



**Dirección General de Sanidad
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria**

Protocolo de Diagnóstico

Potato Virus Y (PVY^N y PVY^{NTN})

(ELISA y RT-PCR)

Versión 00

Junio 2014

INDICE

	Pág.
I. Antecedentes	4
1.- Posición taxonómica	
2.- Objetivo	
3.- Origen y distribución	
II. Rango de Hospedantes	4
III. Síntomas y signos	4
IV. Transmisión y vector	5
V. Importancia	6
VI. Protocolo de Diagnóstico	6
1.- Envío-recepción	
2.- Recepción e inspección	
3.- Almacenamiento	
4.- Técnicas de detección	
5.- Destrucción de las muestras	
VII. Referencias	15

I. ANTECEDENTES

Nombre: Potato Virus Y

Nombre Común: Virus Y de la patata, mosaico severo de la papa

1.- Posición Taxonómica:

Dominio: Virus

Familia: Potyviridae

Género: *Potyvirus*

2.- Objetivo:

Describir los procedimientos o metodologías aplicados a la identificación morfológica de *PVY^N* y *PVY^{NTN}* y su corroboración mediante técnicas moleculares.

3.- Origen y distribución

El Potato virus Y (PVY), es el miembro tipo del género Potyvirus, uno de los seis géneros de la familia Potyviridae, es el grupo de virus de plantas más grande y económicamente más importante (Rosner and Maslenin 1999).

El virus *PVY^N* tiene amplia distribución, se ha reportado en países europeos, Nueva Zelanda, y algunas regiones de África y Sudamérica; mientras que Canadá y EUA, los cuales son los principales proveedores de semilla de papa para México, mantienen regiones cuarentenadas por la presencia de este virus (McDonald y Kristjanson, 1993; Salazar, 1995; Singh, 1992).

La variante *PVY^{NTN}* se ha reportado como la más agresiva y es causante de necrosis foliar y moteado, además de los síntomas visibles en el tubérculo en forma de anillos necróticos abultados en la superficie.



Fig. 1 Papa con daños causados por *PVY^{NTN}*
Fuente: Nigel Cattlin/Visuals Unlimited, Inc.

II. RANGO DE HOSPEDANTES

El PVY está presente en diversos cultivos de la familia Solanaceae (De Bokx and Huttinga, 198; citado por Tribodet, et al, 2005) Fabaceae y Chenopodiaceae (Hooker, 1981).

El virus Y de la papa (*Potato virus Y = PVY*) es de amplia distribución en las zonas productoras de papa del mundo. Se conocen tres variantes o grupos basados en sus características serológicas y síntomas producidos en papa y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.): *PVY^C*, *PVY⁰* y la variante inductora de necrosis sistémica de la nevadura *PVY^N*; de ésta última se ha reportado la variante necrótica del tubérculo o *PVY^{NTN}*.

III. SÍNTOMAS Y SIGNOS

PVY presenta diferentes aislamientos agrupados en tres variantes de acuerdo a sus propiedades biológicas, serológicas y moleculares:

- *PVY^N* (necrosis de la nevadura del tabaco)
- *PVY⁰* (variante común)
- *PVY^C* (línea punteada) (Romancer *et al.*, 1994).

De estas variantes, *PVY^N* y *PVY⁰* son los más comunes (Rosner and Maslenin 1999). La variante *PVY^N* frecuentemente es asintomático o produce mosaicos suaves a severos en papa, pero produce necrosis, mosaicos, moteados en follaje y muerte cuando infecta tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *Samsun*) y tomatillo (*Physalis floridana*). Sin embargo, *PVY^{NTN}* (variante del grupo de *PVY^N*) provoca severos daños al tubérculo. Se caracteriza por anillos superficiales que sobresalen de la superficie normal, que posteriormente se humedecen y necrosan, además puede causar mosaicos cloróticos severos en las hojas de papa (Beczner, *et al.*, 1984)



Fig. 2. Daños graduales en tubérculos de papa causados por PVY^N y PVY^{NTN}.
Fuente: www.ascenion.de, www.jki.bund.de

El genoma viral es monopartita, cuya molécula de RNA (5.4-6.4%) de cadena simple, de polaridad positiva es de aproximadamente 10 Kb de longitud. Tiene un contenido en proteínas que oscila entre 93.6-94.6%. Los viriones son filamentosos, normalmente flexuosos de 684 - 730 nm de longitud y 11- 12 nm de diámetro (Hooker, 1981).



