

Detección por inmunoimpresión de *Potato yellow vein virus* (PYVV) en diferentes órganos de papa

Herramienta sencilla y útil en diagnóstico
del Virus de amarillamiento de nervaduras
de papa y certificación de semillas



Autora y editora:
Mónica Guzmán-Barney

Coautores:
Patricia Andrea Rodríguez Burgos
John Calderón Romero



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
LABORATORIO DE VIRUS VEGETALES

Detección por inmunoimpresión de *Potato yellow vein virus* (PYVV) en diferentes órganos de papa

Herramienta sencilla y útil para diagnóstico
del Virus de amarillamiento de nervaduras de papa
y la certificación de semillas

Autora y editora
Mónica Guzmán-Barney

Coautores
Patricia Andrea Rodríguez Burgos
John Calderón Romero



Bogotá, D. C., Colombia, octubre de 2013

© Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá,
Instituto de Biotecnología, Laboratorio de Virus Vegetales

© Fedepapa

© Autora y editora:

Mónica Guzmán-Barney

M.Sc, Ph.D. Profesora Asociada

Coordinadora del Laboratorio de Virus Vegetales

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia

© Coautores:

Patricia Andrea Rodríguez Burgos

M.Sc, c Ph.D. Universidad Nacional de Colombia

John Calderón Romero

Biólogo. Estudiante de Maestría en Fitopatología, Universidad Nacional de Colombia

Agradecimientos

Dr. José Manuel Lozano (Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia-FIDIC)

Dra. Liliana- Franco Lara (Universidad Militar Nueva Granada)

Ángela Villamil, M.Sc. (Universidad Nacional de Colombia)

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - **Colciencias**

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - **MADR**

ISBN: 978-958-761-579-1 (rústico)

ISBN: 978-958-761-580-7 (e-book)

Concepto gráfico:

Ángela Pilone Herrera

Fotografías:

Mónica Guzmán-Barney

Preparación editorial:

Editorial Universidad Nacional de Colombia

www.editorial.unal.edu.co

direditorial@unal.edu.co

Bogotá, Colombia

Impreso y hecho en Bogotá, D.C., Colombia

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita de los titulares de los derechos patrimoniales

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Guzmán Barney, María Mónica, 1953-

Detección por inmunopresión de Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de papa :herramienta sencilla y útil en diagnóstico del virus de amarillamiento de nervaduras de papa y certificación de semillas /autora y editora Mónica Guzmán-Barney ; coautores Patricia Andrea Rodríguez Burgos, John Calderón Romero. – Bogotá :Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Laboratorio de Virus Vegetales : Fedepapa, 2013

xxx páginas : ilustraciones

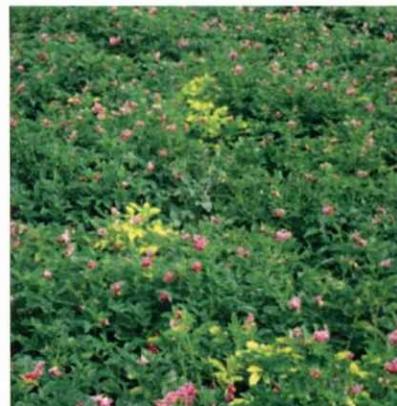
Incluye referencias bibliográficas

ISBN : 978-958-761-579-1 (rústica) – ISBN : 978-958-761-580-7 (e-book)

1. Papas (Tubérculos) - Enfermedades y plagas 2. Papas (Tubérculos) – Enfermedades a virus 3. Biotecnología de semillas de papa – Cartillas 4. Certificación de semillas de papa 5. Amarillamiento foliar I. Rodríguez Burgos, Patricia Andrea, 1980- II Calderón Romero, John Alexander, 1988-

CDD-21 635.219 / 2013

Contenido



Presentación	4
Laboratorio de Virus Vegetales	5
Historia	6
Detección serológica por Elisa y molecular por RT-PCR	7
Inmunoimpresión (IMI)	9
Inmunoimpresión protocolo (IMI)	10
Material y equipo	11
Positividad	14
Pecíolo - petiole	15
Tallo - stem	18
Tubérculo - tuber	21
Primordios de tubérculo	24
Costos	27
Referencias	28

Presentación

Esta cartilla ilustra la detección serológica, en el floema de diferentes órganos de la papa, del *Potato yellow vein virus* (PYVV), conocido en español como “virus de amarillamiento de la nervadura de hojas de la papa”. Utilizando una metodología sencilla y eficiente denominada inmunoimpresión (IMI) la detección viral se realiza con un anticuerpo específico de reconocimiento. El anticuerpo anti-PYVV (sometido a patente) fue obtenido por Patricia Rodríguez-Burgos, candidata a Doctorado en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, en investigaciones anteriores financiadas por Colciencias y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR).

Teniendo en cuenta que PYVV es el agente causal de la enfermedad de amarillamiento de venas de las hojas de papa que conlleva pérdidas (30 % a más de 50 %) importantes en la producción de tubérculos, el objetivo de la presente publicación es ilustrar de forma clara y contundente la presencia de los acúmulos de PYVV en el floema de cortes de diferentes órganos de plantas de papa infectados con el virus y que mostraban síntomas de amarillamiento *versus* los controles negativos.

La cartilla cuenta con una versión impresa y una digital en la web (www.bdigital.unal.edu.co; www.redepapa.org; www.fedepapa.com), ambas publicaciones de gran utilidad para consulta, sobre el diagnóstico y la certificación de PYVV en papa, de los diferentes gremios de investigadores, de agrónomos, semilleristas, técnicos de campo y de laboratorio, o aquellos relacionados con otros cultivos susceptibles a la infección con el PYVV, como por el ejemplo, el tomate. No solo se podrá beneficiar la investigación básica en áreas de la biología, agronomía, entomología y ciencias afines sino que, es de esperar que la presente publicación llegue a un amplio número de personas y bibliotecas de instituciones y que sea de gran utilidad para aquellas encargadas en la certificación de patógenos como ICA y Corpoica, en Colombia.

Laboratorio de Virus Vegetales IBUN - UNAL

Con 13 años de conformación, el grupo de Virus Vegetales de IBUN-UNAL, dirigido por Mónica Guzmán Barney, Ph.D. está vinculado al grupo de Bioquímica de Virus (Colciencias) y se han formado más de 15 profesionales investigadores jóvenes a nivel de maestría, doctorado o nivel de pregrado. Las áreas de estudio se relacionan con el diagnóstico y la caracterización biológica, serológica, molecular y de transmisión de diferentes virus fitopatógenos.

Las investigaciones principales se han orientado al estudio de fitovirus en el cultivo de los cítricos (*Citrus spp.*) para la detección y caracterización del virus *Citrus tristeza virus* (CTV) y también, de algunos potyvirus que infectan al cultivo del ñame (*Disocórea spp.*) como *Yam mosaic virus* (YMV) y *Yam mild mosaic virus* (YMMV) por medio de RT-PCR y filogenias de secuencias de la proteína de cápside; otros potyvirus de plantas ornamentales y comerciales se han estudiado. Otros virus importantes para el cultivo de la papa como PVX, PVY, PVS y PLRV, que tienen alta incidencia y efectos deletéreos en la producción han sido analizados. Más recientemente se ha avanzado en conocimiento biológico, serológico, molecular y de transmisión del virus *Potato vein yellow virus* (PYVV). Para el desarrollo de las investigaciones se cuenta con técnicas rutinarias de detección serológica (IMI, ELISA y obtención de anticuerpos) y moleculares (RT-PCR convencional, qRT-PCR - tiempo real, Western Blot, hibridación *in situ*, microscopía electrónica, detección y análisis de RNA defectivos, secuenciamiento convencional de genes y secuenciamiento de genomas virales utilizando "Next Generation Sequencing" o secuenciamiento profundo).

Los servicios de extensión se prestan según solicitudes para capacitación en técnicas de diagnóstico específicas: serológicas (inmunopresión y ELISA) y las derivadas de la amplificación de genes por RT-PCR. De los trabajos realizados se han realizados 28 publicaciones.

Se han establecido relaciones de colaboración con investigadores vinculados al Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Militar Nueva Granada (UMNG), Universidad de los Llanos, Corpoica- Meta y Palmira; Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Universidad de la Florida, INRA-Bordeaux, entre otros.

Los proyectos de investigación han sido financiados por Colciencias, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Asohofrucol, CIP, Fedepapa, CIAT, Corpoica, Universidad Militar Nueva Granada (UMNG), Programa de Biotecnología Agrícola (PBA), Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (DIB).

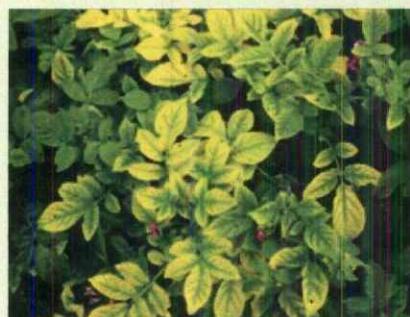
Historia

Potato yellow vein virus (PYVV)

La enfermedad de amarillamiento de nervaduras de las hojas de la papa (*potato yellow vein disease*, PYVD) fue descrita desde la década de los años 50 (Alba, 1952) y se caracteriza por el amarillamiento del follaje de la planta. Está reportado que esta infección es causada por el virus *potato yellow vein virus* (PYVV) que pertenece a la familia *Closteroviridae* (Salazar *et al.*, 2000; Martelli *et al.*, 2002). Se ha informado que la infección de plantas de papa con el PYVV causa una reducción de la producción estimada en más de 50% para papa de año (*Solanum tuberosum* Andígena var Diacol Capiro) y de aproximadamente 30% en papa criolla (*Solanum phureja*) (Salazar *et al.*, 2000; Guzmán *et al.*, 2012).



