

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**DIAGNÓSTICO DEL POTYVIRUS Y DE LA PAPA
VARIANTE NECRÓTICA (PVY^N) EN TUBÉRCULO-
SEMILLA DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)
CANADIENSE //**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA:

MARTÍN CRUZ FLORES



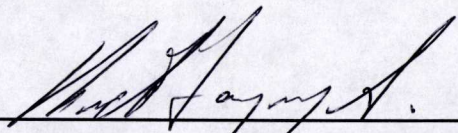
Chapingo, México, Mayo de 2001

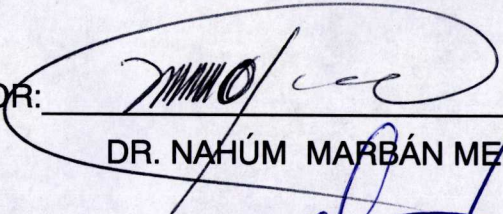
B.16 95495

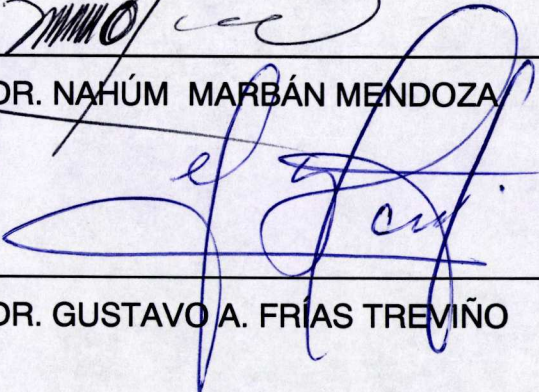
**Diagnóstico del potyvirus Y de la papa variante necrótica (PVY^N) en
tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) canadiense**

Tesis realizado por **Martín Cruz Flores** bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener
el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:  A-38169
DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

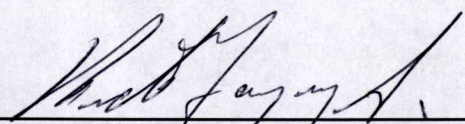
ASESOR: 
DR. NAHÚM MARBÁN MENDOZA

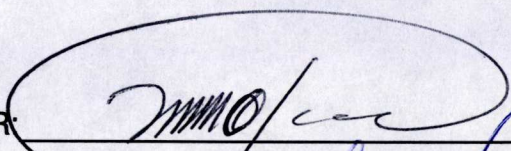
ASESOR: 
DR. GUSTAVO A. FRÍAS TREVIÑO

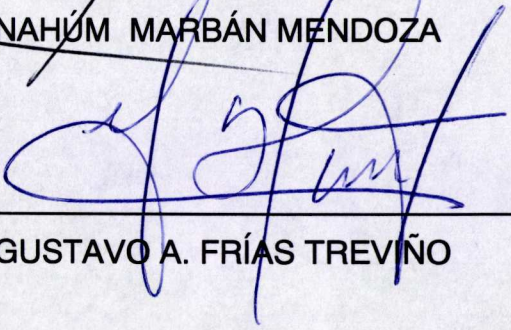
Chapingo, México. Mayo de 2001.

**Diagnóstico del potyvirus Y de la papa variante necrótica (PVY^N) en
tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) canadiense**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Martín Cruz Flores** autor
de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo
constituido por:

PRESIDENTE: 
DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR: 
DR. NAHÚM MARBÁN MENDOZA

ASESOR: 
DR. GUSTAVO A. FRÍAS TREVIÑO

Chapingo, México. Mayo de 2001.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y para mi superación profesional.

A las Autoridades de la Dirección General de Sanidad Vegetal, por permitirme realizar mis estudios de Maestría.

Al personal del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario, por su colaboración en la realización de la presente investigación.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por su apoyo, colaboración en mi trabajo de investigación.

Al Dr. Nahúm Marbán Mendoza, por sus atinados aportaciones, recomendaciones y sugerencias en la revisión del presente tesis.

Al Dr. Gustavo A. Frías Treviño, quien como mi padre académico, siempre me ha conducido con sus sabios consejos a realizar trabajos de investigación en beneficio de la agricultura mexicana.

DEDICATORIA

A mis papas: *Dionila y Máximo*, quienes con sus sabios consejos, poyo moral y económico han hecho una realidad mi superación académica.