Fig. 3. Comparación entre una hoja con presencia de PVY y una sana
Fuente: Southern IPM Center

IV. TRANSMISIÓN Y VECTOR

El PVY puede ser transmitido por al menos 25 especies de áfidos de manera no persistente. *Myzus persicae* es el vector más eficaz. Otros áfidos vectores de este virus son *Aphis craccivora*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus (Nectarosiphon) certus*, *Myzus (Phorodon) humuli* y *Rhopalosiphum insertum*.

La transmisión del PVY por pulgones, depende de la presencia en los extractos de la planta de un componente proteico de ayuda codificado por el virus. El tiempo óptimo de adquisición para que el pulgón sea infectivo es de 15 a 60 segundos. Generalmente los áfidos sólo transmiten al virus durante una hora después de haberlo adquirido, aunque existen casos de retención de más de 24 horas.

En algunos casos se ha comprobado que *M. persicae* puede retener al PVY durante más de seis días. Esta mayor persistencia del virus en el vector puede explicar su rápida dispersión.

La transmisión no persistente del virus por el áfido, se caracteriza por el poco tiempo durante el cual es infectivo el vector, el virus se pierde en las mudas del pulgón, no se transmite a la descendencia y se pierde al insertar el estilete en una planta nueva.

Dentro de la planta, el movimiento sigue el modelo general para los virus. En un primer momento infecta la parte donde se encuentra el punto de entrada, posteriormente se mueve célula a célula hasta llegar a los ápices, desde donde a través del sistema vascular se extiende a toda la planta.

El PVY puede también transmitirse mecánicamente a través de la maquinaria, herramientas, y por el daño que se les hace a las plantas mientras se camina a través del cultivo.

***Myzus persicae* Sulzer.**

(Insecta: Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae)

M. persicae pasa por cuatro instares hasta llegar a adulto: primer instar dura de 1 a 4 días, segundo instar de 1 a 3 días, tercer instar de 1.5 a 3 días, cuarto instar de 1.5 a 4 días y los adultos duran entre 12 a 15 días.

Se pueden encontrar formas aladas y formas ápteras. Por lo general las formas aladas se presentan como consecuencia de la competencia intra-específica por espacio y alimento; estas formas aladas aparecen a partir del tercer instar, cuando ya es posible ver rudimentos de los cojines alares en forma de hombros.

El adulto alado o áptero mide de 1.2 a 2.3 mm de largo. Las formas ápteras pueden presentar las coloraciones de gris, verde pálido, verde grisáceo, verde, rosa o rojo; en condiciones de clima frío poseen más pigmentación verde. Las formas aladas poseen un parche negro en la parte central del dorso, el abdomen es de color amarillento-verdoso; la cabeza y tórax de color negra o café. Las antenas son de mas o menos la longitud del cuerpo. El Abdomen casi siempre del mismo ancho del tórax hasta la base de los cornículos, la cabeza posee tubérculos antenales prominentes, cornículos hinchados en la parte media apical y cauda corta .(<http://www.ica.gov.co/publicaciones/plagas/crisantemo/crisendemica/22.htm>)



Fig. 4. *Myzus persicae* Sulzer.
Fuente: <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aa-insectos/myzus-persicae.htm>

V. IMPORTANCIA

Aunque el virus Y de la papa está presente en México, la variante PVY⁰ se considera de importancia económica. Las variantes PVY^C y PVY^N son de importancia cuarentenaria (Anónimo 3, 2003; Anónimo 4, 2008) y están reguladas por la Norma Oficial Mexicana NOM-012-FITO-1996 y NOM-025-FITO-2000 (Callejas, 2006).

Para México, la variante PVY^{NTN} (del grupo de PVY^N) es de importancia cuarentenaria, por los daños que ocasiona en el cultivo de la papa, afectando considerablemente la productividad y calidad del tubérculo.