Campo de *S. tuberosum* infectado por PYVV



Síntomas de PYVV en planta de *S. phureja*



Izquierda hoja sintomática, derecha hoja no sintomática. *S. phureja*

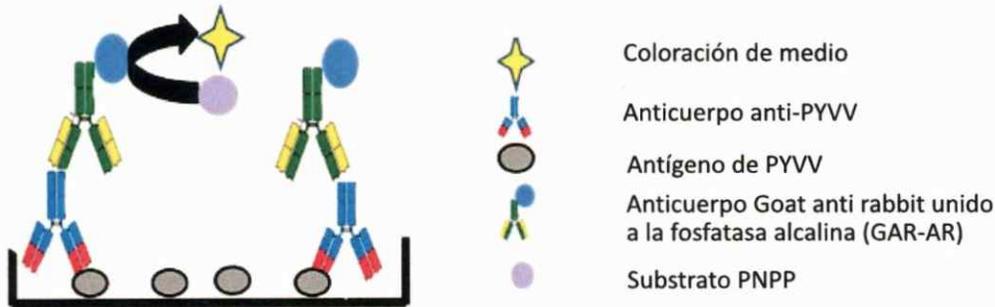
Síntomas

En papa, la infección por el virus del amarillamiento de las nervaduras de hoja de papa se evidencia primero con el aclaramiento de las nervaduras secundarias y terciarias en las hojas superiores, luego las nervaduras se tornan amarillas con espacios intervenales de color verde y en algunas ocasiones se observan puntos necróticos en el follaje, tejido foliar áspero al tacto, disminución del número de tubérculos (Guzmán *et al.*, 2012), tubérculos deformados y nudosidades en los ojos por crecimiento secundario (Gutiérrez, 1996; Zapata, 2004). Por último, las hojas se tornan totalmente amarillas, de un color muy intenso, fácilmente detectable que en ocasiones afecta a toda la planta. Sin embargo, también existen plantas asintomáticas en las cuales se detecta la presencia del virus (Salazar *et al.*, 2000; Guzmán *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2013).

Detección serológica por Elisa y molecular por RT-PCR

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Es la técnica más utilizada para la detección de virus y en la certificación de semillas, debido principalmente a que es fácil de realizar para grandes volúmenes de muestras; es económica y sensible.

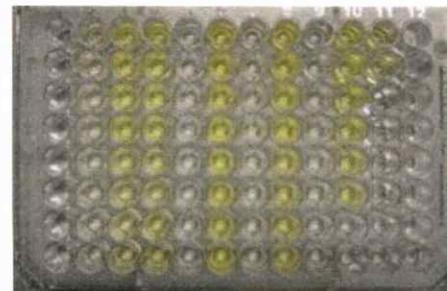


ELISA indirecto

Se basa en la utilización de anticuerpos para la detección y/o identificación de virus, de una manera más fácil, sensible y con un menor costo que mediante la utilización de otras pruebas serológicas. La técnica de *tissue printing* o inmunopresión, utiliza la transferencia de proteínas de tejido foliar a una membrana de nitrocelulosa a partir de cortes longitudinales y/o transversales y su posterior exposición a anticuerpos específicos para la detección de virus, como los virus que afectan a la papa (Guzmán *et al.*, 2002). En esta cartilla se presenta la detección de acúmulos de partículas virales de PYVV que se detectan por una coloración violeta, especialmente en la región de los ases vasculares y células asociadas, puesto que PYVV es un virus restringido al floema de la planta (Salazar *et al.*, 2000).

De manera general, en las placas de poliestireno se fijan las proteínas virales (100 ul), que corresponden en general a las proteínas de la cápside viral (antígenos PYVV). Los antígenos se obtienen por maceración del material vegetal en un *buffer* de extracción (dilución 1:10) (p:v) (**paso 1**). Posteriormente se descarta el antígeno y se lava con *buffer* PBS-Tween para adicionar 100 ul suero

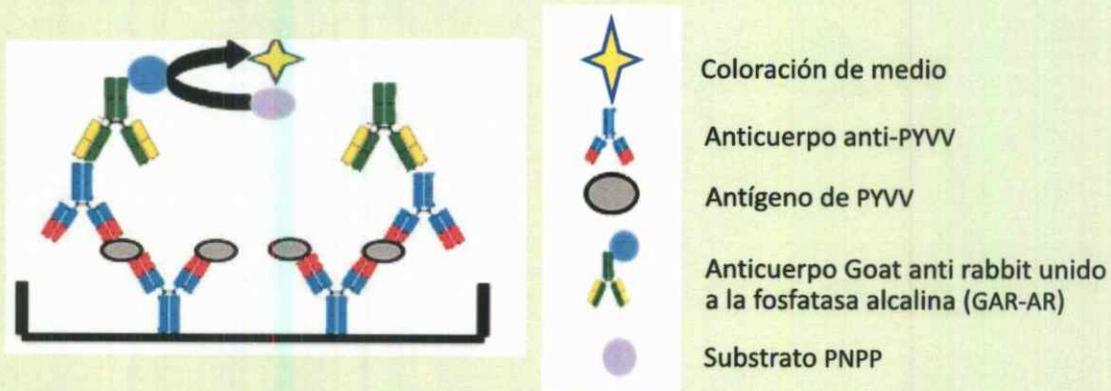
bovino fetal (BSA 1%) como bloqueador de sitios inespecíficos. Seguidamente se adiciona el anticuerpo de detección viral anti PYVV (**2**). Si el virus se encuentra en la muestra analizada, el anticuerpo reconoce al antígeno estableciéndose una unión covalente (**3**). Posteriormente, se adiciona un anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina (anticuerpo conjugado) GAR-AP, el cual tiene afinidad por el primer anticuerpo utilizado (**4**). Después de los lavados con PBS-Tween realizados entre cada paso, se agrega el sustrato de la fosfatasa alcalina (**5**) y se produce una reacción colorimétrica (**6**), indicando la presencia del virus en la muestra. La reacción de color es cuantificada como densidad óptica medida con filtro de 405 nm en un lector de placas de ELISA.



Placa de ELISA mostrando resultados positivos (color amarillo) y resultados negativos (sin color)

ELISA-DASI (sandwich de doble anticuerpo indirecto)

Es similar al ELISA directo pero en las placas se fijan primero los anticuerpos específicos (1) para la detección del antígeno (2) para de esta manera eliminar posibles falsos positivos, posteriormente se adiciona de nuevo el anticuerpo de afinidad por el antígeno (3); seguido por el anticuerpo conjugado (4) y, finalmente, el sustrato de la fosfatasa alcalina (5).



RT-PCR

Otra técnica de amplio uso para la detección de los virus es la amplificación de genes por medio de RT-PCR o (Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa) en la que se requieren dos enzimas (MMLV y Taq, respectivamente), para la replicación desde el extracto de RNA viral, a partir de hibridación de secuencias cortas del genoma (cebadores), con lo que se puede aumentar el número de copias de la secuencia del gen seleccionado por medio de una secuencia de 35 ciclos térmicos específicos, que se programan en un termociclador. La detección de la amplificación génica se realiza por medio de la migración de los fragmentos amplificados en un gel de agarosa teñido con un colorante de intercalación (*Syber Green*) que se expone a la luz ultravioleta.



Gel de Agarosa con productos de RT-PCR del gen CP de PYVV.
M: marcador de peso, carriles a 7 muestras, carriles 8 y 9 controles negativos y carriles 10 y 11 controles positivos.
Laboratorio de Virus Vegetales, para el método de extracción de RNA de PYVV

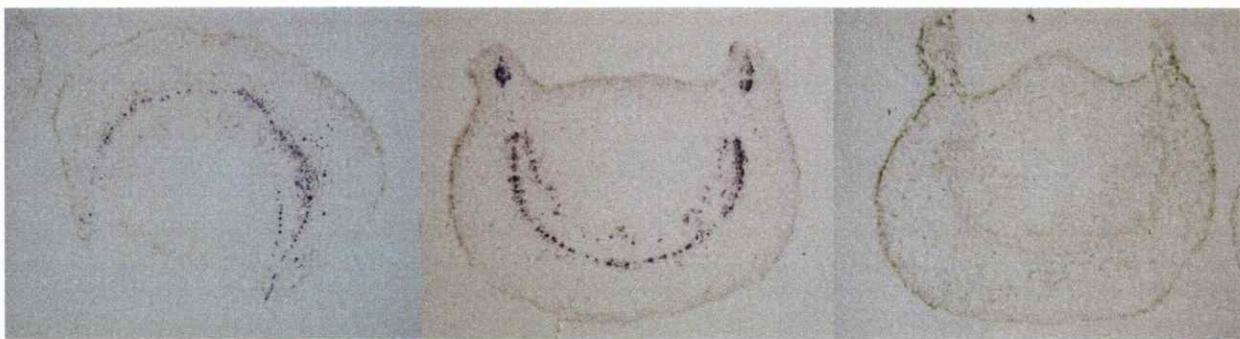
Inmunopresión (IMI)

Se basa en la utilización de anticuerpos para la detección y/o identificación de virus, de una manera más fácil, sensible y con un menor costo que mediante la utilización de otras pruebas serológicas. La técnica de *tissue printing* o inmunopresión, utiliza la transferencia de proteínas de tejido foliar a una membrana de nitrocelulosa a partir de cortes longitudinales y/o transversales y su posterior exposición a anticuerpos específicos para la detección de virus, como los virus que afectan a la papa (Guzmán *et al.*, 2002). En esta cartilla se presenta la detección de acúmulos de partículas virales de PYVV que se detectan por una coloración violeta, especialmente en la región de los ases vasculares y células asociadas, puesto que PYVV es un virus restringido al floema de la planta (Salazar *et al.*, 2000).

