varios estudios que han empleado estos cebadores para la detección del YMV en

muestras de *Dioscorea* spp. Eni *et al.* (2013) informaron su utilidad para el diagnóstico de material de plantación sano.

En la detección del YMMV mediante RT-PCR el fragmento obtenido también coincidió con lo descrito por Mumford y Seal (1997), corroborando la presencia de este virus en el Banco de Germoplasma del INIVIT. Filho *et al.* (2013) informaron afectaciones causadas por la presencia de YMMV en cultivares locales de *D. trifida* en el estado de Pernambuco, Brasil. Sin embargo, en este trabajo no se logra detectar el YMMV en *D. bulbifera* y *D. trifida*.

Las infecciones mixtas de dos potyvirus en el mismo hospedante se han informado como resultados de la aplicación de técnicas basadas en el análisis de ARN y pueden resultar en efectos sinérgicos o antagónicos (Salvaudon *et al.*, 2013). Silva *et al.* (2016) informaron infecciones mixtas de *Papaya ringspot virus type Watermelon* (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) y *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) en combinación de dos o tres en calabaza y melón en el condado de Petrolina, estado de Pernambuco. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con los alcanzados por varios autores que han encontrado infecciones mixtas entre YMV y YMMV, fundamentalmente en *D. alata* y *D. rotundata* (Eni *et al.*, 2013; Asala y Alegbejo, 2016; Silva *et al.*, 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, parece indicar que en Cuba solo ha existido una sola introducción del YMV. Sin embargo, se infiere que pueden haber existido dos o tres introducciones del YMMV en el país. Sobre todo, si tenemos en cuenta la presencia de los aislados cubanos del YMMV en ramas distantes del árbol filogenético, y la similitud de estos con aislados de varias regiones del mundo.

### **5.3 Hospedantes alternativos de potyvirus asociados a *Dioscorea* spp.**

De acuerdo a los resultados obtenidos, cerca del 40% de las especies de arvenves examinadas resultaron positivas a la presencia de potyvirus, los cuales potencialmente pudieran causar enfermedades en el ñame. De las 15 familias de arvenves identificadas seis coinciden con los resultados obtenidos por Asala *et al.* (2014) en Nigeria, donde la familia más representada es *Asteraceae*, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

En los estudios realizados por Bermúdez-Guzmán *et al.* (2017) en México se identificaron tres familias coincidentes con los resultados de este trabajo (*Malvaceae*, *Cucurbitaceae*, *Poaceae*) como hospedantes alternativos de potyvirus. Por su parte, Martins *et al.* (2016) declaran las familias *Brassicaceae*, *Commelinaceae*, *Euphorbiaceae* y *Malvaceae* como hospedantes alternativos de potyvirus, las cuales también se identificaron en este

estudio, lo que corrobora su papel como una fuente de inóculo importante en las plantaciones de ñame.

Murphy *et al.* (2018) identificó la presencia del potyvirus *Potato virus Y* en dos familias (*Chenopodiaceae* y *Solanaceae*), aunque estas no coinciden con las que se declararon en los resultados obtenidos. Bermúdez-Guzmán *et al.* (2017) declara al igual que en este estudio resultados positivos a la detección de potyvirus en las familias *Malvaceae* y *Cucurbitaceae*. En adición, se declaran otras familias positivas a la presencia de potyvirus.

La evaluación de la presencia de potyvirus en arveses asociadas al cultivo del ñame constituye un elemento importante en el establecimiento de nuevas estrategias de manejo. De esta forma, el control de arvenses pudiera representar un elemento a tener en cuenta por los campesinos en manejo de enfermedades virales en el ñame.

## 6. Conclusiones

1. Las sintomatologías de mayor frecuencia, en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT, son la clorosis extendida y la deformación foliar, donde *D. cayennensis* subsp. *cayennensis* y *D. esculenta* resultan las más susceptibles.
2. Los potyvirus YMV y YMMV se encuentran asociados al cultivo del ñame en el Banco de Germoplasma del INIVIT, y al parecer de este último han existido varias introducciones.
3. Existe gran diversidad de arverses asociadas al cultivo del ñame que constituyen hospedantes alternativos de potyvirus, las cuales se encuentran mayoritariamente dentro de la familia *Asteraceae*.

## **7. Recomendaciones**

1. Establecer como medida de manejo la eliminación de las arvenses que forman parte de la flora acompañante en las áreas de producción de ñame.
2. Caracterizar los potyvirus presentes en las arvenses asociadas al cultivo del ñame.

## 8. Referencias Bibliográficas

- Abu-Reid, I. O. y Mohamed-Tageldin, A. (2017). Multi-wavelength spectrophotometric determination of chlorzoxazone and paracetamol in bulk and capsules. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Analysis*. 7: 16-20.
- Adams, M. J., Zerbini, M., French, R. C., Rabenstein, F., Stenger, D. C. y Valkonen, J. (2011). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses En: King, A. M. Q., et al. (eds.). *Family Potyviridae*. pp. 1069-1089. San Diego, CA, USA.
- Adebanjo, A. y Onesirosan, P. J. (1986). Surface-borne infection of *Dioscorea alata* tubers by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Plant Protection in the Tropics*. 3: 132-137.
- Adeniji, M. O. (1970). Influence of moisture and temperature on yam decay organisms. *Journal of Phytopathology*. 60: 1698-1699.
- Adeniji, M. O., Shoyinka, S. A., Ikotun, T., Asiedu, R., Hughes, J. d. A. y Odu, B. O. (2012). Yield loss in Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) due to infection by yam mosaic virus (YMV) genus *Potyvirus*. *Ife Journal of Science*. 14: 237-243.
- Adetoun, A. y Ikotun, T. (1989). Antifungal activity of dihydrodioscorine extracted from a wild variety of *Dioscorea bulbifera* L. *Journal of Basic Microbiology*. 29: 265-267.
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology (Fifth Edition). *Plant diseases caused by viruses*. pp. 724-824.
- Aighewi, B. A., Asiedu, R., Maroya, N. y Balogun, M. (2015). Improved propagation methods to raise the productivity of yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Food Security*. 7: 823-834.
- Aihebor, D. O., Aighewi, B. y Balogun, M. (2017). The response of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir) tuber portions to positive selection for quality seed yam production. *Advances in Crop Science and Technology*. 5: 294-305.
- Alegbejo, M. y Abo, M. (2002). Ecology, epidemiology and control of *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), genus *Potyvirus*, in west Africa. *Journal of Sustainable Agriculture*. 20: 5-16.
- Alegbejo, M. D. y Kashina, B. D. (2000). Survey of weed host of blackeye cowpea mosaic and cowpea aphid-borne mosaic potyviruses in Samaru, Nigeria. *Journal of Pure and Applied Sciences*. 3: 119-125.