A mi esposa: *Minerva*, quien en todo momento me ha comprendido y apoyado para que continúe mi superación profesional.

A mis hijos: *Yoselin Erendira, Myrna Eslin, José Martín Dirceu y Marco Antonio*, quienes con su ternura, cariño y sus bendiciones, han impulsado para que logre uno más de mis metas trazadas en la vida.

A mis hermanos: *Marcela, Marcos, Miguel, Roberto, Minervo, Juan y Rafaela*, para que siempre permanezcan unidos y tomen un ejemplo a seguir en sus futuras aspiraciones personales.

DATOS BIOGRÁFICOS

Martín Cruz Flores, nació el 11 de septiembre de 1970 en La Ceiba, Chicontepec, Ver. Realizó sus estudios de primaria en la Escuela "Ursulo Galván" en 1976-1982 en la misma localidad; Secundaria en la ETA No. 9 de 1982-1986 y Nivel Medio en el CBTa No. 145 en 1986-1989 en la congregación de Tlacolula, Chicontepec, Ver. De 1989-1993, realizó su estudio superior en la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", en Buenavista Saltillo, Coahuila, obteniendo el grado de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo en marzo de 1994 y ha obtenido las siguientes distinciones: Diploma de Primer Lugar en aprovechamiento académico de la especialidad de Técnico Agropecuario de la generación 1986-1989; Diploma de Primer Lugar en aprovechamiento académico de la especialidad Tronco Común durante el periodo enero-junio de 1991; Diploma de Segundo Lugar en aprovechamiento académico de la especialidad de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo durante el periodo 1989-1993 y Mención Honorífica. De mayo de 1994 a la fecha, labora en el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección General de Sanidad Vegetal como Coordinador Técnico del Área de Virus Fitopatógenos. Ha participado en cursos nacionales e internacionales sobre métodos de detección de virus fitopatógenos.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE CUADRO.....	lx
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos Generales.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Virus Y de la Papa (Potato Y Potyvirus).....	4
Acrónimo.....	4
Sinonimias.....	4
Taxonomía.....	4
Propiedades del virión.....	4
Relaciones serológicas.....	5
Propiedades biológicas.....	5
Distribución geográfica y ecológica.....	7
Enfermedades Virales Detectadas en el Cultivo de la Papa	
en Canadá.....	7
Métodos de Detección.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Muestreo de Tubérculos.....	11
Análisis de Tubérculos de Papa por Serología “ELISA”.....	13
Inoculación y Caracterización Biológica.....	16

RESULTADOS.....	18
Análisis de Tubérculos por ELISA.....	18
Caracterización Biológica en <i>Nicotiana tabacum</i> var. samsun.....	19
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	26
APÉNDICE	

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Identificación de serotipos PVY ^N , PVY ^O y PVY ^C basado en la reacción de 7 anticuerpos monoclonales con una colección internacional de 52 variantes del PVY (Ellis <i>et al.</i> , 1997).....	10
Cuadro 2. Cantidad de remisiones analizadas y destino final del tubérculo-semilla de papa canadiense sujeto al muestreo para el diagnóstico al PVY ^N	12
Cuadro 3. Reacción serológica y de bioensayo con savia extraída de tubérculos-semilla de papa importados de Canadá durante 1997-1999.....	20
Cuadro 4 Reacción de plántulas de <i>Nicotiana tabacum</i> var. samsun inoculadas con savia de hojas de papa ELISA/positivas a PVY ^N	21

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Estructura genómica y proteínas codificadas por el genoma del PVY.....	5
Figura 2 Secuencia de procedimientos para la detección serológica y confirmación biológica de tubérculos infectados con PVY ^N	17
Figura 3. Síntomas inducidos por el PVY ^N en <i>Nicotiana tabacum</i> var samsun. a) necrosis de nervadura, b) de pecíolo, y c) de tallo; d) colapso y muertes de hojas y e) mosaicos cloróticos y arrugamiento de hojas apicales.....	22

DIAGNÓSTICO DEL POTYVIRUS Y DE LA PAPA VARIANTE NECRÓTICA
(PVY^N) EN TUBÉRCULOS-SEMILLA DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)
CANADIENSE