Recomendaciones

Para confirmar la infección de las plantas por un virus es necesario:

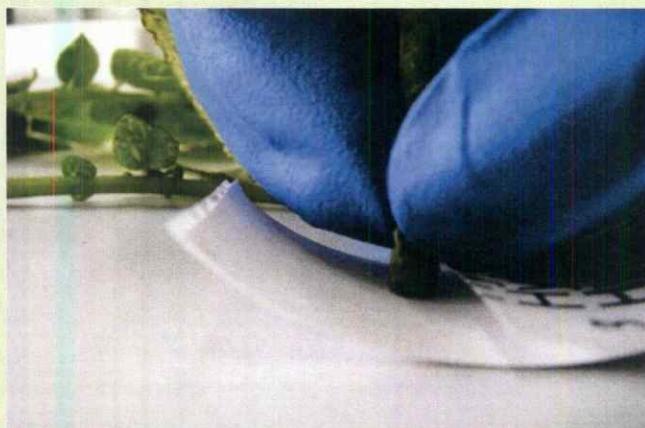
- 1) Usar buenos controles, tanto positivos como negativos, los cuales ayudarán a definir cuándo una muestra es realmente positiva y cuándo no.
- 2) El manejo correcto de los reactivos, especialmente los anticuerpos, permitirá tener resultados confiables y repetibles. Siempre mantener los anticuerpos a 4°C en nevera y en hielo en el momento del uso.
- 3) Utilizar siempre muestras frescas, sea en el laboratorio o en campo, ayudado por tablas de apoyo. Dejar secar y proteger las membranas. Hacer un croquis con la numeración de cada planta y la posición que ocupa en la membrana.
- 4) Preparar los *buffers* y soluciones en las cantidades necesarias para el grupo de muestras que se van a analizar y con la menor anterioridad posible.
- 5) Tener en cuenta las temperaturas y tiempos mencionados en el protocolo.
- 6) Una buena revisión de las membranas con buena lupa, o mejor un estereoscopio y un técnico con ojo entrenado, permitirán la mejor evaluación de las muestras en un menor tiempo.



Inmunopresiones de tejido de plantas infectadas (figura izquierda y central), se observan precipitados morados en los haces vasculares (señalados por la flecha).

Inmunopresión de una planta sana (figura de la derecha), la negatividad se evidencia por la ausencia de precipitado de color morado.

Inmunoimpresión protocolo (IMI)



Inmunoimpresión de pecíolo

Pasos a seguir

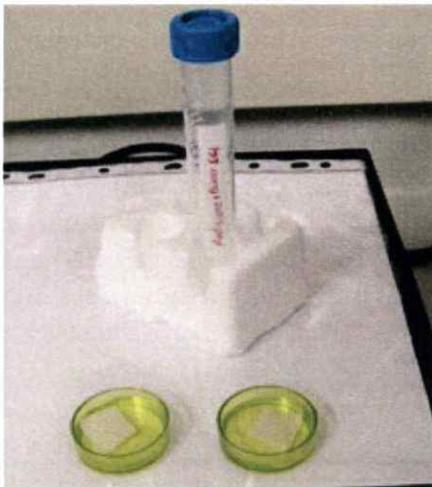
- Realizar el esquema de las muestras que se van a analizar en una hoja de papel, marque la membrana de nitrocelulosa y numere las filas con lápiz (1 a 50 muestras) o según la cantidad de muestras será el tamaño de la membrana.
- Hacer un corte transversal del órgano vegetal fresco (del mismo día de recolección o máximo de 2 días a 4°C) e imprima suavemente sobre la membrana de nitrocelulosa, dos o tres veces el mismo corte.
- Dejar secar la impresión durante 5 minutos antes de procesar. (La membrana se puede guardar en seco en bolsa plástica hasta su revelado).
- Colocar la membrana en el fondo de un recipiente plástico (de tamaño un poco más grande que la membrana).
- Agregar *Bovine Serum Albumin* (BSA) al 1 % o leche descremada al 3% preparada en PBS-Tween hasta cubrir la membrana.
- Incubar durante una hora en agitación suave a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.
- Descartar la preparación de bloqueo.
- Adicionar el anticuerpo de detección (anti-PYV) preparado en *buffer* de anticuerpo (ECI) en dilución 1:100.
- Agitar lentamente durante 3 horas a 37°C o durante 4 horas a temperatura ambiente.
- Descartar el anticuerpo (en frasco adecuado) y lave la membrana tres veces con PBS-Tween, en cada lavado se deja el *buffer* durante 5 minutos.
- Adicionar el anticuerpo (GAR) conjugado a la fosfatasa alcalina preparado en buffer ECI en dilución 1:20000.
- Agitar suavemente a 37°C durante 2 horas.
- Descartar el anticuerpo (en un frasco adecuado) y lave la membrana tres veces con PBST. En cada lavado se deja el *buffer* durante 5 minutos.
- Adicionar el sustrato de la fosfatasa alcalina (NBT/BCIP) hasta que aparezca coloración violeta en el control positivo.
- Lavar la membrana con abundante agua destilada y deje secar a temperatura ambiente.
- Observar la membrana directamente con lupa o bajo el estereoscopio, buscando la presencia de precipitados de color morado, indicadores de positividad.

La membrana se seca y se puede guardar durante tiempo indefinido en una bolsa plástica.

Material y equipo



- Cortes de material vegetal
- Suero de albúmina bovina (BAS) al 1% o leche descremada en polvo (3%)
- Buffer ECI (Agdia) o cada reactivo por separado
- PBS-Tween
- Anticuerpo de detección (anti PYVV) mantenido a 4°C
- Anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (GAR -AP Sigma) mantenido a 4°C
- Sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP (nitro-blue-tetrasodio/bromo-cloro-indol-fosfato) mantenido a 4°C
- Estereoscopio/lupa



Tubo falcón, cajas con tapa pequeñas, micropipeta, tubos eppendorf y guantes de látex

- Hojas de papel (para hacer esquema de muestras)
- Lápiz No. 2
- Cuchillas de bisturí o de afeitarse
- Membrana de nitrocelulosa 0,45 μm cortada a un tamaño menor que la caja plástica en la que se coloca
- Cajas de plástico con tapa: pequeñas y medianas
- Agitador
- Frascos lavadores 500 ml (*buffer* y agua)
- Frascos falcon 15 ml o 30 ml
- preparación de anticuerpo y conjugado
- Eppendorf de 2 ml
- Bolsas plásticas con cierre (pequeñas y medianas)
- Tabla de cartón duro para cortes de tejido y apoyo
- Estereoscopio/lupa



Lupa



Agitador y caja con tapa



Estereoscopio

Preparación de los buffers

Leche descremada al 3% en PBS

5 g de leche descremada en 1 litro de PBS

Buffer de anticuerpo y de conjugado

0,2 g de albúmina de suero bovino

2 g de polivinilpirrolidona (PVV)

0.02 g de azida de sodio (opcional)

Llevar a 100 ml con PBST 1X

Sustrato NBT/BCIP y *buffer* (Sigma)

40 mg de NBT en 2 ml de formamida al 70%

20 mg de BCIP en 2 ml de dimetilformamida

Tris 0.605 g

NaCl 0.292

Completar a 12 ml con agua destilada

NBT/BCIP descartar adecuadamente

Los reactivos también pueden ser obtenidos por otras casas comerciales. Asegúrese de seguir las instrucciones del proveedor para la correcta preparación y utilización de cada uno de los reactivos.

Tiempos para (IMI)

El **proceso** y revelado de una inmunopresión tarda entre 5 horas y un día. La **impresión** del tejido sobre la membrana tarda pocos segundos y el tiempo de impresión total utilizado dependerá del número de muestras. El **bloqueo** de las membranas dura una hora o la noche a 4°C. La **incubación** con el anticuerpo de detección tarda tres horas y con el anticuerpo conjugado tarda una hora y 30 minutos. A 37°C o aún a temperatura ambiente. **Entre los pasos** se realizan tres lavados, cada uno de 5 minutos y el revelado puede durar desde 5 minutos hasta una hora. La **presencia** de precipitados morados en el área de los tejidos vasculares, cuya forma varía de acuerdo con el tejido, evidenciará la presencia o ausencia de acúmulos virales.



