

# Evolution of diagnostic technics for plant viruses

## Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos

Ramiro González-Garza\*, Biociencia, S. A. de C. V.; Agustín Melgar 2317, Col. Reforma, C.P. 64550, Monterrey, N. L. \*Autor para correspondencia: biociencia01@prodigy.net.mx.

Recibido: 06 de Junio, 2017.

Aceptado: 14 de Agosto, 2017.

González-Garza R. 2017. Evolution of diagnostic technics for plant viruses. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 591-610.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-1

Primera publicación DOI: 01 de Septiembre, 2017.

First DOI publication: September 01, 2017.

**Resumen.** La sintomatología producida por los virus en las plantas enfermas fue la primera forma de detectar e identificar los virus que las afectaban y los nombraron de acuerdo a la sintomatología que producían. El uso de plantas diferenciales infectadas mediante transmisión mecánica, por injerto o vectores, amplió la capacidad de detectar e identificar muchos de los virus fitopatógenos y también llevó a confundir con virosis otras enfermedades causadas por otros agentes infecciosos. La detección por serología usa la interacción de la proteína viral como antígeno contra los anticuerpos producidos contra ellos por un vertebrado. Los primeros métodos serológicos usados para la detección viral fueron de precipitación antígenos-anticuerpo en medio líquido, seguido por la doble difusión en agar y finalmente por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, muy económico en el uso de reactivos, muy sensible y usa un medio sólido de

**Abstract.** The symptoms caused by viruses in diseased plants were the first way to detect and identify the viruses that affected them and named them according to the symptoms they produced. The use of differential plants infected by mechanical transmission, by grafting or vectors, increased the ability to detect and identify many of the phytopathogenic viruses and also led to confounding other diseases caused by other infectious agents with viruses. Serology detection uses the interaction of the viral protein as an antigen against the antibodies produced against them by a vertebrate. The first serological methods used for viral detection were antigen-antibody precipitation in liquid medium, followed by agar double diffusion and finally by enzyme-linked immunosorbent assay, very economical in the use of reagents, very sensitive and uses a Solid medium for antigen or antibody immobilization which may be different plastics or membranes. Detection of viral nucleic acid by nucleic acid hybridization or polymerase chain reaction is more sensitive than serology, and the latter method combined with second generation sequencers (Next Generation Sequencing) have revolutionized detection of viruses in plants.

**Key words:** Detection of viruses, differential plants, serology, ELISA, nucleic acid hybridization, PCR, NGS.

inmovilización del antígeno o del anticuerpo que pueden ser diferentes plásticos o membranas. La detección del ácido nucleico viral mediante el método de hibridación de ácidos nucleicos o por la reacción en cadena de la polimerasa es más sensible que la serología y éste último método combinado con los secuenciadores de la segunda generación (Next Generation Sequencing) han revolucionado la detección de virus en los vegetales.

**Palabras clave:** Detección de virus, plantas diferenciales, serología, ELISA, hibridación de ácidos nucleicos, PCR, NGS.

## INTRODUCCIÓN

A diferencia de otros patógenos vegetales, el manejo de las enfermedades virales, basados en métodos directos, como el uso de viricidas para su control, no se han desarrollado a la fecha, por lo tanto, las enfermedades virales se combaten con estrategias indirectas, como el combate al insecto vector, eliminación las plantas enfermas, evitar la siembra de semillas infectadas. Por lo anterior, los métodos de detección e identificación de virus son críticos para el manejo de las enfermedades virales. Los métodos de detección deben de ser lo más convenientes, efectivos, específicos y rápidos (Joo-jin J. 2014) y son reconocidos como el instrumento básico de la virología, porque la exactitud de los estudios dependen directamente de la sensibilidad de éstas técnicas (Salazar 1995).

Los virus han co-evolucionado por millones de años hospedando a los tres dominios de las formas vivientes, arqueobacterias, Bacterias y Eucariotes (Gergerich y Dolja 2006), sin embargo

## INTRODUCTION

Unlike other plant pathogens, the management of viral diseases based on direct methods for their control, such as the use of virucides, have not been developed to date. Therefore, viral diseases are fought with indirect strategies, such as fighting the vector insect, eliminating diseased plants, or avoiding the planting of infected seeds. Because of this, the methods to detect and identify viruses are crucial for handling viral diseases. Detection methods must be as convenient, effective, specific, and quick as possible (Joo-jin J. 2014) and are acknowledged as the basic instrument of virology, because the accuracy of the studies depend directly on the sensitivity of these techniques (Salazar 1995).

Viruses have coevolved for millions of years, hosting the three domains of life forms, archaeobacteria, Bacteria, and Eukaryotes (Gergerich and Dolja 2006); however, their knowledge is very recent. Studies on viruses begins with the works by Mayer in 1886, who mechanically transmitted the Tobacco Mosaic Virus (TMV) from a diseased plant to a healthy plant; Iwanowski, in 1892, proved that the sap of these plants remained ineffective after being passed through a porcelain bacteria-proof filter, and Beijerinck, in 1898, discovered the causal agent as "*Contagium vivum fluidum*", and first introduced the word "virus" to differentiate it from the contagious corpuscular fluid containing bacteria or fungal spores, thus giving rise to the science of Virology (Hull R. 2014). Ever since then, researchers have searched for a way to study viruses to detect them in their hosts, identify, and classify all new viruses that were being discovered in this emerging branch of science.

su conocimiento es muy reciente, el estudio de los virus comienza con los trabajos de Mayer en 1886, quien transmitió mecánicamente el Tobacco mosaic virus (TMV) de planta enferma a planta sana; Iwanowski en 1892, demostró que la savia de dichas plantas, seguía infectiva después de pasar por un filtro de porcelana a prueba de bacterias y Beijerinck en 1898 fue quien describió al agente causal como “*Contagium vivum fluidum*”, e introdujo por primera vez la palabra “virus”, para diferenciarlo del fluido contagioso corpuscular que contenía bacterias u esporas de hongos, dando así, inicio a la ciencia de la Virología (Hull R. 2014). Desde ese entonces, los investigadores han buscado como estudiar los virus para poderlos detectar en sus hospederos, identificar y clasificar todos los virus nuevos que se fueron descubriendo en ésta naciente rama de la ciencia.

### Detección por Sintomatología

La sintomatología producida por los virus en las plantas, fue la primera forma de detectar e identificar los virus a finales del siglo XIX y su nombre fue asociado con los síntomas que producía, por ejemplo: Tobacco mosaic virus (TMV), Papaya ringspot virus (PRSV), etc., sin embargo muy pronto se dieron cuenta los investigadores, que muchas variantes del mismo virus producían síntomas muy diferentes y por otro lado, muchos virus diferentes producían síntomas muy similares y aunado a ello, las plantas también exhibían síntomas parecidos a virosis como respuesta a condiciones desfavorables del clima, balance nutricional de minerales del suelo, infecciones por patógenos no virales, daño causado por insectos, ácaros, nematodos. Aunque la sintomatología proveía una vital información sobre las enfermedades virales, se requería mucha experiencia de campo para tomar decisiones basados solo por la sintomatología para identificar un virus,

### Detection by symptoms

The symptoms produced by the viruses in the plants was the first way to detect and identify viruses in the late 19th Century, and their names were related to the symptoms it produced, such as the Tobacco mosaic virus (TMV), the Papaya ringspot virus (PRSV), etc. However, scientists soon realized that many variants of the same virus produced very different symptoms, and on the other hand, many different viruses produced very similar symptoms, and in addition, plants also presented symptoms similar to a virosis as a response to unfavorable weather conditions, nutrient balances in soil minerals, infections by non-viral pathogens, damage caused by insects, mites, or nematodes. Although the symptoms provided crucial information on viral diseases, much field experience was required to make decisions based only on symptoms to identify a virus. Generally, field inspections must be accompanied by other tests for the correct diagnosis of a viral infection (Naidú and Hughes. 2001).