VI. PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO

1.- Envío/Recepción de muestras

La muestra debe estar en buen estado, esto es, que no presente necrosis, que no esté deshidratada y que el tejido esté lo más fresco posible. Si la muestra se compone de más de una variedad o lote, será necesario que esto se señale en la hoja de remisión, además de que el material que corresponda a cada uno de éstos deberá venir bien identificado y separado.

A cada variedad o lote, se le hará un diagnóstico por separado.

2.- Recepción e inspección del material

Las muestras pueden ser de cultivos de la familia Solanaceae, tales como tomate, chile, berenjena, tabaco; así como de otras familias botánicas.

Las muestras que se reciben para diagnóstico, se anotan en la bitácora de registro de muestras del laboratorio de Virus Fitopatógenos con el número de control que acompaña a la muestra.

Posteriormente, para el caso de papa los tubérculos se mantienen en condiciones de oscuridad para favorecer la brotación de éstos, en caso de no presentar brotes. La muestra debe contener como mínimo 200 tubérculos de papa fresca para consumo y la industria y un mínimo de 400 tubérculos de semilla de papa por cada embarque de 20 ton.

De cada tubérculo se deben de tomar todos los brotes posibles (por poseer altas concentraciones del virus) y se pueden combinar en una muestra compuesta hasta 20 tubérculos para la prueba de ELISA y RT-PCR.

Los brotes deben ser por lo menos de 0.5 cm pero no deben medir más de 3.0 cm de longitud. Se colocan dentro de una bolsa de plástico, se toman como mínimo 0.2 gramos por tubérculo o por planta y se agrega solución de extracción (Ver preparación de soluciones) en proporción 1:10 para la prueba de ELISA.

Para el caso de la prueba de RT-PCR, se toma como mínimo 0.1 gramos de tejido por tubérculo o por planta y se congelan a -70°C previo a su procesamiento.

En caso de contar con hojas para el diagnóstico, las plantas no deben de estar etioladas y deben tener al menos 15 cm de longitud. Pueden someterse a pruebas las hojas producidas a partir de los tubérculos muestreados.

Se acepta la prueba de una hoja sencilla, completamente extendida de la región media del tallo de cada planta.

Se puede combinar el tejido de hasta 25 hojas en una muestra compuesta para la prueba de ELISA y RT-PCR (Tabla 1).

Las muestras que se reciben para diagnóstico, se registran en la bitácora con el número de control interno que acompaña a la muestra. Posteriormente, los tubérculos se mantienen en condiciones de oscuridad para favorecer la brotación de éstos, en caso de no presentar brotes. La muestra debe contener como mínimo 200 tubérculos de papa fresca para consumo y la industria y un mínimo de 400 tubérculos de semilla de papa por cada embarque de 20 ton.

De cada tubérculo se deben de tomar todos los brotes posibles y se pueden combinar en una muestra compuesta hasta 20 tubérculos para la prueba de ELISA y RT-PCR.

Los brotes deben ser por lo menos de 0.5 cm pero no deben medir más de 6.0 cm de longitud. Se colocan dentro de una bolsa de plástico, se toman 0.2 gramos y se agrega solución de extracción (Apéndice 1) en proporción 1:10 para la prueba de ELISA.

Para el caso de la prueba de RT-PCR, se toma 0.1 gramos de tejido y se congelan a -70°C en un ultracongelador con nitrógeno líquido previo a su procesamiento.

En caso de contar con hojas para el diagnóstico, las plantas no deben de estar etioladas y deben tener al menos 15 cm de longitud. Pueden someterse a pruebas las hojas producidas a partir de los tubérculos muestreados.

Se acepta la prueba de una hoja sencilla, completamente extendida de la región media del tallo de cada planta.

Se puede combinar el tejido de hasta 25 hojas en una muestra compuesta para la prueba de ELISA. Para la prueba de RT-PCR, se puede combinar el tejido de hasta 200 hojas en una muestra compuesta.

Otro tipo de tejido que se puede utilizar es el estolón, el cual se extrae con ayuda de un sacabocado o un pela papas, la cantidad de tejido es de 0.4 – 1.0 g de tejido. Cada muestra consta de 400 tubérculos la cual se separa en submuestras de 50 tubérculos.