Cultivo infectado con PYVV, Antioquia - Colombia (Guzmán y Franco, 2008)

Positividad

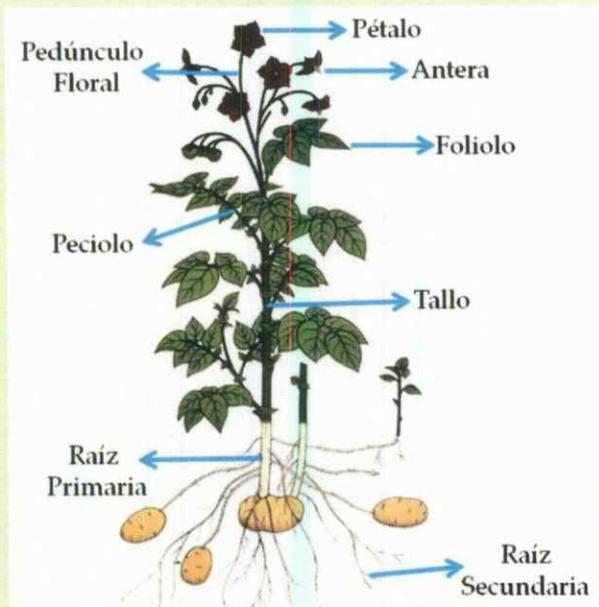
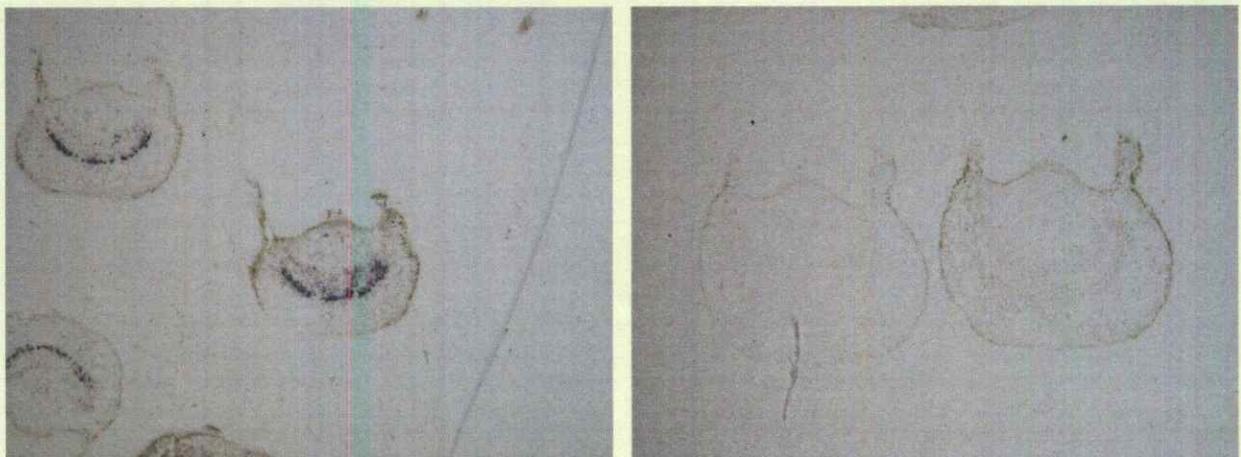


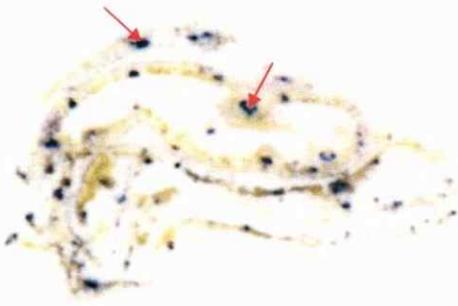
Figura tomada de CIP

Figura representativa de una planta de papa, señalando los diferentes órganos. Cada uno de los órganos puede ser utilizados en la inmunopresión, a diferencia de lo que ocurre con otras técnicas.

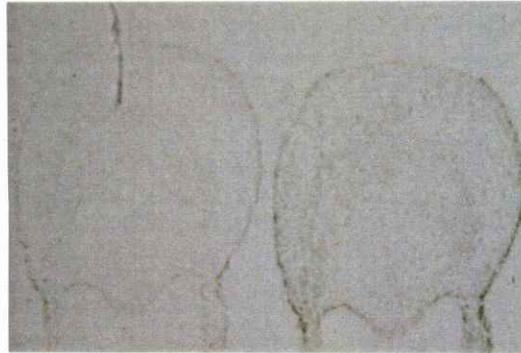
La presencia de precipitados morados en el área de los tejidos vasculares, cuya forma varía de acuerdo al tejido, evidenciará la presencia o ausencia de acúmulos virales.



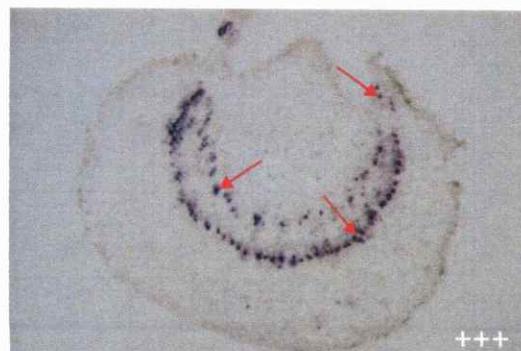
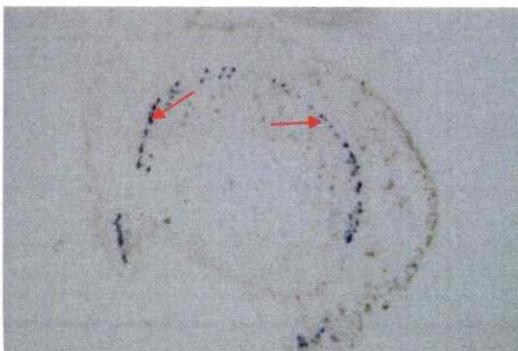
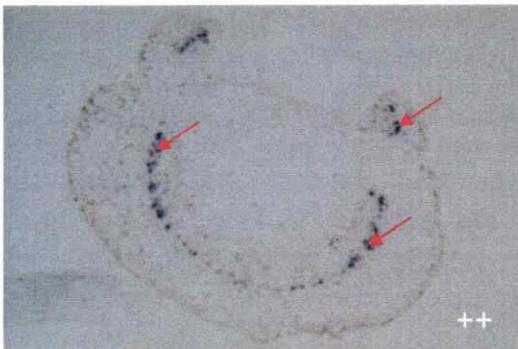
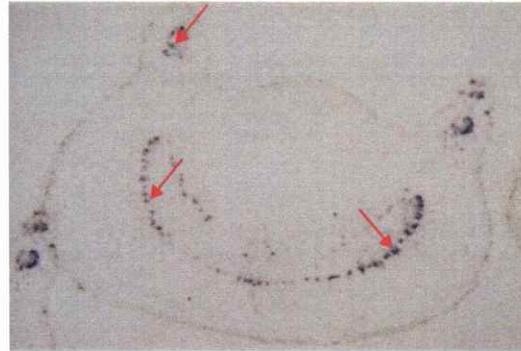
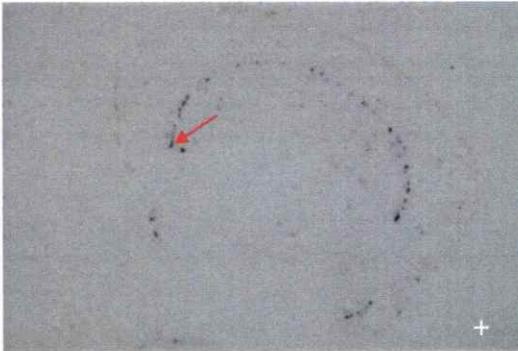
Se observa precipitados morados en las muestras positivas (izquierda). Control negativo con ausencia de precipitado de color morado (derecha). Los haces vasculares se señalan con una flecha.



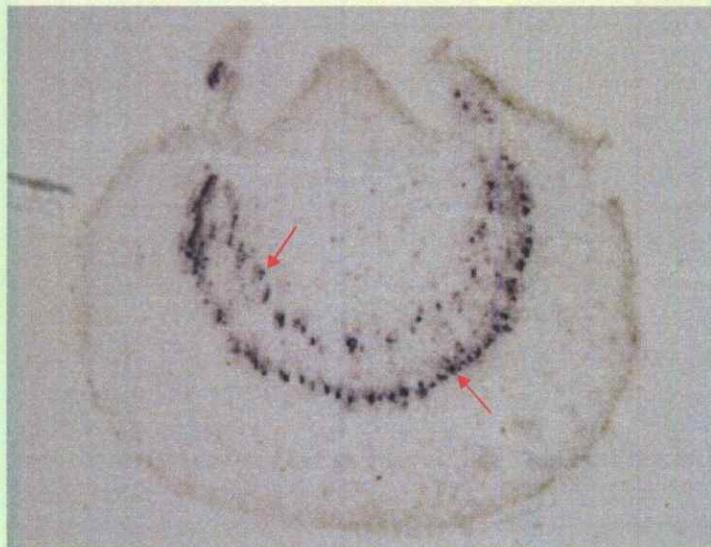
Hoja enrollada.
Las flecha señalan algunos de los acúmulos virales.