- Aleman, M. E., Marcos, J. F., Brugidou, C., Beachy, R. N. y Fauquet, C. (1996). The complete nucleotide sequence of *yam mosaic virus* (Ivory Coast isolate) genomic RNA. *Archives of Virology*. 141: 1259-1278.
- Álvarez, A. (2000). Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. Ñame: producción de semillas por biotecnología. *Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología*. pp. 33-39.
- Alvis, A., Páez, M. y Lafont, J. (2009). Propiedades mecánicas y viscoelásticas del ñame (*Dioscorea alata*). *Información Tecnológica*. 20: 75-82.
- Amusa, N. A., Adegbita, A. A., Muhammed, S. y Daiyewu, R. (2003). Yam disease and its management in Nigeria. *Africa Journal of Biotechnology*. 2: 497-502.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. y Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 13079-13084.
- Arana, F. (2016). Caracterización del complejo potyvirus-áfidos asociado al cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Cuba. Tesis de doctorado en Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de La Habana, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
- Arnau, G., Abraham, K., Sheela, M., Chair, H., Sartie, A. y Asiedu, R. (2010). Yams. *Root and Tuber Crops*. 2: 127-148.
- Asala, S., Alegbejo, M. D., Kashina, B. D., Banwo, O. O. y Shinggu, C. P. (2014). Viruses in weeds in *Dioscorea* yam in Nigeria. *African Crop Science Journal*. 22: 109-115.
- Asala, S. W. y Alegbejo, M. D. (2016). Effects of serial planting of seed yam tubers on virus incidence and yam tuber degeneration. *African Crop Science Journal*. 24: 341-347.
- Asala, S. W. y Ebukiba, E. S. (2016). Profitability of yam production in Southern Guinea Savanna zone of Nigeria. *Net Journal of Agricultural Science*. 4: 9-14.
- Asare-Bediako, E., Showemimo, F. A. y Opoku-Asiama, Y. (2007). Microorganisms associate with rot of minisettis of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) *Resarch Journal of Microbiology*. 2: 278-283.
- Asha, K. I. y Nair, G. M. (2005). Screening of *Dioscorea* species for diosgenin from southern western ghats of India. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*. 18: 227-230.
- Asiedu, R. y Sartie, A. (2010). Crops that feed the world. Yams. *Food Security*. 2: 305-315.

- Atiri, G. I., Winter, S. y Alabi, O. J. (2003). Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries En: Loebenstein, G. y Thottappilly, G. (eds.). *Yam*. pp. 249-268. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Ayensu, E. S. y Coursey, D. G. (1972). Guinea yams: the botany, ethnobotany, use and possible future of yams in West Africa. *Economic Botany*. 26: 301-318.
- Baloch, U. K., Refera, Q., Islas-Rubio, A. R., Higuera-Ciapara, I., Lantin, R., Meyhuay, M. y Mejía, D. (2009). Cereales y granos. [En línea] Disponible desde: <http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/es/>. [Consultado: 5 de julio].
- Bermúdez-Guzmán, M. J., Guzmán-González, S., Lara-Reyna, J., Palmeros-Suárez, P. A., López-Muraira, I. G. y Gómez-Leyva, J. F. (2017). Presencia de *Papaya ringspot virus* (PRSV) en arvenses asociadas a *Carica papaya* en Colima, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36: 1-15.
- Bhat, A. I., Hohn, T. y Selvarajan, R. (2016). Badnaviruses: The current global scenario. *Viruses*. 8: 74-80.
- Bhattacharjee, R., Gedil, M., Sartie, A., Otoo, E., Dumet, D., Kikuno, H., Kumar, P. L. y Asiedu, R. (2011). *Dioscorea*. En: Kole, C. (ed.). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. pp. 71-96. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Borges, C. A. D., Ribeiro, E. L. D., Mizubuti, I. Y., Da Silva, L. D. F., Pereira, E. S., Zarpelon, T. G., Constantino, C. y Favero, R. (2011). Replacement of whole corn grain by oat grain on performance of feedlot lambs receiving high grain diets. *Semina: Ciências Agrárias*. 32: 2011-2020.
- Borges, M., Alarcón, Y., Malaurie, B., Hernández, Y. y Silva, J. J. (2009). Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (*Dioscoreaceae*). *Revista Peruana de Biología*. 16: 203-208.
- Bousalem, M., Douzery, E. J. y Fargette, D. (2000). High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of General Virology*. 81: 243-255.
- Bousalem, M., Arnau, G., Hochu, I., Arnolin, R. y Viader, V. (2006). Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the *Dioscoreae*. *Theoretical and Applied Genetics*. 113: 439-451.

- Bridge, J. (1972). Nematode problems with yams (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Journal PANS Pest Articles & News Summaries*. 18: 89-91.
- Cabrera, M., García, H., González, J. y Portal, O. (2013). Manejo de epifitias del virus de la mancha anular de la papaya utilizando barreras de *Zea mays* L. en *Carica papaya* L. *Revista de Protección Vegetal*. 28: 127-131.
- Carrington, J. C., Cary, S. M., Parks, T. D. y Dougherty, W. G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *The EMBO Journal*. 8: 365-370.
- Carrington, J. C., Jensen, P. E. y Schaad, M. C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal*. 14: 393-400.
- Casasanta, G. y Garra, R. (2018). Towards a generalized beer-lambert law. *Fractal and Fractional*. 2: 8.
- Clark, M. F. y Admas, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34: 475-483.
- Contreras, M. (2013). Caracterización química del camote de cerro (*Dioscorea* spp.) presente en el Estado de Jalisco, México. Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas, Universidad de Guadalajara Zapopan, Jalisco.
- Coursey, D. G. (1967). Yams: An Account of the Nature, Origins, Cultivation and Utilization of the Useful Members of the *Dioscoreaceae* (ed.): London: Longmans, Green and Co. Ltd, 244 pp.
- Craig, G., Webster, Stephen, J. W. y Michael, G. K. (2004). Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science*. 86: 1604-1607.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. y Carrington, J. C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *The Plant Cell*. 7: 549-559.
- Cheng, X. y Wang, A. (2017). The potyvirus silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. *Journal of Virology*. 91: 78-86.
- Cho, S. N. (1990). Contemporary approaches to the serology of tuberculosis. Bull International Union of Tuberculosis. *Bulletin of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*. 66: 59-62.