During the period between 1900 and 1935, there was more attention on the description and identification by the symptoms of the disease, both macroscopically and by abnormalities caused inside the cells observed under light microscopes, called viral inclusions. These were the only aspects that could be studied with the techniques at hand. All was confusing, and the only fact scientists had about viruses was that they were very small and caused diseases. In 1929, Holmes showed that local lesions produced by mechanical inoculation in certain hosts could be used to count the amount of infective viruses. This technique helped study some of the properties of viruses, such as the point of thermal inactivation, point of maximum dilution, and *in vitro* longevity, and it paved the way for the future isolation and purification of the viruses.

generalmente es necesario que las inspecciones de campo sean acompañadas por otras pruebas para la correcta diagnosis de una infección viral (Naidú y Hughes. 2001).

Durante el período (1900 al 1935) la atención fue enfocada a la descripción e identificación por la sintomatología de la enfermedad, tanto macroscópicamente, como anormalidades ocasionadas dentro de las células vistas con microscopía de luz, llamadas inclusiones virales. Estos eran los únicos aspectos que se podían estudiar con las técnicas que tenían disponibles; todo era confusión, lo único que se sabía de los virus, era que éstos eran muy pequeños y causaban enfermedades. Holmes en 1929 demostró que las lesiones locales producidas por inoculación mecánica en ciertos huéspedes, podía ser usado para cuantificar cuantitativamente la cantidad de virus infectivos, esta técnica permitió estudiar algunas de las propiedades de los virus, como: Punto de inactivación térmica, punto de dilución máxima y longevidad *in vitro* y facilitó el camino para el futuro aislamiento y purificación de los virus.

Usando la técnica de transmisión mecánica, muchas de las enfermedades de los vegetales ocasionados por virus filtrables fueron descritas de 1900 a 1935, sin embargo, pronto se encontró que muchas enfermedades con síntomas similares a enfermedades virales, no se transmitían mecánicamente y el criterio de filtrabilidad no se podía aplicar, sin embargo su naturaleza infecciosa se podía comprobar por transmisión por injerto o por vectores, en esa forma, muchas de las enfermedades si fueron causadas por virus que no se transmitían mecánicamente, pero muchas otras, con síntomas de amarillamientos o escobas de bruja, que fueron atribuidas a virus, después se comprobó, que eran causadas por Fitoplasmas o Spiroplasmas u otras bacterias no cultivables y no trasmisible mecánicamente.

Using the mechanical transmission technique, many of the plant diseases caused by filterable viruses were described between 1900 and 1935, although it was soon found that many diseases with symptoms similar to viral diseases were not mechanically transmitted and the filterability criterion could not be applied. However, its infectious nature could be proven by transmission by grafting or by vectors. In this way, many of the diseases were caused by viruses that were not mechanically transmitted, but many others, with symptoms of yellowing or witch's broom, that were attributed to viruses, although it was later proven that they were caused by phytoplasmas or Spiroplasmas or other non-cultivable bacteria and not mechanically transmissible.

#### **Detection with differentiated plants**

In 1931, Smith worked with viruses on potatoes and proved that the symptoms could be caused by the combination of several viruses, and in this way, by using differential plants and transmission by insects, he was able to separate Potato virus X (PVX) from Potato virus Y (PVY). By transmitting the latter with the aphid *Myzus persicae* that did not transmit PVX and by mechanical inoculation in *Datura stramonium* he separated PVX, since this plant is immune to virus Y. In this way, he was able to work with pure viruses to determine their host ranges, and for the first time, was able to observe the differences in the virulence of the isolations of one same virus due to the differences in symptoms produced. Until that moment, the use of differential plants and their range of hosts, using mechanical inoculation or by grafting or with the use of vectors, was the only way to identify viruses in plants. Tables 1, 2, and 3 show the different symptoms in the differential plants that were used to

## Detección por Plantas diferenciales

En 1931 Smith trabajó con virus en papa y demostró que la sintomatología podía ser causada por la combinación de varios virus, en esta forma, utilizando plantas diferenciales y transmisión por insectos, pudo separar el Potato virus X (PVX) del Potato virus Y (PVY), al transmitir éste último mediante el áfido *Myzus persicae* que no trasmite el PVX y por inoculación mecánica en *Datura stramonium* separó el virus PVX, porque ésta planta es inmune al virus Y; en ésta forma pudo trabajar con virus puros, para determinar su rango de hospederos y por primera vez pudo observar las diferencias en virulencia de los aislamientos de un mismo virus por las diferencias en la sintomatología producida. Hasta ese momento, el uso de plantas diferenciales y su rango de hospederos, usando inoculación mecánica o por injerto o mediante el uso de vectores, era la única forma de identificar los virus en vegetales. En los Cuadros 1, 2 y 3 se observan los diferentes síntomas en las plantas diferenciales

**Cuadro 1. Rango de hospederos y sintomatología para el diagnóstico del PRSV (tres semanas postinoculación).**

**Table 1. Range of hosts and symptoms for the diagnosis of the PRSV (three weeks postinoculation).**

Nombre científico	Sintomatología <sup>x</sup>	
	Local	Sistémica
<i>Carica papaya</i>	MC	DF, A, M
<i>Cucumis melo</i>	ns	ns
<i>Cucumis sativus</i>	ns	ns
<i>Nicotiana debnyii</i>	ns	ns
<i>Nicotiana glutinosa</i>	ns	ns
<i>N. tabaccum cv. Samsun</i>	ns	ns
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL	ns
<i>Ch. amaranticolor</i>	ns	ns
<i>Datura stramonium</i>	ns	ns

<sup>x</sup>MC= Mancha clorótica; DF= Distorsión foliar; A= Achaparramiento; M= Mosaico; LL= Lesiones locales; ns= No síntomas / <sup>x</sup>MC= Chlorotic spot; DF= Foliar distortion; A= Stunting; M= Mosaic; LL= Local lesions; ns= No symptoms.

identify the Papaya ringspot virus (PRSV), for the Cucumber Mosaic Virus (CMV) (Kelaniyangoda and Madhubashini 2008), and 10 different viruses in potatoes (Salazar 1995). In this way, symptom comparison charts were drawn so all viruses could be identified, using mechanical transmission or by vectors or grafting. The use of differential plants to detect viruses is still common in several fruit trees such as citrus, pome, and rosaceae plants (Roistacher 1991).

## Detection by serology

The birth of serology for the identification of viruses that affect plants began with the discovery by Beale in 1928, who showed that the plants infected by the Tobacco mosaic virus (TMV) contained a specific antigen, different to those of the healthy plant, when both saps were injected into different rabbits. Later, in 1933, Gratia showed that plants infected with different viruses contained

**Cuadro 2. Rango de hospederos y sintomatología para diagnóstico del CMV.**

**Table 2. Range of hosts and symptoms for the diagnosis of CMV.**

Nombre científico	Sintomatología <sup>x</sup>	
	Local	Sistémica
<i>Nicotiana glutinosa</i>	ns	ns
<i>N. tabaccum cv. White burley</i>	ns	ns
<i>Capsicum annum</i>	ns	DF, M
<i>Nicotiana debnyii</i>	ns	ns
<i>N. tabaccum cv. Xanthi</i>	ns	ns
<i>Datura stramonium</i>	ns	M
<i>Solanum melongena</i>	ns	DF, Mot
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL	ns
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	ns
<i>Physalis floridana</i>	ns	ns
<i>Cucumis sativus</i>	ns	ns

<sup>x</sup>DF= Distorsión foliar; MC= Manchas cloróticas; Mot= Moteado; M= Mosaico; LL= Lesiones locales; ns= No síntomas / <sup>x</sup>DF= Foliar distortion; MC= Chlorotic spots; Mot= Dotted; M= Mosaic; LL= Local lesions; ns= No symptoms.