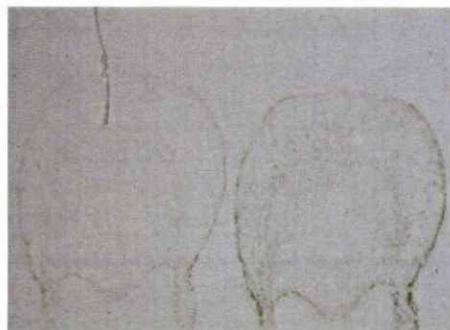
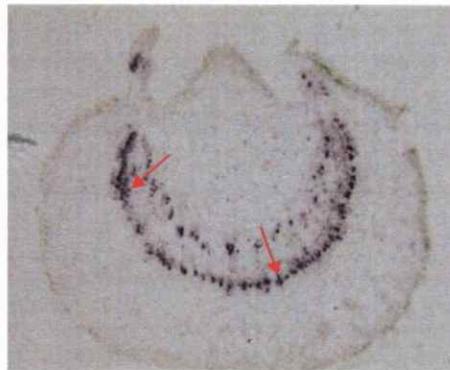
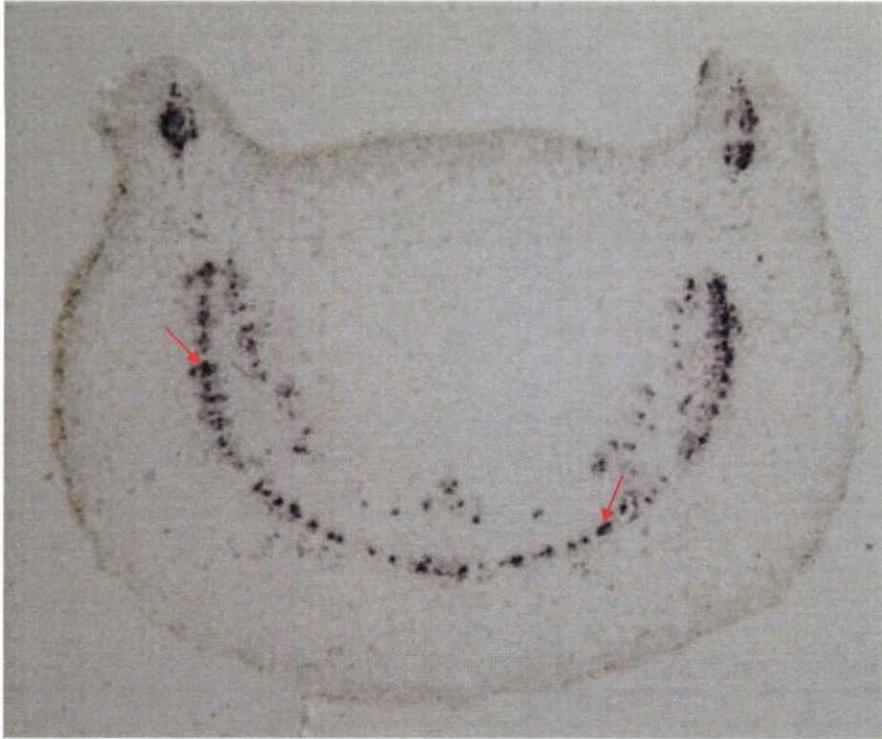
Corte transversal de pecíolo.
Control negativo.



Pecíolos: con la flecha se señalan los acúmulos virales sobre los haces vasculares.
+++ : alto nivel de detección. ++ : nivel medio. + : nivel bajo

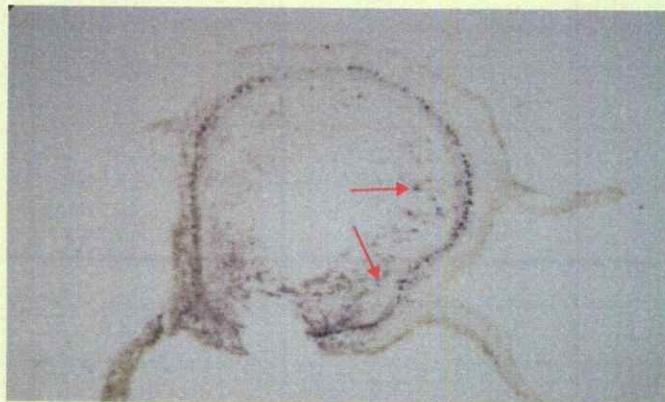
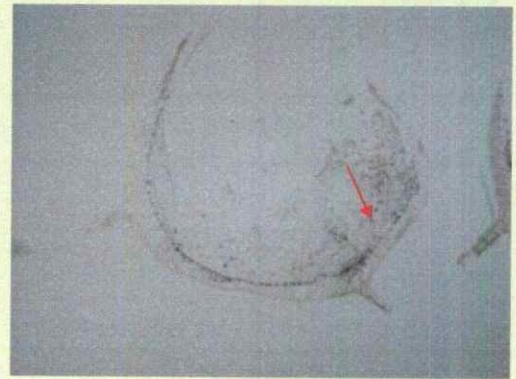
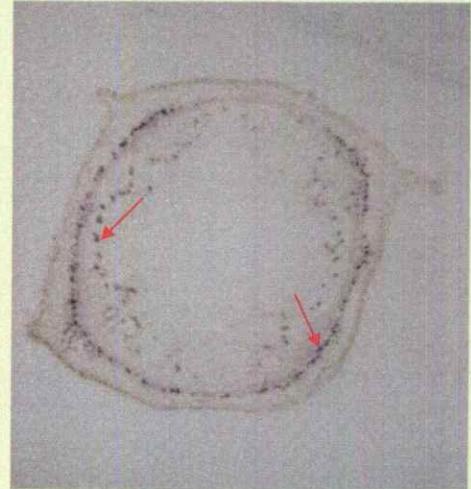
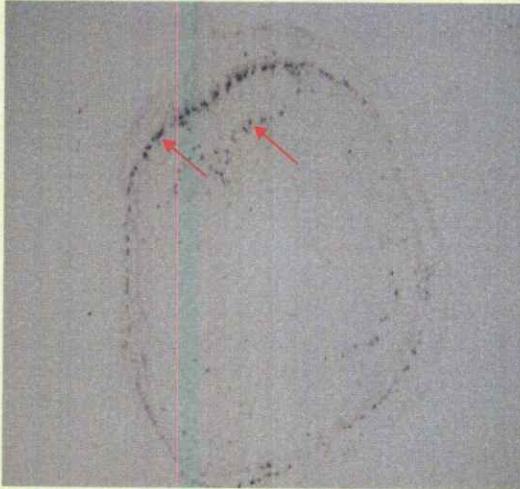
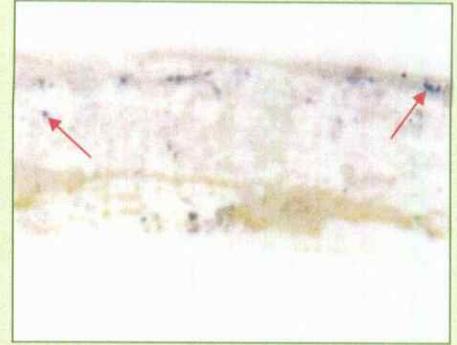
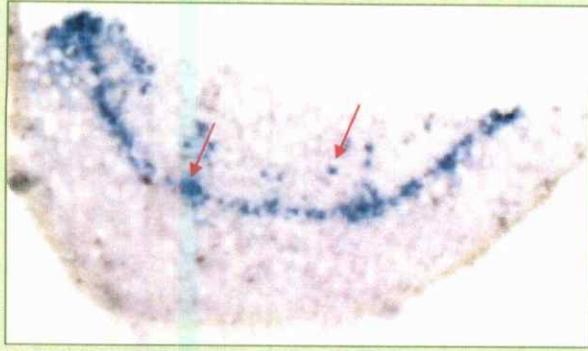


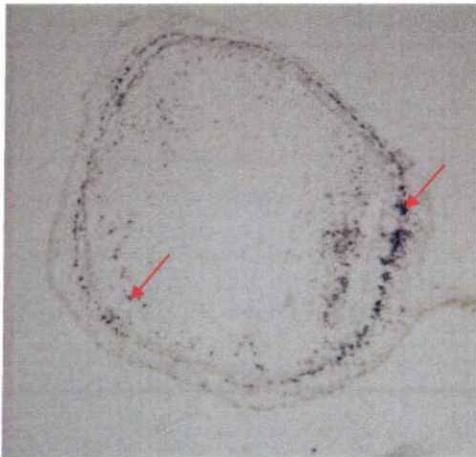
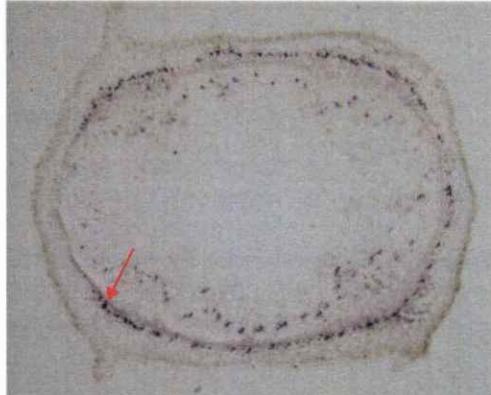
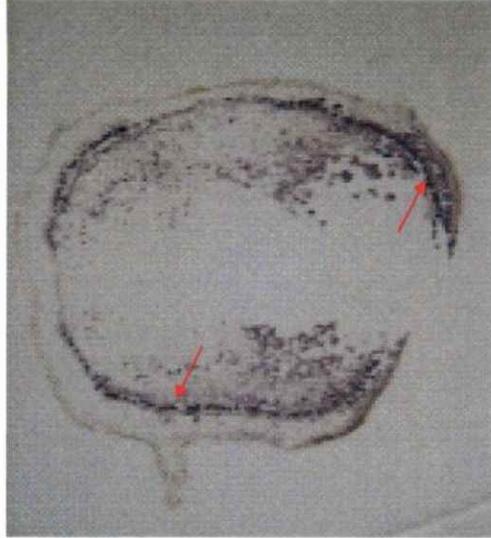
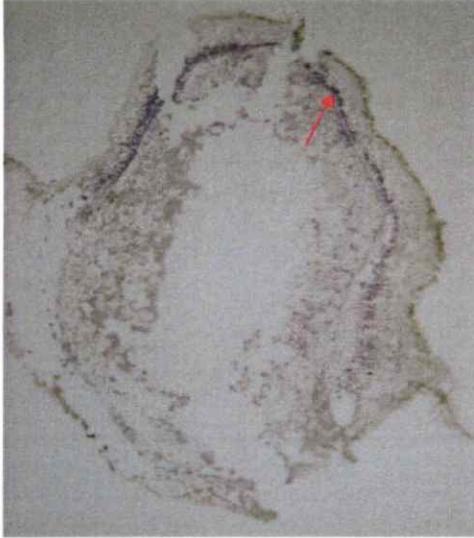
Durante la reacción del NBT/BCIP con la fosfatasa alcalina dependiendo del tiempo de exposición se puede tener mayor o menor grado de coloración.