- Choi, S. K., Choi, J. K., Park, W. M. y Ryu, K. H. (1999). RT-PCR detection and identification of three species of cucumovirus with a genus-specific single pair of primers. *Journal of Virological Methods*. 83: 67-73.
- Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F. y Firth, A. E. (2008). An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 5897-5902.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772.
- De leeuw, G. T. N. (1972). *Hyoscyamus niger*, a useful local lesion host for mosaic virus in *Hippeastrum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 78: 107-109.
- Degras, L. (1993). *The yam, a tropical root crop* (ed.): Macmillan, Wageningen, Netherlands., 40 pp.
- Del Toro, F. J., Aguilar, E., Hernández-Walias, F. J., Tenllado, F., Chung, B.-N. y Canto, T. (2015). High temperature, high ambient CO<sub>2</sub> affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. *PLoS ONE*. 10: e0136062.
- Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G. y Carrington, J. C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *The EMBO Journal*. 13: 1482-1491.
- Duffus, J. (1971). Role of weeds in the incidence of virus diseases *Annual Review of Phytopathology*. 9: 319-340.
- Duterme, O., Colinet, D., Kummert, J. y Lepoivre, P. (1996). Determination of the taxonomic position and characterization of *yam mosaic virus* isolates based on sequence data of the 5'-terminal part of the coat protein cistron. *Archives of Virology*. 141: 1067-1075.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 5: 1-19.
- Eni, A. O. (2008). Epidemiology, diagnostics and molecular Studies of yam viruses in Ghana, Togo and Benin. Tesis de doctorado, Johannesburg University, Johannesburg.
- Eni, A. O., Hughes, J. d. A., Asiedu, R. y Rey, M. E. C. (2008). Sequence diversity among badnavirus isolates infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Ghana, Togo, Benin and Nigeria. *Archives of Virology*. 153: 2263–2272.

- Eni, A. O., Hughes, J. D. A. y Rey, M. E. C. (2010). Production of polyclonal antibodies against a yam isolate of Cucumber mosaic virus (CMV). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 6: 607-612.
- Eni, A. O., Hughes, J. D. A., Asiedu, R. y Rey, M. E. C. (2012). Re-Evaluation of Yam Mosaic Virus (YMV) Detection Methods. *Academic Journal of Plant Sciences*. 5: 18-22.
- Eni, A. O., Hughes, J. d. A., Asiedu, R. y Rey, M. E. C. (2013). Incidence and diversity of mixed viruses lower in yam tubers and tuber sprouts compared with field leaf samples: Implications for virus-free planting material control strategy. *Academic Journals*. 8: 3060-3067.
- Essad, S. (1984). Geographic variation of basic chromosome numbers and polyploidy in the *Dioscorea* genus with regard to counting for *transversa* Brown, *pilosiuscula* Bert. and *trifida* (L.). *Agronomie*. 4: 611-617.
- FAOSTAT (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. [En línea] Disponible desde: <http://faostat.fao.org/>. [Consultado].
- Fatogoma, S., Jean-Baptiste, E. D., Brahim, K. y Girardin, O. (2014). Towards sustainable production of new varieties of *Dioscorea rotundata* resistant to yam mosaic in rural areas of Côte d'Ivoire. *International Journal of Agricultural Science Research*. 3: 243-249.
- Fenby, N. S., Scott, N. W., Slater, A. y Elliott, M. C. (2010). PCR and non-isotopic labeling techniques for plant virus detection. *Cellular and Molecular Biology*. 41: 639–652.
- Filho, F. A. C. R. (2013). Caracterização de um isolado de *Yam mild mosaic virus* (YMMV) obtido de *Dioscorea trifida*, sequenciamento do genoma e produção de antissoro policlonal Universidade federal rural de Pernambuco, Universidade federal rural de Pernambuco y Programa de pós-graduação em fitopatologia.
- Filho, F. A. C. R., Nicolini, C., Resende, R. O., Andrade, G. P., Pio-Ribeiro, G. y Nagata, T. (2013). The complete genome sequence of a Brazilian isolate of *yam mild mosaic virus*. *Archives of Virology*. 158: 515–518.
- Filloux, D., Fernandez, E., Loire, E., Claude, L., Galzi, S., Candresse, T., Winter, S., Jeeva, M. L., Makesh Kumar, T., Martin, D. P. y Roumagnac, P. (2018). Nanopore-based detection and characterization of yam viruses. *Scientific Reports*. 8: 17879
- Fujihara, S. y Yamaguchi, M. (1978). Effects of allopurinol [4-hydroxyprazolo (3, 4-d) pyrimidine] on the metabolism of allantoin in soybean plants *Plant Physiology*. 62: 134-138.

- Garcia-Ruiz, H. (2018). Susceptibility Genes to Plant Viruses. *Viruses*. 10: 484.
- Ghoshal, B. y Sanfaçon, H. (2015). Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*. 479-480: 167-179.
- Girma, G., Spillane, C. y Gedil, M. (2016). DNA barcoding of the main cultivated yams and selected wild species in the genus *Dioscorea*. *Journal of Systematics and Evolution*. 54: 228–237.
- González, J. E. (2005). Diagnóstico de enfermedades virales pertenecientes al género de los potyvirus en los genotipos de ñame Pacala Duclos (*Dioscorea alata* L.) y Ñame de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir.). Aplicación de la corriente eléctrica al saneamiento. Tesis en opción al título académico de Master en Ciencias en Biotecnología Vegetal, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- González, M. E. (2012). El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*. 33: 5-15.
- Gouveia, B. C., Calil, L. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A. y Fontes, E. P. B. (2017). Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Frontiers in Microbiology*. 7: 2139.
- Gouy, M., Guindon, S. y Gascuel, O. (2009). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*. 27: 221–224.
- Govaerts, R., Wilkin, P. y Saunders, R. (2007). World checklist of Dioscoreales: yams and their allies (ed.): Royal Botanic Gardens Kew.
- Greuter, W. y Rankin-Rodríguez, R. (2016). Espermatófitos de Cuba. Inventario preliminar (ed.). Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem.
- Gumedzeo, Y. M. (2002). Major virus diseases of medicinal plants in West Africa. *Archives of Virology*. 147: 1855-1867.
- Hafrén, A., Löhmus, A. y Mäkinen, K. (2015). Formation of *Potato virus A*-induced RNA granules and viral translation are interrelated processes required for optimal virus accumulation. *PLOS Pathogens*. 11: e1005314.
- Harrison, B. D. y Robinson, D. J. (1988). Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences Philos*. 321: 4447-4462.