**Cuadro 3. Rango de hospedantes para el diagnóstico biológico de algunos virus de la papa (*Solanum tuberosum*).**  
**Table 3. Range of hosts for the biological diagnosis of some viruses in potatoes (*Solanum tuberosum*).**

Huesped	Virus									
	PVX	PVY	PVA	PRLV	PVS	PVM	PVT	APMV	APLV	PMTV
<i>Nicotiana tabaccum</i>	L,S <sup>x</sup>	S	S	--	--	--	--	S	S	--
<i>N. devalandi</i>	S	S	S	--	--	--	--	S	S	--
<i>N. glutinosa</i>	S	S	S	--	--	--	--	S	S	--
<i>N. devneyi</i>	S	S	S	S	S	L	--	S	S	S
<i>Physalis floridana</i>	L,S	L,S	S	S	--	--	--	--	--	--
<i>Solanum lycopersici</i>	S	S	S	--	--	S	--	--	--	--
<i>Datura stramonium</i>	S	--	--	S	--	--	--	S	--	--
<i>D. metel</i>	S	S	S	--	--	--	--	--	--	--
<i>Gonphrena globosa</i>	L	--	--	--	L	--	--	--	--	--
<i>Chenopodium quinoa</i>	L	--	--	--	L,S	--	S	--	L	--
<i>Ch. Amaranticolor</i>	L	--	--	--	L	--	S	--	L	L
<i>Phaseolus vulgaris</i>	--	--	--	--	--	L	L	--	--	--
Clon de papa A6	L	L	L	--	L	--	--	S	S	--

<sup>x</sup>L= Lesión local y S= Lesión sistémica; --= Ausencia de síntomas. PRLV fue inoculado por áfidos o injerto, el resto, por inoculación mecánica / <sup>x</sup>L= Local lesion; S= Systemic lesion; --= absence of symptoms. PRLV was inoculated by aphids or grafting, and the rest, by mechanical inoculation.

que eran utilizados para la identificación de Papa-ya ringspot virus (PRSV), Cucumber mosaic virus (CMV) (Kelaniyangoda and Madhubashini 2008), y 10 diferentes virus en papa (Salazar 1995), en esa forma se realizaban cuadros comparativos de síntomas para todos los virus que podían ser identificados, utilizando transmisión mecánica, vectores o por injerto. La detección de virus mediante plantas diferenciales se sigue utilizando en muchos frutales como cítricos, pomáceos y rosáceos (Roistacher 1991).

### Detección por Serología

El nacimiento de la serología para la identificación de los virus que afectan a los vegetales comenzó con el descubrimiento de Beale en 1928 demostrando que las plantas infectadas por el Tobacco mosaic virus (TMV) contenían un antígeno específico diferente a los de la planta sana, cuando ambas savias eran inyectadas en conejos diferentes, posteriormente Gratia en 1933, demostró que las plantas infectadas con diferentes virus, contenían antígenos

diferentes específicos antígenos, and finally, Chester, in 1935 and 1936, showed that the different TMV and PVX isolations could be told apart serologically (Hull R 2004).

As progress was being made in the methodology for the purification of viruses, mainly with the discovery by Brakke (1951 and 1953) of centrifugation in differential gradients using different concentrations of lithium chloride, caesium chloride or sulphate, and later, with the development of centrifugation in saccharose gradients of 10 to 40%, on which the infective sap was formed, (Lister, 1966 and 1968), the virus was separate, forming a strip, in which its density would equal the density of the saccharose. With the purified viruses, the specific antisera were formed for each of the purified viruses that already helped for the differential identification of the different viruses that affected plants.

The first serological methods used to detect and identify plant viruses were by reacting to the antibodies and the viruses (antigens) in liquid media and forming precipitates that could be viewed

específicos diferentes y por último Chester en 1935 y 1936 demostró que diferentes aislamientos de TMV y del PVX podían ser distinguidos serológicamente (Hull R 2004).

Conforme se fue avanzando en la metodología para la purificación de los virus, principalmente con el descubrimiento de Brakke (1951 y 1953) de la centrifugación en gradientes diferenciales usando diferentes concentraciones de cloruro de litio, cloruro o sulfato de cesio y posteriormente, con el desarrollo de la centrifugación en gradientes de sacarosa de 10% al 40%, sobre el cual se colocaba la savia infectiva (Lister, 1966 y 1968), el virus se separaba formando una banda donde su densidad igualara a la densidad de la sacarosa. Con los virus purificados se produjeron los antiseros específicos para cada uno de los virus purificados y que servían ya, para la identificación diferencial de los diferentes virus que afectaban a los vegetales.

Los primeros métodos serológicos utilizados para la detección e identificación de virus vegetales fueron reaccionando los antiseros y los virus (antígenos) en medios líquidos y formando precipitados que podían ser observados a simple vista. Las partículas virales son polivalentes, esto es, cada partícula viral puede reaccionar con varias moléculas del anticuerpo que es divalente, esta reacción forma una estructura látice que al crecer forma el precipitado visible (Matthews 1970), a ésta reacción se le llama “de precipitación”, la reacción de aglutinación de cloroplastos y de otros organelos celulares es cuando se hace reaccionar una gota de savia infectiva de una planta cuyo virus no se conoce con una gota de antiseros específicos de virus conocidos, colocadas en un portaobjeto y observada la reacción bajo microscopio de disección. La unión de los anticuerpos con las partículas virales formaba una trama (estructura látice) que en su entrelazado precipita junto a cloroplastos y otros organelos celulares (Kleczkowski 1965).

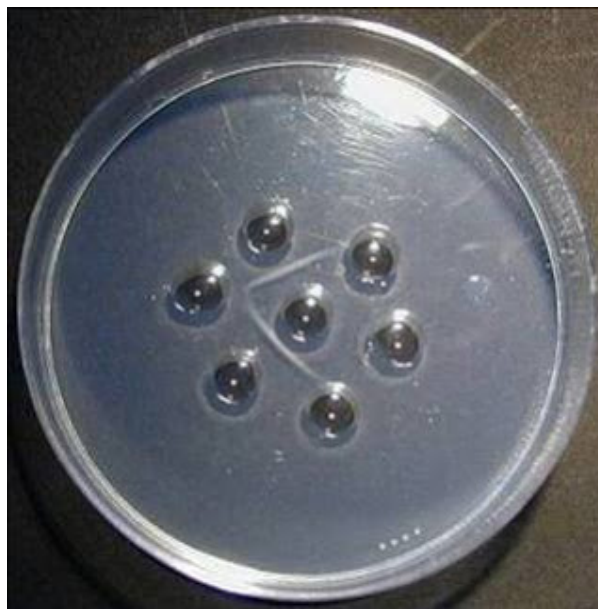
by the naked eye. Viral particles are polyvalent, meaning that each viral particle can react with several molecules of the antibody that is divalent. This reaction forms a lattice structure that forms the visible precipitate during growth (Matthews 1970). This is called a “precipitation” reaction. The reaction of the agglutination of chloroplasts and other cell organelles is when a drop of infective sap of a plant with an unknown virus is made to react with a drop of specific antisera of known viruses, placed in a tray, and observed under a dissection microscope. The union of the antibodies with the viral particles formed a structure (lattice) that, in its weaving, precipitates, along with chloroplasts and other cell organelles (Kleczkowski 1965).

Another widely used method in the 1960's and 1970's was double diffusion in agar, a method carried out on trays or Petri dishes, with great advantages such as the following: (i) the mixtures of the molecules of the antigens and antibodies are physically separated due to their degree of diffusion in the gel, and (ii) several antigens or antibodies can be compared, placed in neighboring cells on the same tray or sheet (Ouchterlony 1962). The antigens and antibodies diffuse one against the other in the agar, and after a while, a precipitation zone is formed when they reach an acceptable concentration, which can be visible to the naked eye, or by staining with protein dyes and photographed (Figure 1). The diffusion of the viral antigen in the agar depends strongly on the size and shape of the virus. Isometric viruses diffuse in a satisfactory manner, although rod-shaped viruses diffuse slower or not at all. Splitting by sonification helps the diffusion in agar of the latter and the formation of the precipitate (Tomlinson and Walkey 1967). The main disadvantage of these models is the large volume of antiserum used in each detection reaction.