En cuanto se haya tomado el material es necesario mantenerlo en congelación (-20°C) hasta su procesamiento. Para procesar la muestra, se le adiciona buffer general de extracción (MEB) en relación 1: 10,

Tabla 1. Tipo de tejido y cantidad de muestra para procesarse con las técnicas ELISA y RT-PCR

Prueba	Brotos de tubérculos	Estolones del tubérculo	hojas de la planta
ELISA	Compuesta de todos los brotes de 20 tubérculos	Compuesta de 50	Compuestos de 25
RT-PCR			

3.- Almacenamiento

El resto de la muestra se conserva a -20°C en caso de requerir un segundo diagnóstico.

4.- Técnicas de detección

Se deben realizar pruebas por medio del método de ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA) y Transcripción Inversa – Reacción en cadena de la polimerasa (RT- PCR).

Las pruebas deben llevarse a cabo conforme a un protocolo oficial y bajo los auspicios de un fitopatólogo calificado o dentro de un sistema de aseguramiento de la calidad aprobado.

Deben utilizarse controles positivos y negativos junto con las muestras de pruebas.

La técnica serológica ELISA está basada en la habilidad de proteínas, conocidas como anticuerpos, para reconocer y enlazar un antígeno específico asociado con el patógeno. Es una técnica confiable y rápida para la detección de fitopatógenos.

Se han desarrollado algunas variantes, pero hasta el momento el método directo de DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) es el más utilizado (Salazar, 1990). Consiste en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno, en la que, posteriormente se añade el antígeno que reacciona con los anticuerpos adheridos a la placa, complementado con la adición de un conjugado enzimático (segundo anticuerpo) para formar el complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

La prueba ELISA es una metodología válida para realizar pruebas a los brotes, estolones y hojas que se producen a partir de los tubérculos muestreados. No se considera válida para realizar pruebas a los tubérculos dormantes.

Para la detección de PVY y sus variantes, se requiere el uso de combinaciones de antisueros de tipo policlonal y monoclonal. Los anticuerpos IF5 y Scottish 'Rose' son altamente específicos para PVYN, los cuales se encuentran disponibles comercialmente (Agdia®, Adgen®, etc.)

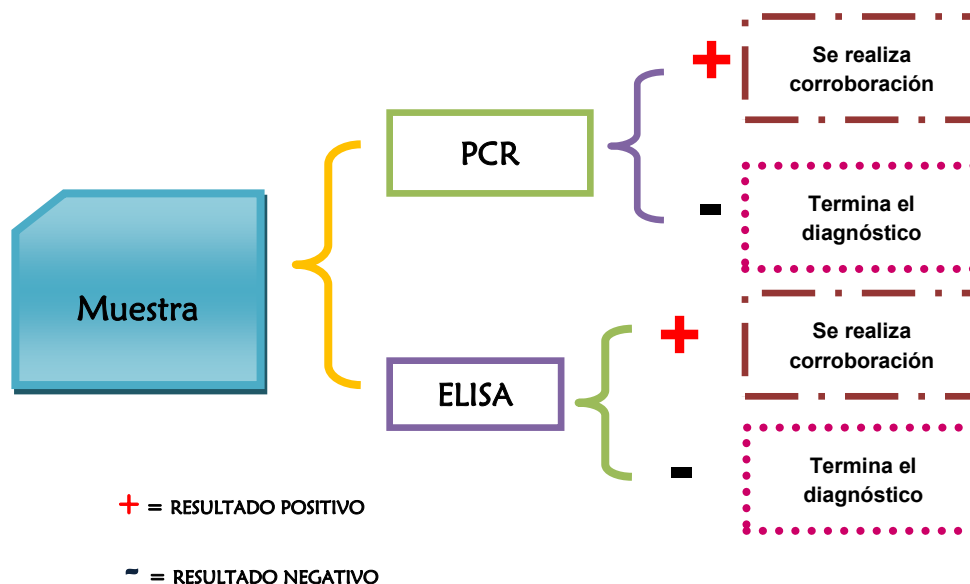


Fig. 7 Esquema de trabajo

En muestras de especies solanáceas (papa, chile, tomate y tomate verde), así como de otras familias botánicas, se deben de realizar las pruebas de ELISA y Reverso Transcriptasa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