- Harrison, P. (2002). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030 (ed.): Servicio de Publicaciones y Multimedia, 97 pp.
- Henson, J. M. y French, R. (2008). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*. 31: 81-109.
- Hernández, R., Herrera, L., González, J., Sánchez, I. y García, J. (2001). Reporte de virosis en el germoplasma de ñame (*Dioscorea* spp.) en Cuba. *Centro Agrícola*. 28: 33-37.
- Hong, Y. y Hunt, A. G. (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase *Virology*. 226: 146-151.
- Hou, W. C., Chen, H. J. y Lin, Y. H. (2000). Dioscorins from different *Dioscorea* species all exhibit both carbonic anhydrase and trypsin inhibitor activities. *Botanical Bulletin of Academia Sinica (Taipei)*. 41: 191-196.
- Hughes, J. D. A., Dongo, L. y Atiri, G. I. (1997). Viruses infecting cultivated yams (*Dioscorea alata* and *D. rotundata*) in Nigeria. *Phytopathology*. 87: 545-551.
- Ivanov, K. I., Eskelin, K., Basic, M., De, S., Lohmus, A., Varjosalo, M. y Makinen, K. (2016). Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPPro. *The Plant Journal*. 85: 30-45.
- Janssens, M. (2001). Yam (ed.): Crop Production in Tropical Africa.
- Jeong, J., Ju, H. y Noh, J. (2014). A review of detection methods for the plant viruses. *Research in Plant Disease*. 20: 173-181.
- Kassanis, B. y Govier, D. A. (1971). New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses. *Journal of General Virology*. 10: 99-101.
- Kasschau, K. D. y Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 95: 461-470.
- Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W. y Hughes, J. (2014). Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Advances in Virus Research*. 90: 297-354.
- Kermarrec, A., Anais, A., Gamiette, F., Suard, C. y Dos Santos, F. (1991). Caribbean Food Crops Society: NRA. Proceedings of the Twentyfifth Annual Meeting. *Evaluation of susceptibilities of yam cultivars (D. alata, D. cayenensis, D. trifida) to soil nematodes: Meloidogyne incognita, Pratylenchus coffeae and Scutellonema bradys*. pp. 225-235. Antilles Guyane.

- Kumar, S. y Jena, P. K. (2014). Edible medicinal non-timber forest products from floral wealth of tribal Odisha. *Sabujima*. 22: 41-44.
- Kumar, S., Das, G., Shin, H.-S. y Patra, J. (2017). *Dioscorea* spp. (A wild edible tuber): A study on its ethnopharmacological potential and traditional use by the local people of similipal biosphere reserve, India. *Frontiers in Pharmacology*. 8: 52.
- Kumlachew, A. (2015). Detection of diseases, identification and diversity of viruses. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 5: 132-141.
- Kwak, H., Kim, J., Kim, M., Seo, J., Jung, M., Lee, S., Choi, H. y Ki, J. (2015). Molecular characterization of five potyviruses infecting Korean sweet potatoes based on analyses of complete genome sequences. *Plant Pathology Journal*. 31: 88-401.
- Kwon, S.-J., Cho, I.-S., Choi, S.-K., Yoon, J.-Y. y Choi, G.-S. (2016). Complete sequence analysis of a Korean isolate of chinese Yam necrotic mosaic virus and generation of the virus specific primers for molecular detection. *Research in Plant Disease*. 22: 194-197.
- Kwoseh, C. K., Plowright, R. A., Bridge, J. y Asiedu, R. (2007). Search for *Scutellonema bradys* resistance in yams (*Dioscorea* spp.) *Journal of Science and Technology*. 27: 33-42.
- Lain, S., Martin, M. T., Riechmann, J. L. y García, J. A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of Virology*. 65: 1-6.
- Lan, P., Meng, Y., Shen, P., Li, R., Ma, Y., Tan, S., Chen, H., Cao, M. y Li, F. (2018). Complete genome sequence of yam chlorotic necrosis virus, a novel macluravirus infecting yam. *Archives of Virology*. 163: 2275-2278.
- Lawson, R. H., Hearon, S. S., Smith, F. F. y Khan, R. P. (1973). Electron microscopy and separation of viruses in *Dioscorea floribunda*. *Phytopathology*. 63: 1435.
- Lebas, B. S. M. (2002). Diversity of viruses infecting *Dioscorea* species in the South Pacific, University of Greenwich, Greenwich, UK.
- Lebot, V. (1997). Synthèse des résultats sur les plantes à tubercules en Nouvelle Calédonie. En: *CIRAD Rapport interne*. Noumea, New Caledonia, pp. 175.
- Lebot, V. (2008). Tropical Root and Tuber Crops: Cassava, Sweet Potato, Yams and Aroids(ed.). Paris University, France, 351 pp.