RESUMEN

Canadá es el principal país proveedor de tubérculos-semilla de papa para México, lo cual representa un alto riesgo de introducir la variante necrótica del potyvirus Y de la papa (PVY^N), clasificado como plaga A1 de importancia cuarentenaria en el territorio nacional Mexicano. Considerando que la detección específica y confiable de dicha variante requiere de cotejos serológicos y de bioensayo complementarios, en el presente trabajo se describen dichos cotejos en muestras de tubérculos procedentes de Canadá recibidos durante el período 1997-1999. Se utilizó serología enzimática (ELISA) con cuatro diferentes anticuerpos y posterior inoculación mecánica de muestras positivas a *Nicotiana tabacum* var. Samsun. De 172 embarques analizados en total, siete, de 16 muestras positivas al PVY, se identificaron como variante necrótica (PVY^N) en 1997; dos de 23 en 1998 y ninguna de 99 en 1999 (14, 8.7 y 0%, respectivamente). Los antisueros 4C3 (policlonal) y O+C (monoclonal) detectaron al virus, pero fueron los monoclonales 1F5 y Rose los que especificaron la presencia del PVY^N. El bioensayo con tabaco confirmó dicha presencia. Se concluye que para detectar a dicha variante se debe de utilizar el antisuero 4C3 y/o el Rose.

Palabras clave adicionales: ELISA, anticuerpos monoclonales.

DIAGNOSIS OF POTYVIRUS Y NECROTIC STRAIN (PVY^N) IN CANADIAN POTATO SEED TUBER (*Solanum tuberosum* L.).

SUMMARY

Canada is the main supplier of potato seed tubers for México. This commodity represents a high risk of introducing the necrotic strain of potato virus Y (PVY^N), classified as A1 quarantine pest within Mexican territory. Considering that the specific and reliable detection methods required for the diagnosis of this virus imply serology and complimentary bioassays, this report includes the results obtained with such indexing protocols on potato tuber samples introduced to Mexico from Canada during 1997-1999. Enzymatic serology (ELISA) with four antisera was implemented, followed by mechanic inoculation with positive samples to *Nicotiana tabacum* cv Samsun. From a total of 172 shipments tested, seven, out of 16 samples positive for PVY, were identified as the necrotic strain in 1997. Also, two out of 23 in 1998, and none from 99 in 1999 (14, 8.7, and 0%, respectively). The polyclonal antiserum 4C3 and the monoclonal O+C detected the virus; but the monoclonals 1F5 and Rose specifically identified the presence of PVY^N. It is concluded that to detect such virus strain, either antisera 4C3 and/or Rose should be used.

Additional key words: ELISA, monoclonal antibodies.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es susceptible a más de 300 plagas (Horton, 1992) y hospeda más de 25 enfermedades causadas por virus fitopatógenos. No todos los virus de la papa causan pérdidas significativas y solo unos cuantos son considerados de importancia económica. Entre estos destacan el Luteovirus enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) y el Potyvirus Y de la papa (PVY). Los virus considerados de menor importancia pueden causar daños severos bajo condiciones particulares del cultivo (Salazar, 1995).

La papa canadiense, presenta varios problemas fitopatológicos de importancia cuarentenaria para México como: *Oospora pustulans*, *Synchytrium endobioticum* (Provincia de New Found Land), *Helicobasidium brebissonii*, *Corynebacterium sepedonicum*, *Ditylenchus dipsaci* (Alberta, British Columbia, Ontario y Prince Edward Island), *Typula paludosa*, Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (PSTVd), Curtovirus del rizado apical de la remolacha (BCTV), Ilarvirus estriado del tabaco (TSV), Nucleorhabdovirus del enanismo amarillo de la papa (PYDV) y el Potyvirus Y de la papa variante necrótica (PVY^N); los cuales son considerados como plagas A1 y de importancia cuarentenaria para México (NOM-012-FITO, 1995 y EPPO, 1999).

México, importa tubérculo- semilla de papa de Canadá, lo cual representa un alto riesgo de introducir el PVY^N. El PVY^N ha sido reportado en Canadá y EUA. En México no se han observado los síntomas severos causados por este virus ni en tabaco ni en tomatillo, por lo que es considerada una plaga (A1) de importancia cuarentenaria (NAPPO, 1988), es decir, no se ha detectado en el país, ni en el cultivo y es regulado mediante la Norma Oficial Mexicana NOM-

012-FITO-1995 y específicamente por el Acuerdo Fitosanitario y de Certificación entre Canadá y México Relativo al Comercio Bilateral de Semilla de Papa.