1. Técnica de ELISA

1. Sensibilizar la placa de poliestireno. Diluir la gammaglobulina purificada (anticuerpo) de acuerdo a la recomendación del fabricante en solución amortiguadora SOLAM de cobertura (Ver preparación de soluciones) suficiente para la cantidad de muestras a analizar. Colocar 100 µl de la dilución anticuerpo específico para PVY^N, considerando en el formato de distribución de muestras, el número de muestras, testigos negativos y positivos con su repetición. Incubar en cámara húmeda 4 horas a temperatura ambiente (20 a 25 °C) o durante toda la noche a 4 °C.
2. Lavar la placa de 3 a 5 veces con PSTB-T 1X (Ver preparación de soluciones). Tomar la placa y tirar su contenido en una tarja, posteriormente se inclina y llena cada uno de los pozos sensibilizados empezando por los de la primera línea, luego la segunda y así sucesivamente, hasta cubrir todos los necesarios, deja reposar durante 1 minuto y vuelve a tirar el contenido de la placa y a sacudir vigorosamente varias veces sobre hojas de papel secante hasta ver los pozos secos. .
3. La muestra vegetal de interés se macera u homogeniza con SOLAM de extracción (Ver preparación de soluciones). Ésta se adiciona, con su repetición, en los pozos previamente seleccionados. Se colocan en los pozos correspondientes a los testigos negativos 100µL de control negativo comercial. Se recomienda no utilizar los pozos cercanos a los bordes ya que pueden desarrollar reacciones no específicas (Salazar, 1983). Se diluye el testigo positivo y coloca 100 µl de esa dilución en los pozos. Se deja incubar en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.
4. Lavar la placa de 6 a 10 veces con PSTB-T 1X (Ver preparación de soluciones)
5. Diluir en ECI Buffer (Ver preparación de soluciones) el anticuerpo monoclonal (Bottle A) y el conjugado enzimático (Bottle B) en la proporción señalada por el proveedor para ambos anticuerpos. 100 µL de esta mezcla se depositan en cada pozo y se mantiene la placa en cámara húmeda 2 horas a temperatura ambiente.
6. Lavar la placa de poliestireno de 6 a 10 veces.
7. Preparar la solución de sustrato de la enzima diluyendo el para-nitrofenil fosfato (1mg/mL) en SOLAM de sustrato (Ver preparación de soluciones). Colocar 100µL en todos los pozos de trabajo, incluyendo los blancos. Incuba en condiciones de oscuridad de 15 a 60 minutos.
8. Encender y programar lector de placas de ELISA.
9. Observar si hay coloración en los pozos. La medición de la reacción se hace con la ayuda de un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 405 para la enzima fosfatasa alcalina.
10. Las lecturas se realizan después de adicionado el sustrato y los resultados deberán interpretarse de acuerdo a los siguientes criterios (Cruz y Frías, 1997).
 - a. Para considerar aceptables los resultados de una placa de ELISA, la media de las lecturas de densidad óptica del testigo negativo deben ser menor a 0.06 y del testigo positivo diluido aproximadamente de 0.20.
 - b. La reacción se considerará positiva (presencia del fitopatógeno) si la lectura de densidad óptica es mayor o igual a tres veces la media del testigo negativo. Si el testigo negativo presenta en promedio valores de densidad óptica menores de 0.03, sólo se considerarán positivos aquellas muestras con densidades ópticas mayores a 0.1.
 - c. Cuando sólo una de las muestras es positiva y/o si la diferencia con su repetición es mayor o igual al 50% de su valor, la muestra debe procesarse nuevamente para determinar la presencia del fitopatógeno.
 - d. Las pruebas que resulten positivas o sospechosas deberán analizarse una segunda vez para su confirmación.
11. Los resultados se anotan en la bitácora de registro de muestras del laboratorio de virus, indicando la fecha emisión de respuesta.
12. Capturar el resultado en base de datos.