Otro método muy utilizado en la década de los 1960 y 1970 fue la doble difusión en agar, las grandes ventajas de éste método llevado a cabo en portaobjetos o cajas de Petri son: (i) las mezclas de las moléculas de los antígenos y anticuerpos están físicamente separados, por su diferente grado de difusión en el gel y (ii) se pueden comparar varios antígenos, o anticuerpos, colocados en celdas vecinas en una misma placa o cubreobjeto (Ouchterlony 1962). Los antígenos y los anticuerpos difunden uno en contra del otro en el agar y después de un tiempo se forma una zona de precipitación cuando alcanzan una concentración aceptable, la cual puede ser visible a simple vista o con tinción de proteínas y fotografiada (Figura 1). La difusión del antígeno viral en el agar depende fuertemente del tamaño y forma del virus, los isométricos difunden satisfactoriamente pero los de varilla difunde más lento o no difunden, el rompimiento por sonicación ayudan a la difusión en el agar de éstos últimos y la formación del precipitado (Tomlinson y Walkey 1967). El principal inconveniente de estos métodos, es el gran volumen de antisuero que se usa en cada reacción de detección.

Los métodos de detección serológica de precipitación en medio líquido fueron usados por aproximadamente 20 años y fueron progresivamente sustituidos por los métodos de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay) o ELISA por sus siglas en inglés. Clark y Adams (1977) mostraron que el método de ELISA en placa podía ser efectivamente aplicado a la detección de virus vegetales, desde ése tiempo a la fecha, dicho método ha sido ampliamente usado. Muchas variantes del procedimiento básico han sido desarrolladas con el objetivo de optimizar la prueba para propósitos particulares.

El método es muy económico en el uso de los reactivos y rápidamente adaptado a las mediciones cualitativas y cuantitativas. Puede ser aplicado a



**Figura 1.** Se enfrentan antígenos y anticuerpos colocándolos en hoyos o pozos circulares adyacentes hechos en la agarosa para que formen líneas de precipitación entre ellos. Tomado de: <http://mesa54dinmuno.blogspot.mx/2009/05/tecnicas-inmunologicas.html>.

**Figure 1.** Antigens and antibodies confront each other when placing them in circular adjacent holes or wells made in the agarose so they form precipitation lines between them. Taken from: <http://mesa54dinmuno.blogspot.mx/2009/05/tecnicas-inmunologicas.html>.

The serological detection methods of precipitation in liquid media were used for approximately 20 years and progressively replaced by enzyme-linked immunosorbent assays, or ELISA. Clark and Adams (1977) showed that the ELISA method could be effectively applied to the detection of plant viruses. From that moment to date, this method has been widely used. Many variants of the basic procedure have been developed in an attempt to optimize the test for particular purposes.

The method is very cost-effective in the use of the reagents, and quickly adapted to qualitative and quantitative measurements. It can be applied



virus de varios tipos de morfología y de preparaciones purificadas o de extractos crudos (Figura 2). Es muy sensible, pudiendo detectar concentraciones de 1 – 10 ng/ml. Los métodos aplicables de ELISA más comunes son: ELISA en placa; ELISA en membrana (immunobloting) empleando ya sea antisueros policlonales o monoclonales; inmunoadsorción-microscopía electrónica (ISEM por sus siglas en inglés) e inmunocromatografía o tiras reactivas (Immunochromatographic or Strip Tests) (Hull, R 2014).

to viruses of several types of morphologies and purified preparations or raw extracts (Figure 2). It is very sensitive, since it can detect concentrations of 1 – 10 ng/ml. The most common applicable methods of ELISA are: ELISA on plates; ELISA on membranes (immunobloting), using polyclonal or monoclonal antisera; Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM) and immunochromatographic or Strip Tests (Hull, R 2014).

The most commonly used Plate ELISA types in plant pathology are: double antibody sandwich



**Figura 2.** Chile jalapeño afectado por la sinergia del Cucumber mosaic virus (CMV) y del Tobacco etch virus (TEV), detectados por la técnica de ELISA en placa, en un barrido (screening) para los 13 virus más comunes utilizando el macerado de la planta infectada.

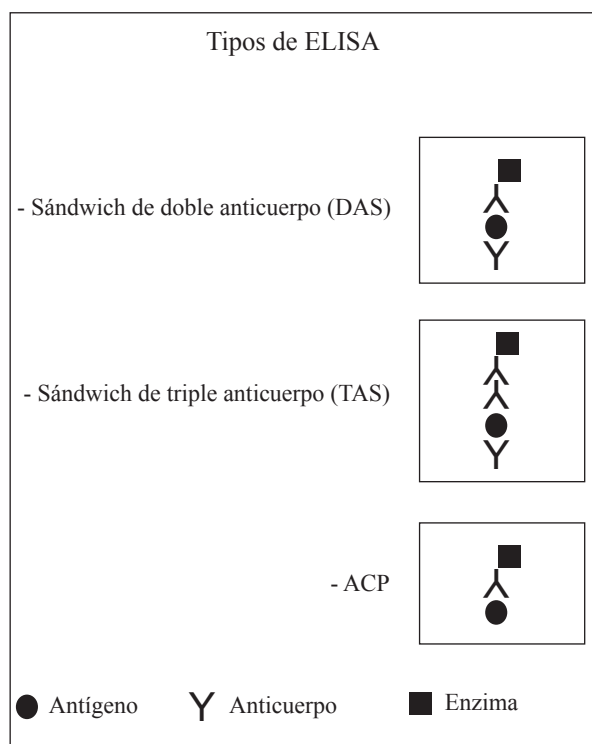
**Figure 2.** Jalapeño peppers affected by the synergy of the Cucumber mosaic virus (CMV) and the Tobacco etch virus (TEV), detected by the plate ELISA technique, in a screening for the 13 most common viruses using the macerate of the infected plant.

Los tipos de ELISA en placa de uso más común en patología vegetal son: ELISA de sándwich de doble anticuerpo (DAS.- double antibody sándwich), ELISA de sándwich de triple anticuerpo (TAS.-Triple antibody sándwich) y ELISA de placa sensibilizada con antígeno (ACP.- antigen coated plate) (Figura 3).

Los métodos de ELISA en membrana en sus formas más comunes, inmuno-gota (immuno dot) e inmuno-impresión (immuno printing), es la impresión en una membrana de nitrocelulosa o nylon de una microgota (aplicada en microlitros) de un macerado vegetal o la impresión de un corte de una hoja, pecíolo, tallo u otro tejido vegetal, directamente sobre la membrana respectivamente. En los métodos de ELISA en placa, el desarrollo del color se realiza con un sustrato soluble y en la ELISA en membrana, se sustituye por un sustrato precipitante que es insoluble y que se adhiere a la membrana y su lectura se realiza a simple vista o con un densitómetro de reflectancia.

La impresión directa del tejido en la membrana (inmuno-impresión) tiene varias ventajas: 1).- da una información detallada de la distribución del virus en el tejido; 2).- no es requerido el macerado de tejidos y por ende, no se diluyen los virus restringidos a ciertos tejidos, con el aumento lógico de su sensibilidad; 3).- la técnica es perfectamente aplicada a muestras de campo y la inmuno-impresión puede realizarse directamente en el campo, sin necesidad de llevar la colecta de muestras al laboratorio. En la ELISA de inmuno-adsorción-microscopía electrónica (ISEM por sus siglas en inglés), aumenta significativamente la sensibilidad de la detección del virus bajo microscopio electrónico.

La inmunocromatografía o tira reactiva, es la prueba rápida más utilizada en la actualidad para la detección de innumerables patógenos vegetales y es producido por la mayoría si no es que todos de los proveedores internacionales de kits de diagnóstico. Existen inmunotiras para detectar decenas de



**Figura 3. Representación esquemática de los tipos de ELISA más usados en fitopatología.**

**Figure 3. Schematic representation of the most commonly used types of ELISA in plant pathology.**

ELISA (DAS), Triple antibody sandwich ELISA (TAS), and antigen coated plate ELISA (ACP) (Figure 3).