- Lebot, V., Malapa, R. y Abraham, K. (2017). The Pacific yam (*Dioscorea nummularia* Lam.), an underexploited tuber crop from Melanesia. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 64: 217-235.
- Li, F., Zhang, C., Li, Y., Wu, G., Hou, X., Zhou, X. y Wang, A. (2018). Beclin1 restricts RNA virus infection in plants through suppression and degradation of the viral polymerase. *Nature Communications*. 9: 1268.
- López-Moya, J. J., Valli, A. y García, J. A. (2015). *Potyviridae*. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. (Berger, P. H., ed.). UK: Ltd: Chichester.
- Lopez, M. M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M. T., Llop, P., Penyalver, R. y Cambra, M. (2003). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International Microbiology*. 6: 233-243.
- López, M. P., Pérez, R. H., Hautrive, L. R. M., Casio, E. C. y Mederos, D. C. (2009). Empleo de inhibidores virales para el control de *Papaya ringspot virus* (PRSV) en *Carica papaya* L. *Centro Agrícola*. 36: 89-90.
- Mahajan, S., Dolja, V. V. y Carrington, J. C. (1996). Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology*. 70: 4370-4379.
- Makkouk, K. M. y Kumari, S. G. (1998). Further serological characterization of two tobavirus isolates from Algeria and Libya. *Pakistan Journal of Biological Science*. 1: 303-306.
- Malapa, R., Arnau, G., Noyer, J. L. y Lebot, V. (2005). Genetic diversity of the greater yam (*Dioscorea alata* L.) and relatedness to *D. nummularia* Lam. and *D. transversa* Br. as revealed with AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 52: 919-929.
- Mambole, I. A., Bonheur, L., Dumas, L. S., Filloux, D., Gomez, R.-M., Faure, C., Lange, D., Anzala, F., Pavis, C., Marais, A., Roumagnac, P., Candresse, T. y Teycheney, P.-Y. (2014). Molecular characterization of yam virus X, a new potexvirus infecting yams (*Dioscorea* spp) and evidence for the existence of at least three distinct potexviruses infecting yams. *Archives of Virology*. 159: 3421-3426.
- Mandal, B., Vijayanandraj, S., Shilpi, S., Pun, K. B., Singh, V., Pant, R. P., Jain, R. K., Varadarasan, S. y Varma, A. (2012). Disease distribution and characterisation of a new macluravirus associated with chirke disease of large cardamom. *Annals of Applied Biology*. 160: 225-236.

- Mantell, S. H. (1994). Summary of the Final report of EU Contract TS2-A-117: Development of anthracnose disease resistant *Dioscorea* yams using somatic fusion techniques. Risopoulos, S. (ed.). CTA/DGXII Joint Publication.
- Maroya, N., Asiedu, R., Lava Kumar, P., Mignouna, D., Lopez-Montes, A., Kleih, U., Phillips, D., Ndiame, F., Ikeorgu, J. y Otoo, E. (2014). Yam improvement for income and food security in West Africa: Effectiveness of a multi-disciplinary and multiinstitutional team-work. *Journal of Root Crops*. 40: 85-92.
- Martin, F. W. (1969). The species of *Dioscorea* containing sapogenin. *Economic Botany*. 23: 373-379.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L. R., Davis, C. E. y Dandekar, A. M. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 35: 1-25.
- Martins, D. S., Ventura, J. A., Paula, R. C. A. L., Fornazier, M. J., Rezende, J. A. M., Culik, M. P., Ferreira, P. S. F., Peronti, A. L. B. G., Carvalho, R. C. Z. y Sousa-Silva, C. R. (2016). Aphid vectors of *Papaya ringspot virus* and their weed host in orchards in the major papaya producing and exporting region of Brazil. *Crop Protection*. 90: 191-196.
- Matthews, R. E. F. (1980). Comprehensive Virology. En: Fraenkael-Conrat, H. y Wagner, R. R. (eds.). *Host plant responses to virus infection (Chapter 7)*. pp. 297-359. Springer, Boston, MA.
- Mejia, D. (2016). Los cultivos más importantes del mundo. [En línea] Disponible desde: <https://elagricultorprimero.org/2018/10/24/los-cultivos-mas-importantes-del-mundo/>. [Consultado: 5 de julio].
- Merits, A., Rajamaki, M. L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J. P. y Saarma, M. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *Journal of General Virology*. 83: 1211-1221.
- Mervat, M. y Fath, A. (2006). Comparison between different serological methods for detection of cowpea mosaic comovirus. *Egypt Journal of Experimental Biology*. 2: 13-17.
- Migliori, A. y Cadilhac, B. (1976). Contribution to the study of a virus disease of yam *Dioscorea trifida* in Guadeloupe. *Annals of Phytopathology*. 8: 73-78.

- Mignouna, H. D., Dansi, A. y Zok, S. (2002). Morphological and isozymic diversity of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) of Cameroon. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 49: 21-29.
- Mignouna, H. D., Dansi, A. y Asiedu, R. (2003). 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) in yams (*Dioscorea spp.*): variation and classification. *Plant Genetic Resource Newsletter*. 133: 23-30.
- Mignouna, H. D., Abang, M. M. y Asiedu, R. (2007). Proceedings of the Thirteenth Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops (ISTRC): tropical root and tuber crops : opportunities for poverty alleviation and sustainable livelihoods in developing countries. En: Kapinga, R. (ed.). *Advances in yam (Dioscorea spp.) genetics and genomics*. pp. 72-81: Kampala: ISTRC.
- Mignouna, H. D., Abang, M. M. y Asiedu, R. (2008). Genomics of Tropical Crop Plants. En: Moore, P. H. y Ming, R. (eds.). *Genomics of Yams, a Common Source of Food and Medicine in the Tropics*. pp. 549-570. Springer, New York, NY.
- MINAG (2004). Instructivo técnico del cultivo del ñame(ed.). Ciudad de La Habana, Cuba: Sedgri/Agrinfor, 9 pp.
- MINAG (2018). Informe al balance nacional de raíces y tubérculos. pp. 107. La Habana, Cuba: Ministerio de la Agricultura.
- Mingot, A., Valli, A., Rodamilans, B., San León, D., Baulcombe, D. C., García, J. A. y López-Moya, J. J. (2016). The P1N-PISPO *trans*-frame gene of sweet potato feathery mottle potyvirus is produced during virus infection and functions as RNA silencing suppressor. *Journal of Virology*. 90: 3543-3557.
- Minutillo, S. A., Marais, A., Mascia, T., Faure, C., Svanella-Dumas, L., Theil, S., Payet, A., Perennec, S., Schoen, L., Gallitelli, D. y Candresse, T. (2015). Complete nucleotide sequence of *Artichoke latent virus* shows it to be a member of the genus *Macluravirus* in the family *Potyviridae*. *Phytopathology*. 105: 1-25.
- Moon, J. Y. y Park, J. M. (2016). Cross-talk in viral defense signaling in plants. *Frontiers in Microbiology*. 7: 2068.
- Moran, J. V., Rijswijk, B., Traicevski, V., Kitajima, E. W., Mackenzie, A. M. y Gibbs, A. J. (2002). Potyviruses, novel and known, in cultivated and wild species of the family *Apiaceae* in Australia. *Archives of Virology*. 147: 1855-1867.