2. Técnica RT-PCR

Extracción de RNA con el reactivo Plant RNA Purification Reagent (Invitogen® No. Cat. 12322-012)

1. En el área gris del laboratorio, pesar de 50 a 100 mg de tejido en una balanza analítica, y se coloca en un mortero previamente estéril y congelado, triturar la muestra hasta dejarla en una consistencia de polvo.
2. Se deposita todo el polvo a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL con 500µL Plant RNA Purification Reagent (Invitogen® No. Cat. 12322-012), agitar en vortex por 30 segundos hasta que el macerado este totalmente resuspendido.
3. Incubar por 5 minutos sobre hielo. (Poner horizontalmente para maximizar el área durante la extracción).
4. Clarificar la solución, por centrifugación a 13 000 rpm por 2 minutos. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL.
5. Adicionar 100 µL de NaCl₅M para clarificar el extracto y mezclar por inversión.
6. Adicionar 300 µL de cloroformo. Mezclar por inversión.
7. Centrifugar por 10 minutos a 13 000 rpm y transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL limpio y estéril .
8. Precipitar el RNA con un volumen igual de isopropanol frío, y mezclar por inversión e incuba al menos por 10 minutos sobre hielo .
9. Centrifugar a 4 °C por 10 minutos a 13 000 rpm.
10. Decantar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet (pastilla). Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70 % y centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos, escurrir los excesos de la pastilla sobre papel absorbente y esperar a que seque.
11. Resuspender la pastilla en 30 µL de agua estéril libre de nucleasas y proceder a la verificación de la integridad, calidad y cantidad del RNA .

Verificación de la integridad del DNA o RNA en electroforesis.

1. Preparar 80 mL de agarosa al 1.0 %, en buffer TAE o TBE al 1X con 1µL de Bromuro de etidio en cámara de electroforesis.
2. Colocar 10 µL de RNA mezclados con 3 µL de buffer de carga (Solución Halt) en los pozos del gel previamente sumergido en buffer TAE o TBE al 1X y correr la electroforesis a 5 minutos 80 volts y 25 minutos 90 volts.
3. Observar el gel en un transiluminador de luz Ultra Violeta (UV) y tomar la foto con un analizador de imágenes.
4. Analizar la imagen y verificar la integridad.

Verificación de la calidad y cantidad del RNA por espectrofotometría

1. Leer la calidad y cantidad de RNA en espectrofotómetro.
2. Hacer la dilución pertinente llevando la concentración del RNA a 1 ± 0.5 µg/mL en agua estéril libre de nucleasas.

RT-PCR en un dos pasos, para la amplificación de PMTV

1. Adiciona los siguientes reactivos en un tubo de PCR:

Reactivo	Concentración inicial	Volumen 1 tubo
Buffer de PCR 10 X	1X	2.5 µL
DTT * 0.1 M	10 mM	2.5 µL
MgCL ₂ 50 mM	2.5 mM	1.25 µL
dNTP's 10 mM	250 mM	0.625 µl
Iniciadores		
S6 10 pmoles	20 pmoles	2 µl
A 10 pmoles	20 pmoles	2 µl
Taq polimerasa 5 U	2.5 U	0.5 µL
Reverso Transcriptasa 200 U	100 U	0.5 µL
RNAsin 40 U	20 U	3 µl
RNA 1mg/mL		9.625 µl
Agua libre de RNAasa y DNAasa		25 µL
Volumen final		25 µL

* DTT= 1,4 D L-Dithiothreitol grado biología molecular (cofactor enzimático).

Nota: La mezcla de reacción se prepara para todas las muestras, negativo y positivo, para lo cual se multiplica el volumen por tubo del cuadro anterior por la cantidad de muestras, negativo y positivo y una más para eliminar el efecto de error de pipeteo

Para el diagnóstico de PVY se utilizarán los iniciadores

Sentido	Nombre del primer	Secuencia
Antisense	A	5' CATTGTGCCCAATTGCC3'
Sense	S6	5' GGTGAAGCTAATCATGTCAAC3'

2.- Descongelar los reactivos para RT-PCR y mantenerlos sobre hielo.

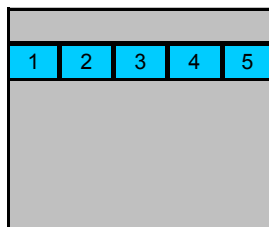
3.- Incuba 3 µl de cada RNA a 70°C por 5 min., incluyendo un control negativo (agua libre de ADNAsas y RNAsas) y un positivo.