The ELISA methods on membranes in its most common methods, immuno dot and immuno printing, is printing on a nitrocellulose or nylon membrane of one microdrop (applied in microliters) of a plant extract or the print of a cut of a leaf, petiole, stem, or other plant tissue, directly on the membrane, respectively. In the ELISA methods on plates, the color is developed with a soluble substrate, and on the ELISA on membranes, it is replaced by a precipitant substrate that is insoluble and adheres to the membrane and it is read with the naked eye using a reflectance densitometer.



patógenos vegetales que son utilizadas directamente por los agricultores en pruebas rápidas de campo, cuyos resultados se obtienen en minutos de realizada la prueba (Figura 4). La serología sigue siendo en la actualidad, a través de los diversos tipos de ELISA, los métodos de diagnóstico más utilizados para la detección de virosis en humanos, animales y vegetales.

Aunque los métodos serológicos son los más utilizados en diagnóstico de virus, tienen ciertas desventajas. Son basados en las propiedades antigénicas de la cubierta proteica de los virus, la cual re-

The direct printing of the tissue on the membrane (immuno printing) has several advantages: 1).- it provides detailed information of the distribution of the virus in the tissue; 2).- there is no need to macerate tissues, and therefore, the viruses restricted to certain tissues do not dilute, with the logical increase in sensitivity; 3).- the technique is perfectly applied to field samples and immuno-printing can be carried out on the field, without the need of taking the samples to the laboratory. In the Immunosorbent Electron Microscopy ELISA (ISEM), the sensitivity of the detection of



**Figura 4. Begonia afectada por el Impatiens necrotic spot virus (INSV) detectado por la prueba de campo de ELISA- inmunocromatografía, en 5 minutos de exposición de la tira reactiva a la sabia infectada.**

**Figure 4. Begonia affected by the Impatiens necrotic spot virus (INSV) detected using the ELISA field test - immunochromatography, in 5 minutes of exposure of the reactive strip to the infected sap.**

presenta aproximadamente solo el 10% del genoma total del virus (Gould and Symons 1983) y no toma en cuenta el resto del genoma viral. Los métodos basados en la detección de los ácidos nucleicos, tienen la ventaja de que pueden ser dirigidos a cualquier región del genoma viral para ser usado en la técnica de diagnóstico. Además, hay situaciones en que los métodos inmunológicos tienen aplicación limitada, en particular para la detección de viroides, ARNs satélites, virus que carecen de cápside (por ejemplo: Groundnut rosette virus (GRV) género *Umbravirus* (<http://viralzone.expasy.org/645>), the NM-form of tobacco rattle virus), virus que tienen serotipos extremadamente diversos (ejemplo: Indian y African Peanut clump virus y Tobacco rattle virus) y virus que son pobres inmunógenos o que son difíciles de purificar.

### **Detección mediante métodos moleculares**

La detección de virus mediante métodos moleculares puede ser usada cuando existe conocimiento de cuando menos de parte de la secuencia del genoma del virus (Joo jin J 2014).

### **Hibridación de ácidos nucleicos**

Se usa principalmente con dos propósitos, para determinar el grado de relación de dos secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, de dos virus y para la detección de virus u otros patógenos. Las diagnósticos de virus por hibridación de ácidos nucleicos, se lleva a cabo inmovilizando el ácido nucleico prueba, en membranas de nitrocelulosa o nylon.

El ensayo de hibridación por puntos (dot) o manchas (spot) es una técnica comúnmente utilizada en la detección de virus vegetales (Owens y Dinner 1984), el proceso implica la hibridación sólido-líquido, donde: a).- el ácido nucleico prueba (el ácido nucleico viral de la muestra) es colocado e inmovilizado sobre una membrana de nitroce-

the virus increases significantly under an electron microscope.

Immunochromatography, or reactive strip, is the quickest test currently used to detect countless plant pathogens, and it is produced by most, if not all, international diagnosis kit suppliers. There are ImmunoStrips to detect dozens of plant pathogens that are used directly by farmers in quick field tests, the results of which are obtained mere minutes after the tests have been performed (Figure 4). Serology is still being used to date through different types of ELISA, the most commonly used diagnosis methods for the detection of virosis in humans, animals, and plants.

Although serological methods are the most commonly used in viral diagnoses, they have certain disadvantages. They are based on the antigenic properties of the protein covers of the viruses, which accounts for only approximately 10% of the total genome of the virus (Gould and Symons 1983) and does not take the rest of the viral genome into account. The methods based on the detection of the nucleic acids have the advantage of being able to be directed to any region of the viral genome to be used in the diagnosis technique. Likewise, there are situations in which the immunological methods have a limited application, particularly for the detection of viroids, satellite RNAs, viruses that lack capsids (for example: Groundnut rosette virus (GRV) genus *Umbravirus* (<http://viralzone.expasy.org/645>), the NM-form of tobacco rattle virus), viruses with extremely diverse serotypes (for example, Indian and African Peanut clump virus and Tobacco rattle virus), and viruses that are poor immunogens, or that are difficult to purify.

### **Detection by molecular methods**

The detection of viruses by molecular methods can be used when there is knowledge of at least a part of the virus genome sequence (Joo jin J 2014).

lulosa o de nylon positivamente cargada, b).- Los sitios libres de unión de la membrana son posteriormente bloqueados con un DNA no homólogo (generalmente esperma de salmón o DNA del timo de becerro) o con proteína (generalmente albumina bovina, albumina de huevo o caseína de leche), c).- permitir que la hibridación se lleve a cabo entre la unión del ácido nucleico viral y la sonda, la cual está libre en la solución de hibridación, d).- el exceso de sonda que no hibridó es removida mediante serie de lavados con determinada astringencia, e).- la secuencia prueba es detectada por la molécula reportera usada en la sonda hibridada.

Las sondas radioactivas usando como reportero al  $^{32}\text{P}$  están prácticamente en desuso por la vida tan corta y lo peligroso del  $^{32}\text{P}$  radioactivo y han sido reemplazadas por sondas no radioactivas y de ellas la que más se usa en virología es el sistema Dioxigenina (DIG)/antiDIG. En este sistema la membrana es expuesta post-hibridación a anticuerpos antiDIG unidos a la enzima fosfatasa alcalina o peroxidasa. La señal es producida al agregar el sustrato adecuado que resulta en un producto cromógeno precipitado.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1986 el Dr. Kary Mullis desarrolló la PCR, técnica de Biología Molecular que amplifica un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de la ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean cuatro pasos: a).- desnaturalización a alta temperatura (normalmente entre 94 ó 95 °C) para separar las hebras del ADN; b).- anillado de los dos primers a su secuencia complementaria en sus dos hebras de ADN y cuya temperatura depende del tamaño y composición nucleotídica del primer; c).- la extensión del

### Hybridization of nucleic acids

This is used mainly with two purposes: to determine the relationship degree between two sequences of nucleic acids, for example, to viruses, and for the detection of viruses or other pathogens. The diagnoses of viruses by the hybridization of nucleic acids are carried out by immobilizing the test nucleic acid in membranes of nitrocellulose or nylon.

The dot or spot hybridization test is a commonly used technique in the detection of plant viruses (Owens and Dinner 1984). The process implies the solid-liquid hybridization, where: a).- the test nucleic acid (the viral nucleic acid of the sample) is placed and immobilized on a positively charged nitrocellulose or nylon membrane, b).- the union-free sites of the membrane are then blocked with a non-homologous DNA (generally salmon sperm or DNA from a calf thymus) or with protein (generally bovine albumin, egg albumin or milk casein), c).- allow the hybridization to take place between the union of the viral nucleic acid and the probe, which is free in the hybridization solution, d).- the excess probe which it did not hybridize is removed by a series of washings with a particular astringence, e).- the test sequence is detected by the reporting molecule used in the hybridized probe.