- Moura, R. M. (2005). Manual de fitopatología. En: Kimati, H., et al. (eds.). *Doenças das plantas cultivadas: Doenças do inhame da costa (Dioscorea cayennensis)*. pp. 415-419. Sao Paulo: Agronômica Ceres.
- Mukhtar, S. M., Banwo, O. O., Kashina, B. D. y Alegbejo, M. D. (2012). Occurrence of viruses infecting yam in kaduna State, Nigeria. *Nigerian Journal of Plant Protection*. 26: 10-17.
- Mulholland, V. (2009). Plant Pathology: Techniques and Protocols. En: Burns, R. (ed.). *Immunocapture-PCR for plant virus detection*. pp. 183-192. Humana Press, Totowa, NJ.
- Mumford, R. A. y Seal, S. (1997). Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *Journal of Virological Methods*. 69: 73-70.
- Murphy, A. F., Rondon, S. I., Moreno, A. y Fereres, A. (2018). Effect of *Potato virus Y* presence in *Solanum tuberosum* (Solanales: *Solanaceae*) and *Chenopodium album* on aphid (Hemiptera: *Aphididae*) Behavior. *Environmental Entomology*. 47: 654-659.
- Nagy, P. D. (2016). Tombusvirus-host Interactions: co-opted evolutionarily conserved host factors take center court. *Annual Review of Virology*. 3: 491-515.
- Nahanga, V. y Becvarova, V. (2014). Yam production as pillar of food security in logo local government area of benue state, Nigeria. *European Scientific Journal*. 10: 27-42.
- Naidu, R. A. y Hughes, J. D. A. (2001). Plant virology in sub-Saharan Africa. proceedings of a conference organized by IITA. En: Hughes, J. d. A. y Odu, B. O. (eds.). *Methods for the detection of plant virus diseases*. pp. 233-260. International Institute of Tropical Agriculture. Nigeria.
- Nayaboga, E., Tripathi, J. N., Manoharan, R., and Tripathi, L. (2014). Agrobacterium-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): an important tool for functional study of genes and crop improvement. *Frontiers in Plant Science*. 5: 463.
- Newton, A. C., Torrance, L., Holden, N., Toth, I. K., Cooke, D. E. L., Blok, V. y Gilroy, E. M. (2012). Climate change and defense against pathogens in plants. *Advances in Applied Microbiology*. 81: 104-118.
- Njukeng, A. P., Azeteh, I. N. y Mbong, G. A. (2014). Survey of the incidence and distribution of two viruses infecting yam (*Dioscorea* spp) in two agro-ecological zones of Cameroon. *International Journal of Current Microbiol Applied Science*. 3: 1153-1166.

- O'Sullivan, J. N. (2010). Yam nutrition: nutrient disorders and soil fertility management(ed.). Canberra, ACT, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Odu, B., Hughes, J., Shoyinka, S. y Dongo, L. (1999). Isolation, characterization and identification of Potyvirus from *Dioscorea alata* L. (water yam) in Nigeria. *Annals of Applied Biology*. 134: 65-71.
- Odu, B. O., Shoyinka, S. A., Hughes, J. d. A., Asiedu, R. y Oladiran, O. A. (2001). Root crops in the 21st Century. Proceedings of 7th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. En: Akoroda, M. O. y Ngeve, J. M. (eds.). *Yam viruses of Nigeria*. pp. 631-633. Cotonou, Benin: African Branch (ISTRIC-AB).
- Olivera, I. S., Moura, R. M. y Maia, L. C. (2005). Consideracoes sobre a cultura do inhame da costa e podridao-verde, principal causa de perdas durante o armazenamento. *Anais da Academia Pernambucana de Ciencia Agronomica*. 2: 90-106.
- Olsper, A., Chung, B. Y. W., Atkins, J. F., Carr, J. P. y Firth, A. E. (2015). Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae*. *EMBO Reports*. 16: 995-1004.
- Oluwole, O. B., Awororin, S. O., Henshaw, F., Elemo, G. N. y Ebuehi, O. A. T. (2013). Assessment of microbial changes and nutritional qualities of extruded white yam (*Dioscorea rotundata*) and Bambara groundnut (*Vigna subterranean*) blends. *Food and Nutritional Science*. 4: 100-107.
- Ondo-Ovono, P., Kevers, C. y Dommès, J. (2016). Effects of planting methods and tuber weights on growth and yield of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Gabon. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*. 6 32-42.
- Onwueme, I. C. (1978). The Tropical Tuber Crops: Yams, Cassava, Sweet Potato and Cocoyams(ed.). Chichester: John Wiley and Sons, 3-97 pp.
- Onwueme, I. C. y Charles, W. B. (1994). Tropical root and tuber crops: production, prospective and future prospects(ed.). Rome, Italy: FAO Plant Production and Protection Paper.
- Opara, L. U. (2003). YAMS: Post-Harvest Operation. INPhO - Post-harvest Compendium(ed.). Massey University, Palmerston North, New Zealand: AGST/FAO.