4.- Concluido el periodo de incubación, depositar en cada uno de los tubos 22 µl de la mezcla de reacción.

5.- Coloca las muestras en el termociclador de acuerdo al siguiente programa:

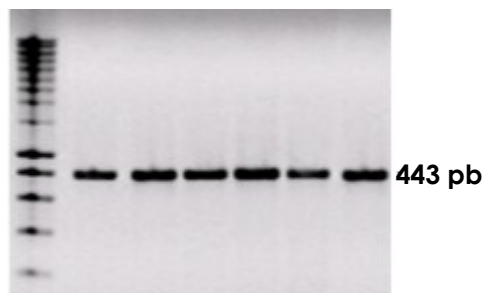
Temperatura	Tiempo	Ciclos	
42 °C	45 min.	1	RT PCR
94 °C	5 min.	1	
94 °C	1 min.	35	
55 °C	1 min.		
72 °C	1 min.		
72 °C	10 min.		
4 °C	∞	1	

6. Después de concluir el programa térmico del termociclador se analizan los productos de PCR mediante electroforesis en agarosa.
7. Los productos amplificados se visualizan en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio, para lo cual utiliza el transluminador de luz ultravioleta (UV). Se depositan 10 mL del producto de PCR amplificado, mezclados con 2 µL de buffer de carga (Solución Halt) sobre papel parafilm y deposita en los pozos del gel de agarosa al 2.0 % teñido con 1 µL de bromuro de etidio (0.5mg/mL) en buffer TAE o TBE 1X. Se coloca el marcador de 100 pares de bases.
8. Coloca las muestras de la siguiente manera:



1. Marcador molecular (adecuado al fragmento amplificado, ejemplo, Ladder 50, 100pb, etc.)
2. Control Positivo (a partir de una planta enferma).
3. Control negativo amplificado a partir de una planta sana o agua)
4. Muestra
5. Muestra

9. Corre la electroforesis 5 minutos a 80 volts y 35 minutos a 90 volts o correr hasta que el azul de bromofenol se encuentre a 3/4 partes del gel, apaga la fuente de poder, observa sobre un transluminador de luz UV un fragmento de 443 pb y toma la fotografía con un analizador de imágenes.
- 10.- Se toma nota del resultado obtenido, el resultado se registra en bitácora y concluye el análisis.



Preparación de diluciones**ELISA Directa (DAS-ELISA)****a) Solución amortiguadora de cobertura**

Disolver a 1,000 mL de agua destilada:

Carbonato de Sodio (anhidro)	1.59 g
Bicarbonato de Sodio	2.93 g
Azida de sodio	0.2 g

Ajustar el pH a 9.6 (+/- 0.2). Almacenar a 4°C

b) Solución amortiguadora de Fosfatos (Lavado) PBST

Disolver a 1,000 mL de agua destilada:

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de Sodio, dibásico (anhidro)	1.15 g
Fosfato de Potasio, monobásico (anhidro)	0.2 g
Cloruro de Potasio	2.0 g
Tween 20	0.5 g/ml

Ajustar el pH a 7.2 (+/- 0.2)

Nota: La solución de lavado puede prepararse concentrada y posteriormente diluirse. Prepare una concentración 20X (20 veces concentrada).

c) Solución amortiguadora de Extracción (Macerado de muestras vegetales)

Disolver en 1000 mL de solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBST):

Leche libre en grasas	1 g
Tween 20	0.5 mL

Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2)

d) Solución amortiguadora para diluir el antisuero conjugado (ECM)

Disolver en 1000 mL de solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBST):

Leche libre en grasas	0.4 g
-----------------------	-------

Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2)

e) Solución amortiguadora de cobertura para PNP (Revelado).

Disolver en 800 mL de agua destilada:

Dietanolamina	90.39 g
Dietanolamina-HCl	19.82 g
Cloruro de Magnesio	0.1 g

Ajustar el volumen final a 1,000 mL de agua destilada. Almacenar a 4° C en refrigeración en frasco ámbar o envolver con aluminio para proteger de la luz.

Preparación de diluciones

Leer las características de cada uno de los viales que contienen los antisueros, en donde se indican; el volumen, concentración y la dilución a la que deben prepararse las mezclas. Por lo general indican una relación de 1:200 (1 μ l de antisuero en 200 μ l de solución amortiguadora).