El virus Y de la papa variante necrótica (PVY^N) es una variante del PVY, que no causa síntomas en papa, pero produce necrosis y muerte cuando infecta tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomatillo (*Physalis floridana*) (McDonald y Kristjansson, 1993). El PVY^N, como la variante común (PVY^O) tiene un rango de hospedantes amplio, entre los que se encuentran cultivos de importancia económica para México como el tomate, tomatillo, chile y tabaco, así como otras especies de las familias chenopodiacea, fabacea y asteracea.

La detección serológica del PVY^N requiere de más de un anticuerpo para poder diferenciar a esta variante del resto de las variantes del PVY, lo que incrementa el costo de diagnóstico y además pueden dar falsos positivos, es decir, basados únicamente en serología, el virus puede identificarse erróneamente como PVY^N cuando realmente es PVY^O, lo que hace necesario recurrir a bioensayos como la inoculación en *Nicotiana tabacum* var. samsun que requiere de dos o tres semanas para desarrollar los síntomas de necrosis que permiten identificar la variante necrótica del PVY. Este bioensayo se complica por el hecho de que la reacción de necrosis también se produce por infecciones mezcladas de PVX+PVY. Adicionalmente, estos diagnósticos (ELISA y bioensayo) solo puede llevarse a cabo con brotes u hojas de la planta, ya que requiere concentraciones de virus que solo se encuentran en este tipo de tejido y no en los tubérculos dormantes.

Para resolver la problemática del diagnóstico del PVY^N en tubérculos-semilla de papa canadiense, en el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos:

Objetivos Generales

Caracterizar serológicamente y biológicamente el PVY^N *Solanum tuberosum* y *Nicotiana tabacum* var. samsun.

Evaluar la eficiencia de los antisueros disponibles en el mercado para detectar PVY^N aislados de tubérculos de papa de origen canadiense.

REVISIÓN DE LITERATURA

Virus Y de la Papa (Potato Y Potyvirus)

Acrónimo. PVY.

Sinonimias. Potato acropetal necrosis virus, potato severe mosaic virus y tobacco vein-banding virus (Smith, 1972); rugose mosaic, leaf streak y stipple streak (Hooker, 1980).

Taxonomía. El virus Y de la papa se ha clasificado de la siguiente manera (Dhar *et al*, 1994 y Büchen-Osmond, 1995):

Familia: Potyviridae.

Género: Potyvirus.

Virus tipo: Virus Y de la Papa.

Propiedades del virión. El PVY es un potyvirus de partículas flexuosas helicoidales de 730 x 11 nm (Hooker, 1980) y presenta diferentes aislamientos agrupados en tres variantes que se distinguen de acuerdo al daño en base a síntomas que induce en papa, tabaco u otros hospedantes. Las variantes se les ha denominado: común (PVY^O), línea punteada (PVY^C), necrosis de la nervadura del tabaco (PVY^N) (De Box, 1980) y necrosis del tubérculo (PVY^{NTN}) (Le Romancer *et al.*, 1994). A la variante PVY^N se le han identificado 5 serotipos (N1, N2, N3, N4 y N5) con base a la reacción de 7 antisueros monoclonales (Ellis *et al.*, 1997)

El PVY^O presenta una densidad flotante de 1.323 g/cm³ en CsCl (y 1.326 g/cm³ para el PVY^N); coeficiente de sedimentación de 145S; punto de inactivación térmica de 50-62 °C y una longevidad *in vitro* de 7-50 días a temperaturas de 18 a 22 °C (Smith, 1981); está conformado de 93.6-94.6% de proteína y 0% de lípidos y contiene un 5.4 a 6.4% de ARN, siendo una molécula linear de cadena sencilla, sentido positivo (Francki *et al.*, 1985). Las funciones del genoma del PVY están representadas en la Figura 1 (Salazar, 1995).