The radioactive probes that use  $^{32}\text{P}$  as a reporter are practically discontinued due to the short life and the danger of radioactive  $^{32}\text{P}$ , and have been replaced by non-radioactive probes, the most widely used of which, in virology, is the Dioxigenin (DIG)/antiDIG system. In this system, the membrane is exposed, post-hybridization, to antiDIG antibodies joined to the enzyme alkaline phosphatase or peroxidase. The signal is produced when adding the adequate substrate the results in a precipitated chromogenic product.



primer para formar la cadena complementaria por la ADN polimerasa, normalmente a 72 °C y d).- la extensión final durante 5 ó 10 minutos con la misma temperatura (Naidu y Huges, 2001). En cada ciclo las nuevas hebras de ADN sirven de plantilla para los nuevos ciclos por lo que repitiendo los primeros tres pasos 30 ó 40 veces en un termociclador automático, la cantidad de nuevas hebras de ADN amplificadas suman millones y pueden ser analizadas en un gel de agarosa tiñendo el ADN con bromuro de etidio que revela la amplificación realizada, a ésta técnica se le llama PCR de punto final. La velocidad, la especificidad, la versatilidad de la técnica de la PCR la hicieron la más adecuada y la más utilizada en muchas áreas de la Biología Molecular y la más atractiva en el diagnóstico de las enfermedades virales de los vegetales (Rodríguez y Barrera 2004) (Figura 5).

Para aumentar la sensibilidad de la PCR, se usa la PCR Anidada, conocida también como Nested PCR, en ella se usan dos rondas de amplificación con distintos pares de primers en cada una, primero se realiza una amplificación con los primers externos y con el producto de esa amplificación se realiza otra amplificación utilizando primers internos, aumentando así la sensibilidad de la técnica. Ésta técnica se usa cuando la concentración del virus u otro patógeno es muy baja y es muy usada para detectar Fitoplasmas.

La PCR multiplex es otra variante de la PCR tradicional (punto final), mediante la cual se pueden detectar 2 ó más virus o 2 ó más distintos fragmentos de ADN blanco en la misma reacción. La amplificación se realiza utilizando 2 ó más pares de primers y aumentando proporcionalmente los reactivos de la reacción, ahorrando tiempo en la detección múltiple de patógenos.

En caso de que los virus a detectar sean de genoma de ARN, la PCR tiene un paso previo, se tiene que retrotranscribir la hebra de ARN, en ADN

### **Polymerase chain reaction (PCR)**

In 1986, Dr. Kary Mullis developed PCR, a molecular biology that amplifies a large number of copies of a particular DNA fragment. This technique is based on the natural property of DNA polymerases to replicate DNA, which requires four steps: a).- denaturalization at a high temperature (normally between 94 and 95°C) to separate the DNA strands; b).- annealing of the first two primers to their complementary sequence in their two DNA strands, the temperature of which depends on the size and the nucleotide composition of the primer; c).- the extension of the primer to form de complementary chain by the polymerase DNA, normally at 72 °C, and d).- the final extension for 5 or 10 minutes with the same temperature (Naidu and Huges, 2001). In each cycle, the new DNA strands act as a template for the new cycles, and therefore repeating the first three steps 30 or 40 times in an automatic thermocycler, the amount of new amplified DNA strands add up to millions and can be analyzed in an agarose gel, staining the DNA with ethidium bromide, which reveals the amplification performed; this technique is called end-point PCR. The speed, specificity, and the versatility of PCR made it more adequate and the most widely used in many areas of molecular biology and the most attractive in the diagnosis of viral diseases in plants (Rodríguez and Barrera 2004) (Figure 5).

Nested PCR is used to increase the sensitivity of the PCR. Here, two amplification rounds are used with different pairs of primers in each. First, an amplification is carried out with the external primers and another amplification is carried out with the product of that amplification, using internal primers, therefore increasing the sensitivity of the technique. This technique is used when the concentration of the virus or another pathogen is



**Figura 5. Hoja de planta de melón afectado por un Begomovirus detectado mediante la técnica de PCR punto final, usando primers específicos para el género Begomovirus.**

**Figure 5. Leaf of melon plant affected by Begomovirus detected by the end-point PCR technique, using primers specific for the genus Begomovirus.**

complementario, mediante la utilización de una enzima llamada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Una vez transcrito en ADN complementario, se realiza una PCR convencional para su amplificación y se conoce como RT-PCR.

La técnica de la PCR, ha evolucionado también para evitar el uso del gel de agarosa como la del punto final. La técnica del PCR Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés) combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados. Desde el año 1966, Le Pecq y Paoletti reportaron que el bromuro de etidio

very low, and it is very commonly used to detect Phytoplasmas.

The multiplex PCR is another variation of the traditional end-point PCR, which can be used to detect 2 or more viruses or 2 or more different fragments of white DNA in the same reaction. The amplification is carried using 2 or more pairs of primers and increasing the reagents of the reaction proportionally, saving time in the detection of multiple pathogens.

If the viruses to be detected belong to an RNA genome, PCR has a previous step. The RNA strand must be retrotranscribed in complementary DNA with an enzyme called retrotranscriptase

(EtBr) intercalante del ADN de doble cadena fluoresce bajo la luz UV. Esta propiedad fue aprovechada para grabar la acumulación de ADN utilizando una videocámara. Esta sencilla reacción combinada con la videografía permitió el nacimiento del PCR en tiempo real, el cual combina la enorme sensibilidad de la técnica de PCR con la precisión que asegura el monitoreo *in situ* de los productos generados por esta reacción a través del tiempo. La qPCR puede utilizar fluoróforos generales o no específicos de unión al ADN, como el Bromuro de Etidio o el SYBR Green I, el reportero más usado es el SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que cuando está en solución, no emite fluorescencia, sin embargo cuando se une al surco menor del ADN su fluorescencia aumenta 1000 veces, o métodos de fluorescencia específicos parten de principios diferentes de los no específicos y tienen en común que la señal fluorescente es emitida solo al detectar los productos amplificados (Temay *et al.*, 2013). Los métodos específicos siguen el principio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia de diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando éste par de moléculas se separa la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector. (Rodríguez, M. y William, R. 2006.; Estefanía *et al.*, 2015).

La PCR digital (dPCR), a diferencia de la PCR tiempo real (qPCR) no necesita estándares de referencia o curvas de calibración para la cuantificación de ácidos nucleicos, sino directamente produce una cuantificación precisa de ácidos nucleicos. En la dPCR, la muestra de PCR es dividida en miles de

or reverse transcriptase. Once transcribed in the complementary DNA, a conventional PCR is carried out for its amplification, and it is known as RT-PCR.

The PCR technique has also evolved to avoid the use of agarose gel, like the end-point. The Real Time PCR or quantitative PCR (qPCR) combines the steps of DNA amplification in a single trial and avoids having to prepare electrophoresis gels to detect the amplified products. In 1966, Le Pecq and Paoletti reported that ethidium bromide (EtBr) intercalante of the double chain DNA fluoresces under UV light. This property was used to record the accumulation of DNA using a videocamera. This simple reaction, combined with the video taken, allowed the real-time birth of PCR, which combines the enormous sensitivity of the PCR technique with the precision that ensures the “*in situ*” monitoring of the products generated by this reaction in time. The qPCR technique can use general fluorophores or unspecific for the union of DNA, such as ethidium bromide or SYBR Green I, the latter of which is the most widely used reporter, a positively charged molecule that, when in solution, does not fluoresce. However, when it joins the minor groove of the DNA, its fluorescence increases 1000 times. The specific fluorescence methods start from different principles to the unspecific ones, and they have in common that the fluorescent signal is only emitted when detecting the amplified products (Temay *et al.*, 2013). The specific methods follow the FRET (Fluorescence Resonance Energy transfer) principle, which consists of the transfer of energy between two fluorophores: a donor (reporter) and an acceptor (quencher), which emit fluorescences with different wavelengths. When the reporter and the quencher are near, the quencher absorbs all the fluorescence of the reporter. When this pair of molecules separates, the fluorescence of the reporter cannot be absorbed by the quencher, and could

nanogotas y después de la amplificación, las gotas que contienen la secuencia del ADN blanco, se detectan por fluorescencia como positivas y las que no fluorescen como negativas. El análisis estadístico de Poisson del número de nanogotas positivas nos da una cuantificación exacta del ADN blanco, esto permite cuantificar la carga viral u otro patógeno o de otro ADN blanco cualquiera de una muestra (Biorad. Introduction to Digital PCR. Tomado de: <http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/introduction-digital-pcr>). La desventaja de las técnicas de la PCR mencionadas, es que todas requieren de un termociclador y un laboratorio bien equipado y de personal especializado para realizar los diagnósticos.