Dilución de antisuero primario

Sensibilizar la placa: El anticuerpo primario se diluye en solución amortiguadora de cobertura. Preparar el volumen total de la placa en base al número de pozos empleados, tanto para las muestras como para los testigos: 2 para el testigo positivo (con proteína viral) y dos para el testigo negativo (sin proteína viral).

Dilución del testigo positivo:

Colocar 300 μ l de solución amortiguadora de extracción en un vial de 2 mL, tome 100 μ l del control positivo comercial correspondiente al virus problema, agregar a la solución y mezclar perfectamente. Colocar 100 μ l en un pozo, incluyendo la repetición de éste.

Conjugado:

Diluir el antisuero conjugado a una enzima (fosfatasa alcalina), en solución amortiguadora de conjugado (ECI). Por lo general, indican una relación de 1:200 (1 μ l de antisuero en 200 μ l de solución amortiguadora). Preparar el volumen total de pozos empleados.

Revelado:

Diluir la pastilla de P-nitrofenilfosfatos (PNP) en solución amortiguadora de revelado (PNP), en una proporción 1:1 (peso mg/ volumen mL). Se recomienda envolver y cubrir con papel aluminio el recipiente.

5.- Destrucción de la muestra

Concluido el diagnóstico, la muestra se esteriliza en autoclave antes de ser desechada.

VII. REFERENCIAS

- Anónimo 1.** 1996. Norma Oficial Mexicana. NOM-012-FITO-1996, por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la papa. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo rural.
- Anónimo 2.** 2000. Norma Oficial Mexicana. NOM-025-FITO-2000, para el establecimiento de zonas bajo protección y zonas libres de plagas cuarentenarias de la papa. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Anónimo 3.** 2003. Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias N° 3. 2003. NRMF N° 3. Requisitos para la importación de papa hacia un país miembro de la NAPPO. Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las plantas.
- Anónimo 4.** 2008. Plan de trabajo para la importación de semilla de papa de Canadá a México. 2005. Dirección General de Sanidad Vegetal SENASICA/DGSV. Canadian Food Inspection Agency Canada.
- Beczner, L., Horváth, J., Romhányi, I., and Förster, H.** 1984. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. Potato Research 27: 339-352,
- De Bokx J.A., Huttinga H.** (1981): Potato virus Y. CMI/AAB. Description of Plant Viruses, No. 242.
- Callejas, C.R.** 2006. Detección del virus Y de la papa, variantes necrosis de la nervadura del tabaco PVYN y necrosis del tubérculo de la papa (PVYNYN) a partir de estolones por técnicas serológicas y moleculares. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. México.
- Cruz, F. M. y Frías, T. G. A.** 1997. Guía ilustrada de la prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Subsecretaria de Agricultura y Ganadería. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario. 19 p.
- Hooker, W.J.** 1981. Compendium of potato diseases. APS Press, Minnesota.
- Jayasinghe, V., Salazar L.F.** 1993. Manual de técnicas de virología de plantas. Fascículos CIP. Lima Perú.
- Romancer, M.L., Kerlan, C., Nedellec, M.,** 1994. Biological characterisation of various geographical isolates of Potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. Plant Pathol. 43, 138–144.
- Rosner A., Maslenin L.** (1999): Differentiating PVYNTN by unique single-restriction cleavage of PCR products. Potato Research, 42: 215–221.
- Salazar, L. F.** 1983. Detection with ELISA of potato viruses. Intenational Potato Center (CIP) 32 p.
- Salazar, L. F.** 1990. Metodología para la Detección de Virus de Papa: Pasado, Presente y Futuro. Revista Latinoamericana de la Papa. 3(1):1-12
- Shukla, D. D., Ward, C. W. & Brunt, A. A.** (1994). The Potyviridae. Wallingford, UK: CAB International.
- Sigvald, R.** (1984). The relative efficiency of some aphid species as vector of potato virus Y. Potato Res 27, 285–290.
- Tribodet, M., Laurent Glais, Camille Kerlan, and Emmanuel Jacquot.** 2005. Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanth.i Journal of General Virology (2005), 86, 2101–2105