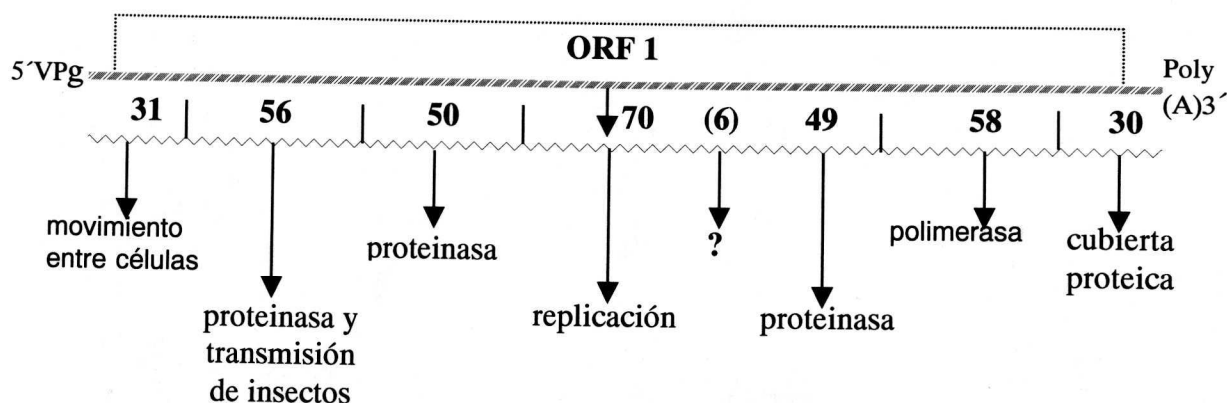


Figura 1. Estructura genómica y proteínas codificadas por el genoma del PVY.

Relaciones serológicas. Este virus está serológicamente relacionado con viriones de jaspeado del tabaco, mosaico del beleño (*Hyoscyamus niger*), A de la papa, moteado de la nervadura del chile y con el moteado del bidens (Büchen-Osmond, 1998).

Propiedades biológicas. Los síntomas que inducen el PVY^O y PVY^C generalmente son una necrosis del follaje y mosaico como síntoma primario, mientras que PVY^N causa solo mosaico o moteado. Los síntomas de mosaico pueden enmascarse con temperaturas fuera del rango de 10 a 25 °C. No se ha observado síntomas de PVY^O en los tubérculos, sin embargo una variante del grupo de PVY^N (llamado PVY^{NTN}) causa anillos necróticos en los tubérculos (Kus, 1990).

La necrosis de nervaduras semejantes a infecciones inducidas con PVY^O son observadas frecuentemente entre algunas progenies híbridas de papa, pero esta anomalía no puede ser transmitida por injerto a cultivares susceptibles a este virus. La necrosis genética se presenta en las nervaduras primarias, mientras que la necrosis inducida por PVY aparecen en las nervaduras primarias, secundarias y terciarias (Salazar, 1995).

El PVY infecta a muchas especies de plantas, especialmente en las solanáceas, pero también son susceptibles ciertas especies de la familia chenopodiaceae y fabaceae (Hooker, 1980). Las principales especies de plantas susceptibles al PVY son: *Capsicum annuum*, *Chenopodium album*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cyphomandra betacea*, *Hyoscyamus aureus*, *H. desertorum*, *Lycium* spp, *Lycopersicon esculentum*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana benthamiana*, *N. debneyii*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. plumbaginifolia*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *Physalis floridana*, *Ranunculus* spp, *Solanum chacoense*, *S. demissum*, *S. luteum*, *S. tuberosum* y *Tinantia erecta* (Stibick, 1994).

Espino et al, (1997) identificaron a *Argyranthemum gracile*, *Calendula arvensis*, *Convolvus althaeoides*, *Foeniculum vulgare*, *Forsskaolea angustifolia*, *Hedypnois cretica*, *Hirschfeldia incana*, *Malva parviflora*, *Patellifolia patellaris*, *Sonchus oleraceus*, *Urospermum picrides* y *Lavandula canariensis* como nuevas especies de vegetales que son hospedantes del PVY. Asimismo reportan a *Argyranthemum gracile* y *Lavandula canariensis* como hospedantes del PVY^N.