- Ortega, C. E. (1998). Sistema Alimentarios de Raices y Tuberculos (ed.). Maracay, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Investigaciones del Estado Monagas, 13-15 pp.
- Oruetxebarria, I., Guo, D., Merits, A., Makinen, K., Saarma, M. y Valkonen, J. P. (2001). Identification of the genome-linked protein in virions of Potato virus A, with comparison to other members in genus *Potyvirus*. *Virus Research*. 73: 103-112.
- Patel, R. N., Patel, D. R., Bhandari, R., Silawat, N., Homkar, U. y Sharma, J. (2016). Upcoming plant pathological techniques in disease diagnosis. *Journal of Microbiology and Experimentation*. 3: 00087.
- Paudel, D. B. y Sanfacon, H. (2018). Exploring the diversity of mechanisms associated with plant tolerance to virus infection. *Frontiers in Plant Science*. 9: 1575.
- Payares, I. R., Beltrán, J. D. y Millán, E. (2014). Incidencia de vorosis en ñame (*Dioscorea* spp.) en cinco municipios del Departamento de Sucre, Colombia. *Temas Agrarios*. 19: 86-95.
- Pérez-Camacho, J. y Raz, L. (2017). Flora de la República de Cuba. *Dioscoreaceae*: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin.
- Poornima, G. N. y Ravishankar, R. V. (2007). In vitro propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn.) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn.). *African Journal of Biotechnology*. 6: 2348-2352.
- Porth, A., Lesemann, D. E. y Vetten, H. J. (1987). Characterization of potyvirus isolates from West African yams (*Dioscorea* spp.). *Journal of Phytopathology*. 120: 166-183.
- Ramage, H. y Cherry, S. (2015). Virus-Host Interactions: From Unbiased Genetic Screens to Function. *Annual Review of Virology*. 2: 497-524.
- Ramser, J., Weising, K., Terauchi, R., Kahl, G., Lopez-Peralta, C. y Terhalle, W. (1997). Molecular marker based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* – *D. cayenensis*). *Genome*. 40: 903–915.
- Riechmann, J. L., Lain, S. y Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus biology. *Journal of General Virology*. 73: 1-16.
- Risimeri, J. B. (2000). Food security for Papua New Guinea. En: Bourke, R. M., et al. (eds.). *Yams and food security in the lowlands of PNG*. pp. 768-774. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).

- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P. y Shaw, J. G. (1993). Association of the nonstructural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*. 74: 1945-1949.
- Rodríguez, W. (2000). Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*. 11: 133-152.
- Rodríguez, Y., Depestre, T. y Palloix, A. (2014). Comportamiento en campo abierto de nuevos híbridos F1 y variedades de pimiento (*Capsicum annum* L.) multirresistentes a virus. *Cultivos Tropicales*. 35: 51-59.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. y Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*. 237: 283-295.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van derMark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. y Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systems Biology*. 61: 539–542.
- Roossinck, M. J. (2015). A new look at plant viruses and their potential beneficial roles in crops. *Molecular Plant Pathology*. 16: 331-333.
- Rosales, V., Sepúlveda, R., Rojas, B., Medina, V., Sepúlveda, C., Brown, J. y Mora, R. (2011). Virus transmitidos por insectos en tomate en la región de Arica y Parinacota: situación actual y manejo. En: Sepúlveda, S. R. (ed.). *Prospección y diagnóstico e virus en tomate*. pp. 21-31. Santiago, Chile.
- Saenz, P., Cervera, M. T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J. B., Riechmann, J. L. y García, J. A. (2000). Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K. *Journal of General Virology*. 81: 557-566.
- Saenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K., Carrington, J. y García, J. (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *Journal of Virology*. 76: 1922-1931.
- Saiki, R. K., Sharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. y Arnheim, N. (1985). Enzymic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-1354.
- Salerno, M., Mazzeo, G., Suma, P., Russo, A., Diana, L., Pellizzari, G. y Porcelli, F. (2018). *Aspidiella hartii* (Cockerell 1895) (Hemiptera: Diaspididae) on yam (*Dioscorea*

- spp.) tubers: a new pest regularly entering the European part of the EPPO region. *EPPO Bulletin*. 48: 287-292.
- Salvaudon, L., De Moraes, C. M. y Mescher, M. C. (2013). Outcomes of co-infection by two potyviruses: implications for the evolution of manipulative strategies. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B*. 280: 20122959.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3rd (ed.). New York.
- Scarcelli, N., Daïnou, O., Agbangla, C., Tostain, S. y Pham, J. L. (2005). Segregation patterns of isozyme loci and microsatellite markers show the diploidy of African yam *Dioscorea rotundata* (2n=40). *Theoretical and Applied Genetics*. 111: 226-232.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. y Carrington, J. C. (1997a). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO Journal*. 16: 4049-4059.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D. y Carrington, J. C. (1997b). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology*. 71: 8624-8631.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J. y Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*. 273: 300-306.
- Schreinemachers, P., Balasubramaniam, S., Boopathi, N. M., Ha, C. V., Kenyon, L., Praneetvatakul, S. y Wu, M. H. (2015). Farmers' perceptions and management of plant viruses in vegetables and legumes in tropical and subtropical Asia. *Crop Protection*. 75: 115-123.
- Seal, S., Turaki, A., Muller, E., Kumar, P. L., Kenyon, L., Filloux, D., Lopez-Montes, A. y Iskra-Caruana, M.-L. (2014). The prevalence of badnaviruses in west African yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes Susan. *Virus Research*. 186: 144-154.
- Séka, K., Etchian, A. O., Assiri, P. K., Toualy, M. N. Y., Diallo, H. A., Kouassi, N. K. y Aké, S. (2014). Yield loss caused by *yam mosaic virus* (YMV) and *cucumber mosaic virus* (CMV) on the varieties of *Dioscorea* spp. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)*. 5 64-71.
- Siddiqi, M. R. (1972). C. I. H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes. *Pratylenchus coffeae*. pp. 3. Commonwealth Agricultural Bureaux.

- Silva, D. M., Siqueira, M. V. B. M., Carrasco, N. F., Mantello, C. C., Nascimento, W. F. y Veasey, E. A. (2016). Genetic diversity among air yam (*Dioscorea bulbifera*) varieties based on single sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*. 15 1-12.
- Silva, G., Oyekanmib, J., Nkereb, C. K., Bömera, M., Kumar, P. L. y Seal, S. E. (2018). Rapid detection of potyviruses from crude plant extracts. *Analytical Biochemistry*. 546: 17-22.
- Sokhandan-Bashir, N., Ghasemzadeh, A., Masoudi, N., Khakvar, R. y Farajzadeh, D. (2013). Degenerate primers facilitate the detection and identification of potyviruses from the northwest region of Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*. 11 115-122.
- Sorel, M., Garcia, J. A. y German-Retana, S. (2014). The *Potyviridae* cylindrical inclusion helicase: A key multipartner and multifunctional protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 27: 215-226.
- Souiri, A., Zemzami, M., Amzazi, S., Mustapha y Ennaji, M. (2014). Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. *European Journal of Scientific Research*. 123: 181-295.
- Sudheerm, K. S. (2015). Identification and characterization of viruses infecting lesser yam (*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill). Thesis Submitted in partial fulfilment of the Requirements for the degree of master of science (integrated) in biotechnology Kerala Agricultural University, Thrissur, College of Agriculture Kerala Agricultural University Vellayani, Thiruvananthapuram. Kerala, India.
- Sukal, A., Kidanemariam, D., Dale, J., James, A. y Harding, R. (2017). Characterization of badnaviruses infecting *Dioscorea spp.* in the Pacific reveals two putative novel species and the first report of dioscorea bacilliform RT virus 2. *Virus Research*. 238: 29-34.
- Sukal, A. C. (2018). Molecular characterization and diagnosis of badnaviruses infecting yams in the South Pacific. Doctor Queensland University of Technology, Queensland University of Technology.
- Tecson-Mendoza, E., Laurena, A. y Botella, R. (2008). Recent advances in the development of transgenic papaya technology. *Biotechnology Annual Review*. 14: 423-462.
- Terauchi, R., Chikaleke, V. A., Thottappilly, G. y Hahn, S. K. (1992). Origin and phylogeny of Guinea yams as revealed by RFLP analysis of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 83: 743-751.