Control negativo

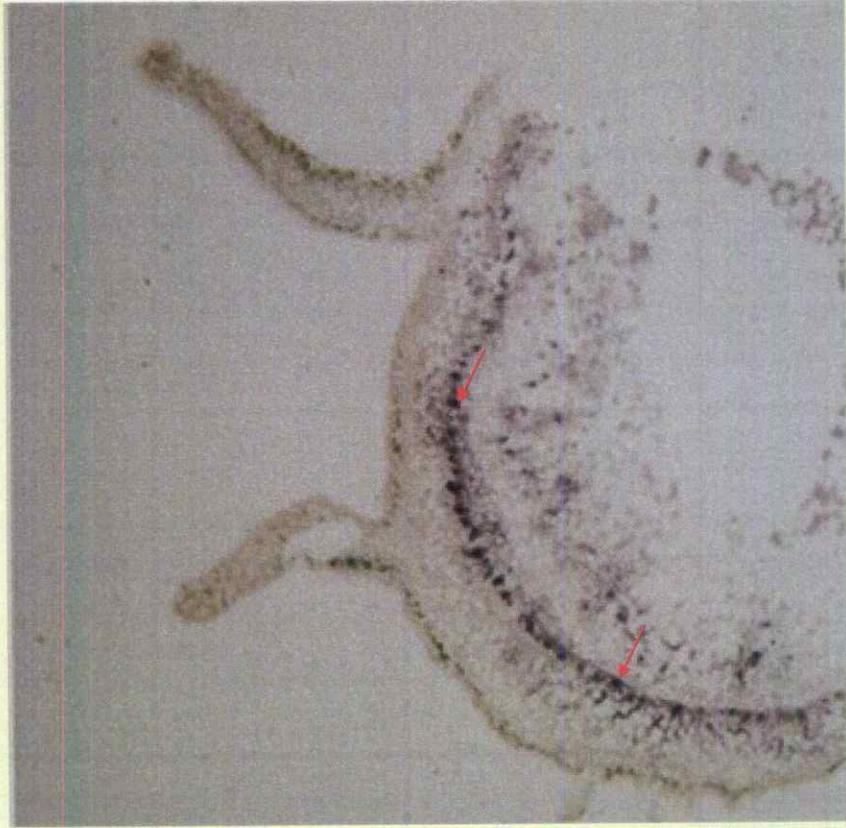
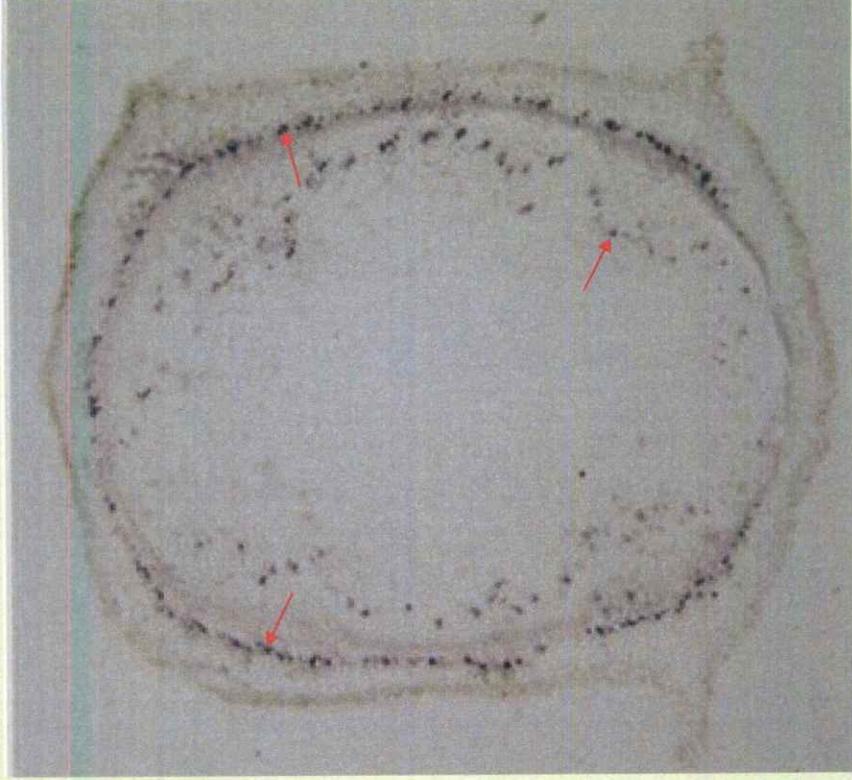
Tallo - stem