La Amplificación de ADN Isotérmica es una metodología que se lleva a cabo a temperatura constante por lo que a diferencia de la PCR convencional no necesita del uso de un termociclador, ni de laboratorios muy equipados. Se han usado varias estrategias moleculares para lograr dicha amplificación, las enumero por su nombre en español, el originales en inglés con su acrónimo: Amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), Amplificación por desplazamiento de hebras (strand-displacement amplification, SDA), Amplificación dependiente de la Helicasa (Helicase-dependent amplification, HDA), Amplificación del círculo rodante (Rolling-circle amplification, RCA), Amplificación de secuencias de ácido nucleico (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) y Amplificación de polimerasa recombinante (Recombinase polymerase amplification, RPA). Varias empresas de diferentes países están produciendo kits de diagnóstico comerciales para detección de fitopatógenos con una u otra de estas tecnologías, así, TwistDx, [www.twistdx.co.uk](http://www.twistdx.co.uk) y Agdia, Inc. [www.agdia.com](http://www.agdia.com) usa la tecnología RPA; Ac Diagnostics, Inc. [www.acdiainc.com](http://www.acdiainc.com) usa la tecnología NASBA; Diageneticx,

consequently be detected by the photodetector. (Rodríguez, M. and William, R. 2006.; Estefanía *et al.*, 2015).

Digital PCR (dPCR), unlike real time PCR (qPCR) requires no reference standards or calibration curves for the quantification of nucleic acids, but rather produces an accurate quantification of nucleic acids. In dPCR, the PCR sample is divided into thousands of nanodrops and after amplification, the drops that contain the sequence of the target DNA are detected by fluorescence as positive, and those without fluorescence, as negative. The Poisson statistical analysis of the number of nanodrops gives an exact count of the target DNA, and this helps count the charge of viruses or another pathogen or of any other white DNA in a sample (Biorad. Introduction to Digital PCR. Taken from <http://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/introduction-digital-pcr>). The disadvantage of the PCR techniques mentioned is that they all require a thermocycler and a well-equipped lab, as well as staff trained to carry out a diagnosis.

Isothermal DNA amplification is a methodology that is carried out at a constant temperature, and therefore, unlike conventional PCR does not require the use of a thermocycler or highly-equipped labs. Several molecular strategies have been used to achieve this amplification. The following is a list of their names and their acronyms: Loop-mediated isothermal amplification, LAMP; Strand-displacement amplification, SDA; Helicase-dependent amplification, HDA; Rolling-circle amplification, RCA; Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA; and Recombinase polymerase amplification, RPA. Several companies from different countries are producing commercial diagnosis kits for the detection of phytopathogens with one or another of these technologies. Thus TwistDx, [www.twistdx.co.uk](http://www.twistdx.co.uk), and Agdia,



Inc. [www.bloomberg.com](http://www.bloomberg.com) usa la tecnología LAMP, por mencionar algunas. Todas éstas metodologías tienen ventajas y desventajas, según la recopilación realizada por Zaghloul, H y El-shahat, M (2014), la única de éstas técnicas que solo tiene ventajas es la RPA.

### **Next-generation (high throughput) sequencing (NGS) Segunda generación de secuenciadores**

Es una tecnología que se ha desarrollado en los últimos años y está visualizada para ser un parte-aguas en la Biología Molecular en todas sus ramas, su importancia estriba en que ha bajado significativamente el costo y el tiempo con respecto a la secuenciación tradicional Sanger. Las cuatro principales plataformas modernas que hay de NGS; Illumina (Solexa) sequencing; Roche 454 sequencing; Ion torrent: Proton / PGM sequencing y SOLiD sequencing, producen grandes cantidades de lecturas (millones a miles de millones) de secuencias cortas de 25 a 400 pb, aunque recientemente ya hay plataformas que leen hasta 700 pb.

Como se puede observar en la Figura 6, el costo por secuenciar una megabase del año 2001 al 2013 fue reducido dramáticamente. Durante éste período fue usado la primera generación de secuenciadores del 2001 al 2007 y la segunda generación de secuenciadores del 2008 al 2013. El costo por megabase secuenciada fue reducido de \$8000 (dólares americanos) en el 2001 a \$700 para el 2007 y después a \$0.10 en el 2013 (Figura 6 A). Similarmente, el costo por genoma de ADN secuenciado fue de \$100, 000,000 (dólares americanos) en el 2001 a \$10, 000,000 en el 2007 y a 8,000 en el 2013 (Figura 6 B).

Esta nueva tecnología ha traído consigo también una nueva terminología, como la “Metagenómica” definida como la aplicación de las nuevas tecnologías genómicas para el estudio de comunidades

Inc. [www.agdia.com](http://www.agdia.com) use RPA technology; Ac Diagnostics, Inc. [www.acdiainc.com](http://www.acdiainc.com) uses NASBA technology; Diageneticx, Inc. [www.bloomberg.com](http://www.bloomberg.com) use LAMP technology, to mention a few. All these methodologies have advantages and disadvantages, according to the compilation made by Zaghloul, H and El-shahat, M (2014); the only one of these technologies that only has advantages is RPA.

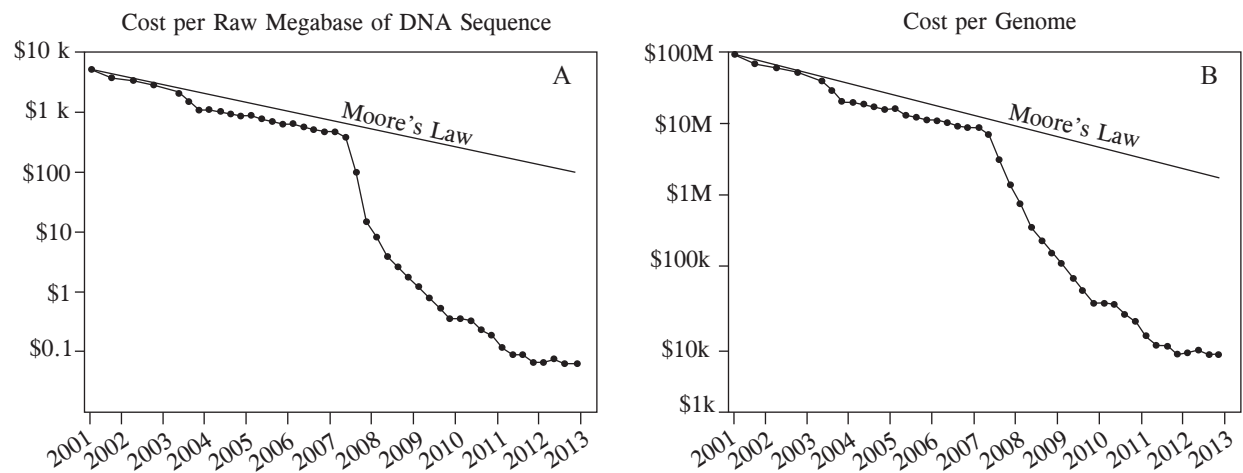
### **Next-generation (high throughput) sequencing (NGS)**

This technology was created in the past few years and was visualized as a groundbreaker in molecular biology in all its branches; its importance lies in that it has significantly reduced costs and time in comparison to Sanger traditional sequencing. The four main modern platforms that currently exist [Illumina Solexa] sequencing; Roche 454 sequencing; Ion torrent: Proton / PGM sequencing and SOLiD sequencing) produce large amounts of readings (between millions and billions) of short sequences, from 25 to 400 pb, although nowadays, there are platforms that read up to 700 pb.

As Figure 6 shows, the cost of sequencing a megabase between the years 2001 and 2013 was dramatically reduced. During this period, the first generation of sequencers was used from 2001 to 2007, and the second generation, from 2008 to 2013. The cost per sequenced megabase dropped from USD\$8000 in 2001 to \$700 for 2007, and later, to \$0.10 in 2013 (Figure 6 A). Similarly, the cost per sequenced DNA genome was USD \$100, 000,000 in 2001 to \$10, 000,000 in 2007 and to 8,000 in 2013 (Figure 6 B).