- Terry, E. R. (1976). Incidence, symptomatology, and transmission of a yam virus in Nigeria(ed.). Cali, Colombia: International Development Research Centre.
- Toualy, M. N., Atta-Diallo, H., Akinbade, S. A., Séka, K. y Kumar, L. (2014). Distribution, incidence and severity of viral diseases of yam (*Dioscorea* spp.) in Côte d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology*. 13: 465-470.
- Truol, G., Nome, C., Sagadin, M., Alemandri, V., Conci, V. y Cafrune, E. (2009). Microscopía electrónica: Principios fundamentales, técnicas de microscopía electrónica empleadas en la identificación de virus de plantas(ed.). Córdoba, Argentina: INTA, 25-30 pp.
- Tu, Y., Zhang, Z., Li, D., Li, H., Dong, J. y Wang, T. (2015). *Potato virus Y* HC-Pro reduces the ATPase activity of NtMinD, which results in enlarged chloroplasts in HC-Pro transgenic tobacco. *PLoS ONE*. 10: e0136210.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. y Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*. 74: 157-175.
- Valli, A., López-Moya, J. J. y García, J. A. (2007). Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*. *Journal of General Virology*. 88: 1016-1028.
- Valli, A., Gallo, A., Calvo, M., Pérez, J. J. y García, J. A. (2014). A novel role of the potyviral helper component proteinase contributes to enhance the yield of viral particles. *Journal of Virology*. 88: 9808-9818.
- Valli, A., Gallo, A., Rodamilans, B., López-Moya, J. J. y García, J. A. (2017). The HCPro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Molecular Plant Pathology*. 19: 744-763.
- Verchot, J. y Carrington, J. C. (1995a). Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *Journal of Virology*. 69: 1582-1590.
- Verchot, J. y Carrington, J. C. (1995b). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology*. 69: 3668-3674.
- Villordon, A. Q. y Clark, C. A. (2014). Variation in virus symptom development and root architecture attributes at the onset of storage root initiation in 'Beauregard' sweetpotato plants grown with or without nitrogen. *PLoS ONE*. 9: e107384.

- Voloudakis, A. E., Malpica, C. A., Aleman-Verdaguer, M. E., Stark, D. M., Fauquet, C. M. y Beachy, R. N. (2004). Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants. *Archives of Virology*. 149: 699-712.
- Waltermann, A. y Maiss, E. (2006). Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology*. 87: 2381-2386.
- Weber, P. H. y Bujarski, J. J. (2015). Multiple functions of capsid proteins in (+) stranded RNA viruses during plant-virus interactions. *Virus Research*. 196: 140-149.
- Wei, T., Huang, T. S., McNeil, J., Laliberté, J. F., Hong, J., Nelson, R. S. y Wang, A. (2010). Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of Virology*. 84: 799-809.
- Wen, R. H. y Hajimorad, M. R. (2010). Mutational analyses of the putative *pipo* of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology*. 400 1-7.
- Wilkin, P., Schols, P., Chase, M. W., Chayamarit, K., Furness, C. A., Huysmans, S., Rakotonasolo, F., Smets, E. y Thapayai, C. (2005). A plastid gene phylogeny of the yam genus, *Dioscorea*: Roots, Fruits and Madagascar. *Systematic Botany*. 30: 736-749.
- Winch, J. E., Jackson, G. V. H., Newhook, F. J. y Cole, J. S. (1993). Blackening on yam in response to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology*. 42: 187-194.
- Wylie, S. J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J. J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F. M. y Consortium, I. R. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. *Journal of General Virology*. 98: 352-354.
- Xie, Y., Jiao, X., Zhou, X., Liu, H., Ni, Y. y Wu, J. (2013). Highly sensitive serological methods for detecting tomato yellow leaf curl virus in tomato plants and white-flies. *Journal of Virology*. 10: 142-150.
- Yeyeh, T. M. N., Diallo, H. A., Akinbade, S. A., Srka, K. y Kumar, P. L. (2014). Distribution, incidence and severity of viral diseases of yam (*Dioscorea* spp.) in Ivory Coast. *African Journal of Biotechnology*. 13: 463-470.
- Zhao, Y. L., Song, H. R., Fei, J. X., Liang, Y., Zhang, B. H., Liu, Q. P., Wang, J. y Hu, P. (2012). The effects of Chinese yam-epimedium mixture on respiratory function and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 32: 203-207.

Zheng, L., Rodoni, B. C., Gibbs, M. J. y Gibbs, A. J. (2010). A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*. 59: 211-220.

Zheng, L., Gibbs, M., Gibbs, A. y Rodoni, B. (2011). First report of a newly detected potyvirus, *Commelina mild mosaic virus*, infecting *Commelina* spp. in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*. 6: 11-15.

## 9. Anexos

**Anexo I.** Composición nutricional en base a una porción de 100 g de ñame (Zhao *et al.*, 2012).

Composición	Valor nutricional
Calorías	118 kcal
Proteínas	1,53 g
Carbohidratos	27,88 g
Azúcar	0,5 g
Grasa	0,17 g
Saturada	0,037 g
Monoinsaturada	0,006 g
Poliinsaturada	0,076 g
Colesterol	0
Fibra	4,1
Sodio	0,009 g
Potasio	0,816 g