Tallo

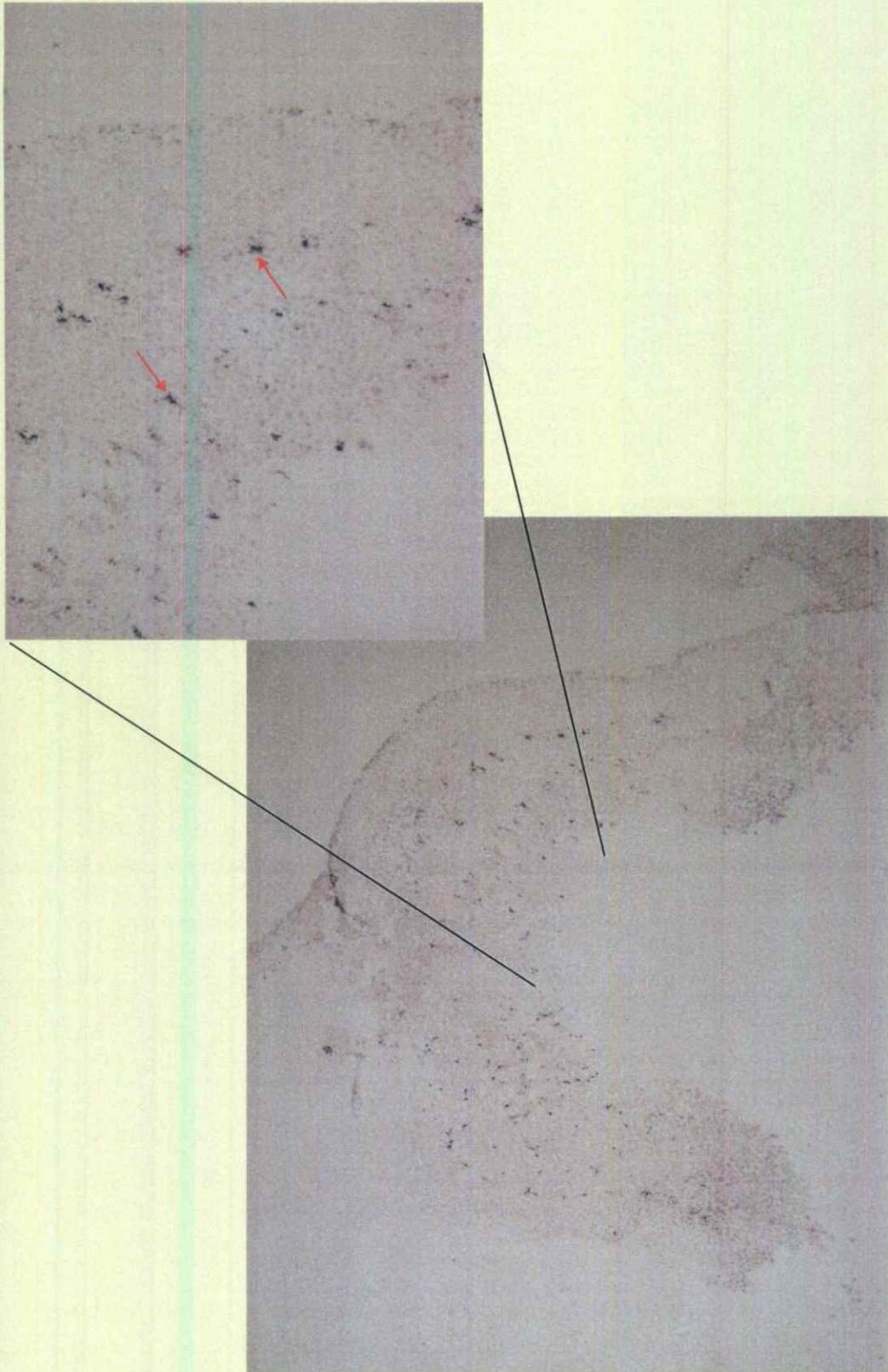
Tallo



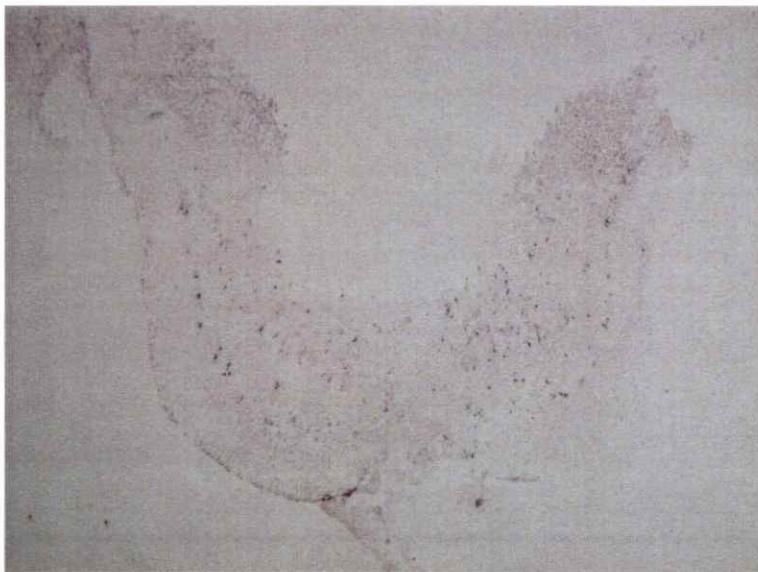
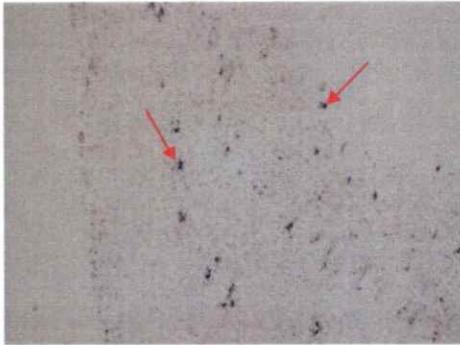
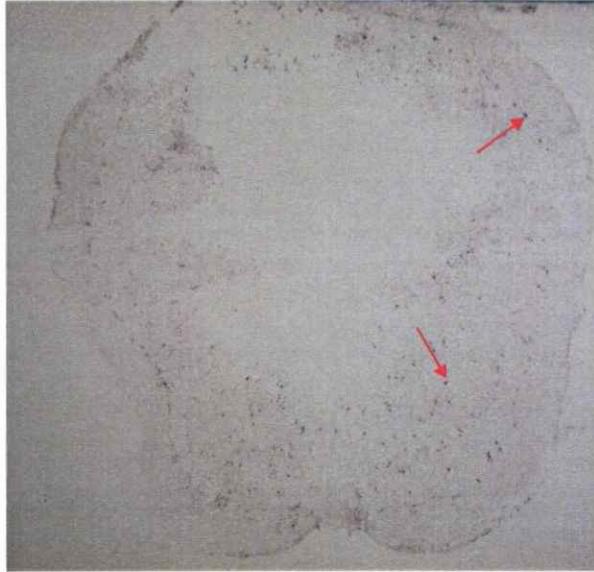


Tubérculo - tuber

Tubérculo

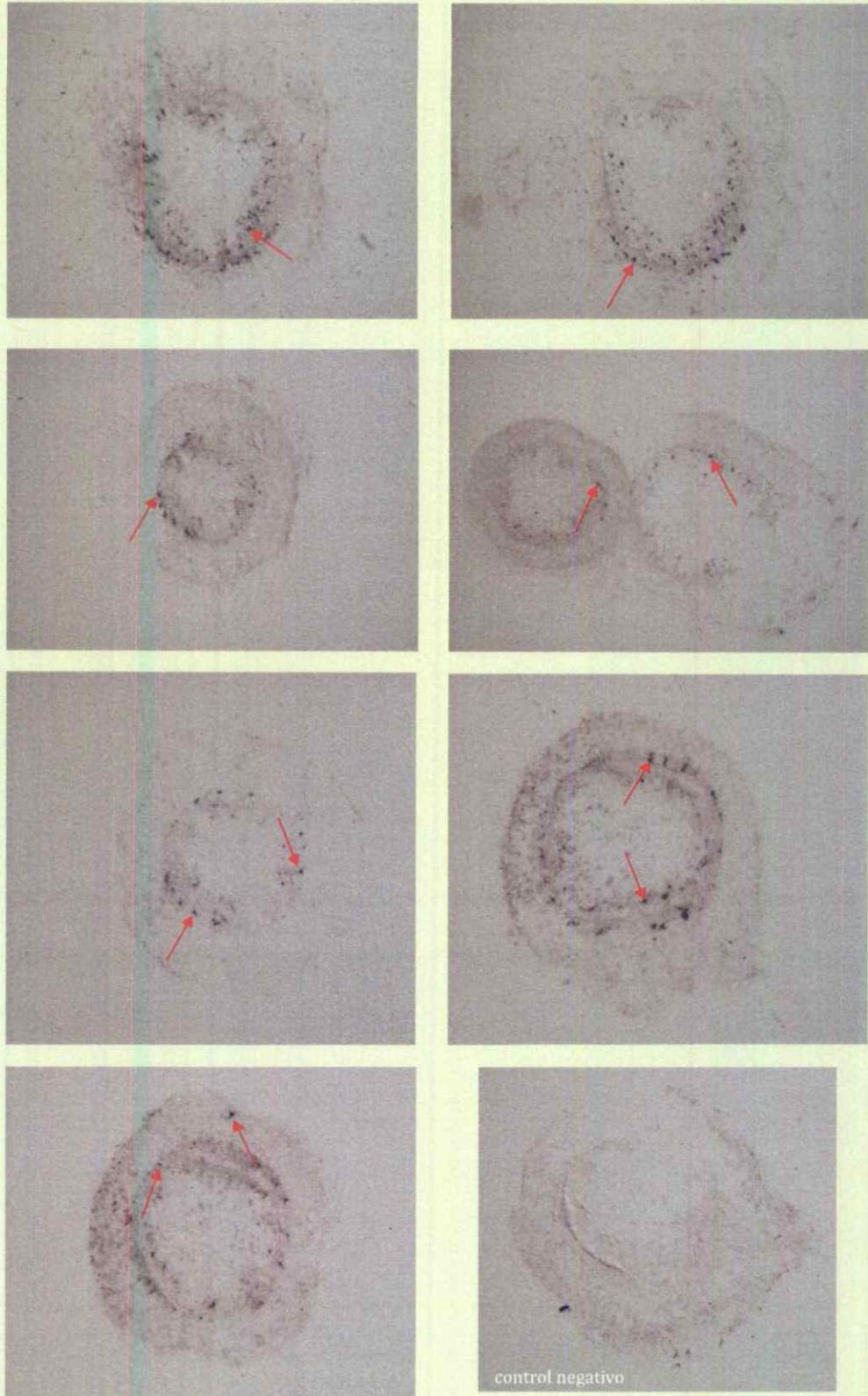


Ampliación de un segmento de un tubérculo, donde se aprecian acúmulos virales.

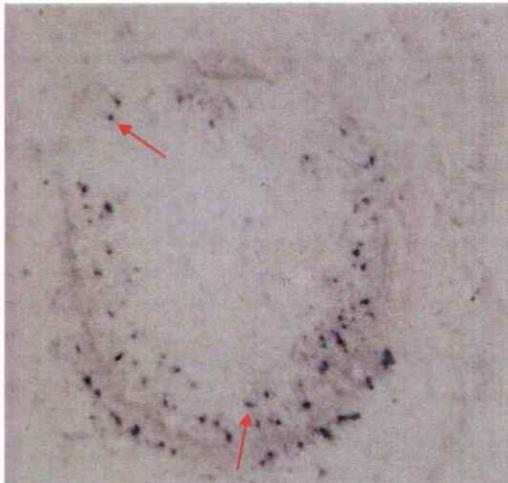
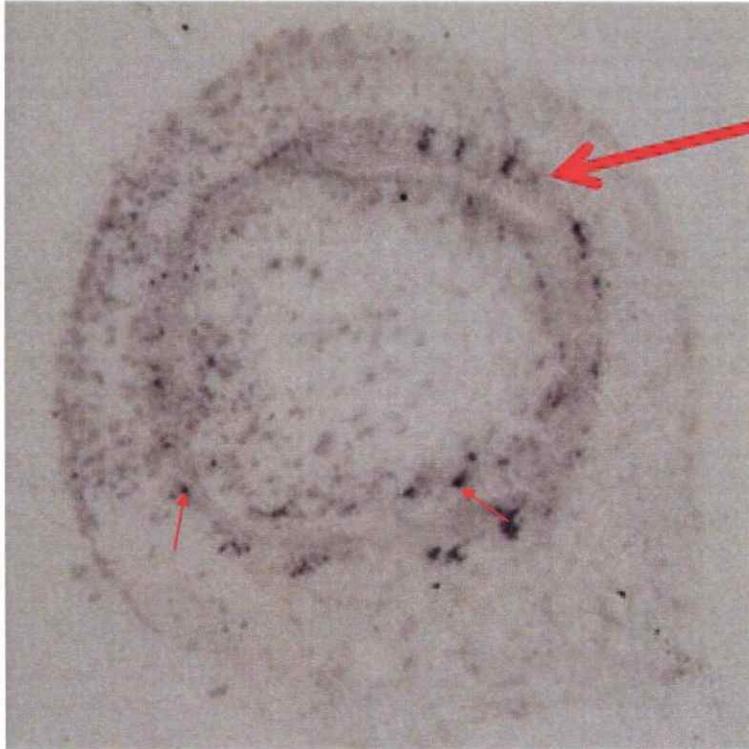


Para obtener mejores resultados en la inmunopresión de tubérculo, se recomienda después de hacer el corte, secar con una toalla de papel antes de hacer la impresión.