This new technology came hand-in-hand with a new terminology, such as “Metagenomics,” defined as the application of new genomic technologies for the study of communities of microorganisms





**Figura 6.** Costo en dólares americanos por megabase de ADN secuenciado (A) y costo por genoma (B) de julio de 2001 a julio del 2013 estimado por el National Human Genome Research Institute, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Durante este período la primera generación de secuenciador fue usado (Sanger) del 2001 al 2007, después las plataformas de NGS fueron usadas del 2007 al 2013 (Marina *et al.*, 2014).

**Figure 6.** Cost in US dollars per megabase of DNA sequencing (A) and cost per genome (B) from July, 2001 to July 2013, estimated by the National Human Genome Research Institute, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. In this period, the first generation of sequencers was used (Sanger) from 2001 to 2007, after the NGS platforms were used between 2007 and 2013 (Marina *et al.*, 2014).

de microorganismos directamente en su ambiente natural, sin tener que ser aislados y cultivados en el laboratorio. “Secuenciado de transcriptomas” que incluye la secuenciación y análisis de todos los mRNA completos y los microARN.

La NGS combinada con una bioinformática sofisticada ha cambiado el campo de la virología vegetal principalmente en las áreas de secuenciación de genomas, ecología, descubrimiento, epidemiología, transcriptomas, replicación, detección e identificación. “Viroma” se refiere a describir la carga viral (virus y viroides) que infectan a un organismo, vegetal o animal incluyendo a vectores. Muchos nuevos virus y viroides han sido identificados usando la tecnología de NGS ya sea en forma directa secuenciando sus genomas o incluso en forma indirecta, ensamblando los pequeños fragmentos de ARNs que se producen como respuesta a las infecciones causadas por los virus y los viroides (Marina *et al.*, 2014).

directly in their natural habitat, without having to isolate and cultivate them in the lab; or the “Sequencing of transcriptomes,” that includes the sequencing and analysis of all the complete mRNA’s and microRNA’s.

The NGS, combined with sophisticated bioinformatics, has changes the field of plant virology, mainly in the areas of genome sequencing, ecology, discoveries, epidemiology, transcriptomes, replication, detection, and identification. “Virome” refers to the viral load (viruses and viroids) that infect an organism, plant or animal, including vectors. Many new viruses and viroids have been identified using NGS technology, whether directly, sequencing their genomes, or even indirectly, assembling the small fragments of siRNA produced as a response to the infections caused by viruses and viroids (Marina *et al.*, 2014).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Brakke MK. 1951. Density gradient centrifugation: A new separation technique. *Journal of the American Chemical Society*. 73:1847-8. <https://doi.org/10.1021/ja01148a508>
- Brakke M K, 1953. Zonal separations by density-gradient centrifugation. *Arch Biochem Biophys* 45:275– 90. Tomado de: Hull R, 2014. *Matthew's Plant Virology*. Academic press, London. 778 p. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(53\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(53)80005-6)
- Barba M, Czosnek H and Hadidi A. 2014. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*. 2014 Jan; 6(1): 106-136. <https://doi.org/10.3390/v6010106>
- Clark MF and Adams AN. 1977. Characteristic of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34:475-483. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>
- Estefanía C, Bayron J y Barreto A. 2015. PCR en tiempo Real. *Biología Molecular-Camilo Herrera*. Universidad de las Américas. Disponible en línea: <https://es.slideshare.net/Alejatoxik/pcr-en-tiempo-real-55369307>
- Gergerich RC and Dolja V. 2006. Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2006-0414-01>
- Gould AR and Symons RH. 1883. A molecular biological approach to relationship among viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 21: 179-99. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.21.090183.001143>
- Höltke HJ, Ankenbauer W, Mühlegger K, Rein R, Sagner G, Seibl R and Walter, T. 1995. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. Nov;41(7):883-905. Tomado de: Henson JM and French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.000501>
- Hull R. 2014. *Matthew's Plant Virology*. Elsevier, Academic Press. 1001 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384871-0.00023-6>
- Joo-jin J, Ho-jong J and Jaejong N. 2014. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease*. 20:173-181. <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173>
- Kelaniyangoda DB and Madhubashini LWM. 2008. Indicator plants: Tools for Detecting Papaya Ring Spot Potyvirus and Cucumber Mosaic Cucumovirus. *Journal of Food and Agriculture*. Vol.1(2) pp.64-69. <http://doi.org/10.4038/jfa.v1i2.1800>
- Kleczkowski A. 1965. A study of the effects of salt and pH on precipitation of antigen-antibody compounds, *Immunology* 8: 170-181 Tomado de: Matthews 1970. *Plant Virology*. Academic press, London. 778 p. <http://doi.org/10.4038/jfa.v1i2.1800>
- Lister RM. 1966. Possible relationship of virus specific products of tobacco rattle virus infection. *Virology*. 28: 350-353. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90161-9)
- Lister RM. 1968. Functional relationship between virus-specific products of infection by viruses of the tobacco rattle type. *Journal of General Virology*. 2: 43-58. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-2-1-43>
- Naidu RA and Hughes JdA. 2001. Methods for the detection of plant virus diseases. *Plant Virology in Sub-Saharan Africa*. En: Kumlachev A. 2015. *Detection of Diseases, Identification and Diversity of Viruses: A Review*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. Vol.5, No.1. Disponible en línea: <http://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/19521>. DOI: 10.1007/978-81-322-0813-6
- Outcherlony O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progr. Allergy*. En: Matthews 1970. *Plant Virology*. Academic press, London. 778 p. <https://doi.org/10.1159/000313795>
- Owens RA and Diener TO. 1984. Spot hybridization for the detection of viroids and viruses. Pages 173–189. In: *Methods in Virology Vol. VII*, edited by K. Maramorosch and H. Koprowski. Academic Press, New York, USA. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-470207-3.50012-7>
- Piepenburg O, Williams, CH, Stemple DL and Armes NA. 2006. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol* 4(7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- Purdy HA. 1928. Immunologic reactions with tobacco mosaic virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and IVied., XXV*, 702-703. En: Scholthof, K-B. G. 2008. *Tobacco Mosaic Virus: The Beginning of Plant Pathology*. Online. APSnet Features. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeatures-2008-0408>
- Rodríguez IPS y Barrera HAS. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL/Vol VII No.3*: 323-35. Disponible en línea: [http://eprints.uanl.mx/1584/1/art\\_cadena.pdf](http://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf)
- Rodríguez M y William R. 2006. PCR en Tiempo Real. Métodos químicos-físicos en Biotecnología. IBT-UNAM. 55p. Disponible en línea: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime\\_pcr.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf)
- Roistacher CN. 1991. *Graft-transmissible Diseases of Citrus*. Handbook for detection and diagnosis. IOC, Riverside and FAO, Rome. 286 pp. Disponible en línea: [https://archive.org/details/bub\\_gb\\_9zYlUfGchAgC](https://archive.org/details/bub_gb_9zYlUfGchAgC)
- Salazar Luis 1995. *Los virus de la papa y su control*. CIP. Perú. 226 p. disponible en línea: <https://books.google.com.mx>
- Tammy DL, Ibarra C y Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. Vol. 2, Num 2: 70-78. Disponible en línea: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invidis/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tomlinson JA and Walkey DGA. 1967. Effects of ultrasonic treatment on Turnip Mosaic Virus and Potato Virus X. *Virology*. 32: 267-278. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90276-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90276-0)
- Welkin EJ (tomado de: Scott C. Weaver, Mark Denison, Marilyn Roossinck and Marco Vignuzzi). 2016. *Virus Evolution: Current Research and Future Directions*. Caister Academic Press. 366 p. <https://doi.org/10.21775/9781910190234>
- Zaghloul H and El-shahat M. (2014). Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis. *World Journal of Hepatology*. 6(12): 916-922. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i12.916>