Primordios de tubérculo

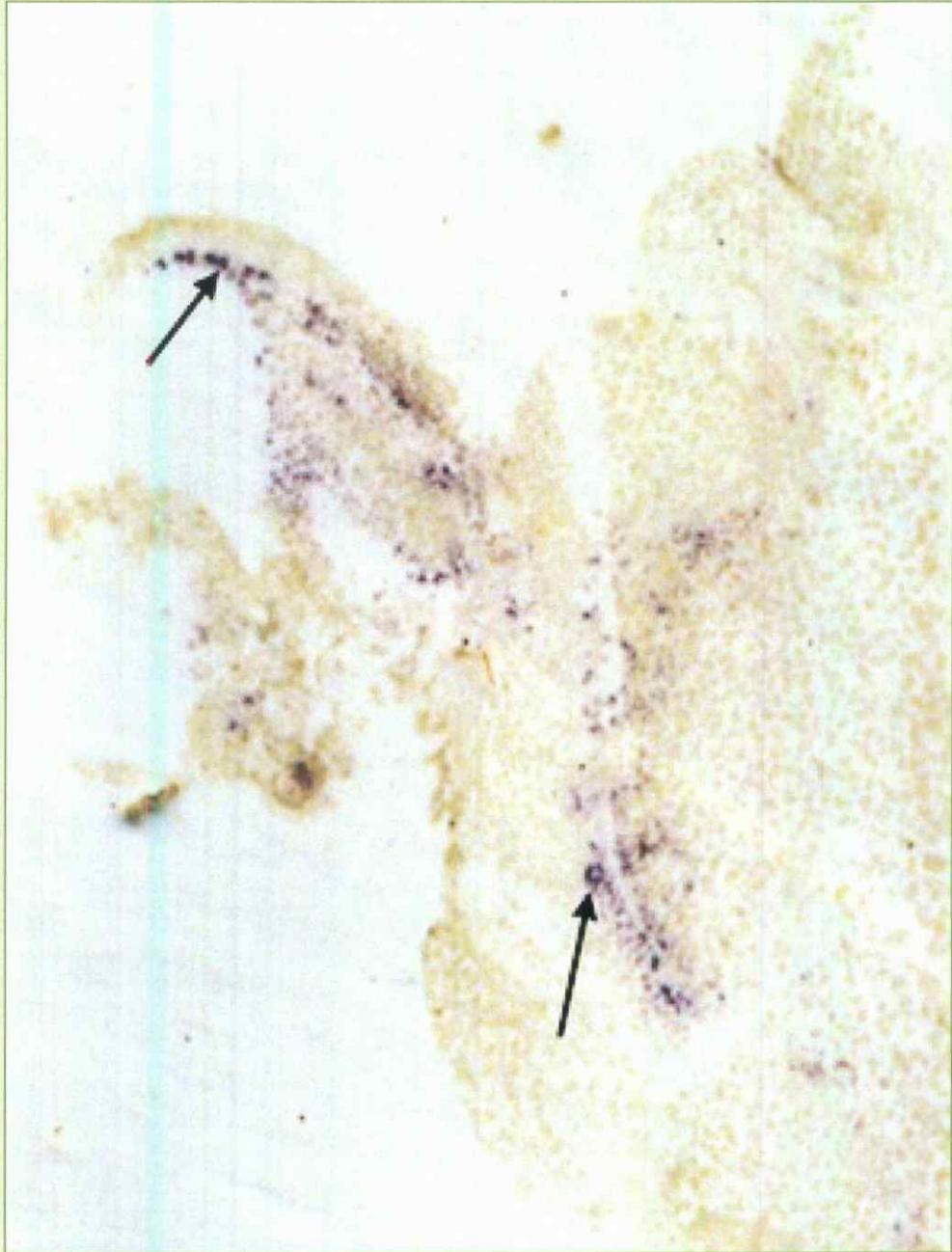


Corte transversal de primordios de papa donde se aprecia acúmulos en los haces vasculares.
Tener en cuenta que para obtener una buena impresión es necesario ser cuidadoso
a la hora de hacer el corte, porque estos son muy frágiles.



Primordio - shoot

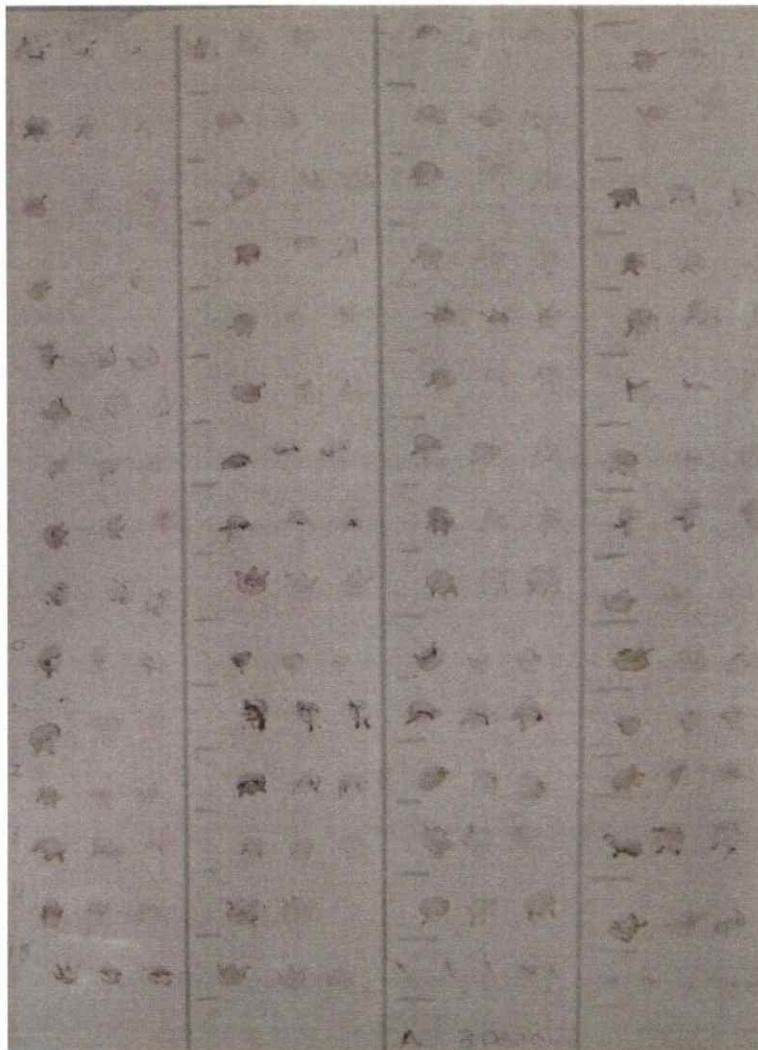
Primordio - shoot



Corte longitudinal de primordios de papa donde se aprecia acúmulos en los haces vasculares.

Costos

El costo de una muestra por ELISA (cuantitativa) varía entre 5.000 y 56.000 pesos colombianos basados en muestras de una placa de ELISA que contiene 96 pozos para 40 muestras aproximadamente. El costo por IMI (cualitativa) de evaluación de una muestra se puede reducir aproximadamente en un 20%, teniendo en cuenta que los valores se basan en la evaluación de una membrana de 10 x 10 cm en la que se pueden imprimir 100 muestras. La membrana de nitrocelulosa puede guardarse durante mucho tiempo en condiciones óptimas.



Membrana revelada

Referencias

- Arciniegas, N., Guzmán-Barney, M., Ñustez, C.** (2003). Metodología de evaluación de resistencia al virus del amarillamiento de las venas de la papa (PVV) en genotipos de la colección central colombiana de *Solanum Phureja*. Armenia. Junio 25-27. XXIV Congreso de la Asociación Colombiana de Fito-patología ASCOLFI *Memorias pp: 25. Publicación Ascolfi*.
- Clark M F& Adams A N (1977)**. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-83.
- Franco-Lara, L., Rodríguez,D and Guzmán-Barney, M.** 2013. Prevalence of *Potato yellow vein virus* (PVV) in *Solanum tuberosum* Group Phureja fields in three states of Colombia. *Am. J. Potato Res.* DOI 10.1007/s12230-013-9308-1
- Guzmán-Barney, M., Caro, M., García, Y.** 2002. Técnica de inmunoimpresión en membranas de nitrocelulosa: una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PLRV, PVX, PVY y PVS que infectan a la papa *Solanum* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología Vol. IV (2): 45–51 (2002).* ISSN 0123-3475
- Guzmán-Barney, M., Ruiz, E., Arciniegas, N and Coutts, R.H.A.** 2006. Occurrence and variability of *Potato yellow vein virus* in the three departments of Colombia. *J. Phytopathology*, 154: 748-750 (2006). ISSN 0931-1785
- Guzmán-Barney, M., Hernández, A. Franco-Lara, L.** 2013. Tracking foliar symptoms caused by tuber-borne *potato yellow vein virus* (PVV) in *Solanum phureja* (Juz et Buk) cultivar “Criolla Colombia” (2013), (DOI). *American Journal of Potato Research.* 10.1007/s12230-013-9303-6
- Guzmán-Barney, M., Rodríguez, P.** 2010. Susceptibility of *Solanum phureja* (Juz et Buk) to *potato yellow vein virus*. 2010. *Revista Agronomía Colombiana* 28 (2): 219-224. ISSN 01219965
- Guzmán, M., Román, V., Franco, L., Rodríguez, P.** 2010. Evaluación serológica de cuatro virus en accesiones colombianas de papa (*Solanum* spp). *Revista Agronomía Colombiana.* 28 (2):225-234. ISSN 01209965
- Salazar, L. F., Müller, G., Querci, M., Zapata, J. L. & R. A. Owens.** 2000. *Potato yellow vein virus*: its host range, distribution in South America and identification as a Crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Annual Applied Biology.* 137:007-019

Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología, Laboratorio de Virus Vegetales
Ciudad Universitaria - carrera 30 n.º 45 - 03
PBX: (57-1) 316 5000 ext. 16973

Consulte nuestra página web: www.ibun.edu.co
mmguzmanb@unal.edu.co



Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología
Laboratorio de Virus Vegetales
Ciudad Universitaria - carrera 30 n.º 45 - 03
(57-1) 316 5000 ext. 16973

Consulte nuestra página web: www.ibun.edu.co
mmguzmanb@unal.edu.co