Todas las variantes excepto PVY^C, son fácilmente transmitidas por varias especies de áfidos, siendo *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* los vectores más importantes en la naturaleza (Salazar, 1995). Un mayor número de vectores se ha reportado para el PVY^N, entre estos se puede mencionar a *Accyrthosiphon primulae*, *A. pisum*, *Aphis fabae*, *A. pomi*, *A. sambuci*, *Aulacortum solani*, *Brachycaudus* spp, *B. hebechrysi*, *Capitophorus hippophaes*,

Cavariella aegopodii, *C. pastinacae*, *Cryomyzus galeopsidis*, *C. ribis*, *Dysaphis* spp, *Hyadaphia erysimi*, *Hyalopterus pruni*, *Hydaphis foeniculi*, *Hyperomyzus lactucae*, *Macrosiphum euforbiae*, *Metopolophium dirhodum*, *Myzus certus*, *M. persicae*, *Neomyzus circumflexus*, *Phorodon humuli*, *Rhopalosiphum insertum*, *R. padi*, *Staphyleae tulipaellus*, *Sitobion avenae*, *S. fragariae* y *Uroleucon* spp (Chuquillanqui, no publicado, citado por Salazar, 1995).

Distribución geográfica y ecológica. Las variantes del PVY^O son de distribución mundial y respecto al PVY^C ha sido reportado en Australia, Nueva Zelanda, Europa, India y África del Sur (Barnett, 1992); el PVY^N ocurre en los países de Europa como: Bulgaria, Suiza, Holanda, Inglaterra, Alemania, Hungría, Italia, Escocia, Polonia y Rusia. Asimismo, se tiene reportes de su presencia en Nueva Zelanda, algunas regiones de África y Sudamérica (Salazar, 1995). En Canadá el PVY^N se le ha encontrado en en las provincias de New Brunswick, Nova Scotia, Ontario, Prince Edward Island y Québec (Singh, 1992; McDonald y Kristjansson, 1993). El PVY^{NTN} fue reportado por primera vez en Hungría en 1980; posteriormente en Grecia, Portugal e Italia en 1994, 1997 y 1998, respectivamente (Bem y Varveri, 1999). Asimismo, se ha reportado la presencia de este virus en California, USA (McDonald y Singh, 1993).

Enfermedades Virales Detectadas en el Cultivo de la Papa en Canadá

Los principales virus detectados en papa Canadiense son: Potyvirus Y de la papa variante común (PVY^O) (Boiteau *et al.*, 1988), Potexvirus X de la papa (PVX), Carlavirus S de la papa (PVS), Potyvirus A de la papa (PVA), Luteovirus enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) (Singh y Somerville, 1983). Curtovirus del rizado apical de la remolacha (BCTV), Ilarvirus estriado del tabaco (TSV), Nucleorhabdovirus del enanismo amarillo de la papa (PYDV) (EPPO, 1999) y el Potyvirus Y de la papa variante necrótica (PVY^N) (Singh, 1992; McDonald y Kristjansson, 1993).

En la estación de verano de 1990-91, el PVY^N fue detectado en New Brunswick y Principe Edward Island, en una incidencia de 0.43 y 1.57%, respectivamente en la variedad atlantic y en la estación de invierno de 1990-91, fue diagnosticado en 21/36, 4/32, 1/11 y 1/17 (positivos al PVY^N /parcelas de cada rancho) en las variedades de Atlantic, Russet Burbank, Shepody y Superior, respectivamente, positivas a este fitopatógeno (Singh, 1992).

Métodos de Detección

El diagnóstico de PVY^N en diferentes países está basado en la propiedad de esta variante de inducir una severa necrosis en la nervadura en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. samsun) de 7 a 15 días después de la inoculación. Los primeros síntomas están confinados a las nervaduras secundarias, pero más tarde la necrosis se extiende a los pecíolos y tallos ocasionando un colapso de las hojas basales (Singh, 1992).

Solanum sparpilum y *S. brachycarpum*, se han utilizado también para la detección específica de PVY^N. Los síntomas que induce este virus en estos hospedantes son lesiones locales y necrosis en las nervaduras de 6-8 días después de la inoculación; finalmente produce la muerte de la planta (Singh y Singh, 1994). Sin embargo estos hospedantes presentan una desventaja, cuando se inoculan con PVY^N en plantas previamente infectadas con la variante común (PVY^O), se induce una protección cruzada al PVY^N y en consecuencia no se observan los síntomas característicos que induce el PVY^N en estos hospedantes (Singh y Singh, 1995).

Otras plantas que se han utilizado para el diagnóstico del PVY^N son: *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum frutescens*, *Solanum tuberosum*, *S. demissum*, *Physalis floridana*, *P. angulata*, *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa*, que reaccionan con síntomas similares a los inducidos por otros virus de

la papa, lo que confunde el diagnóstico de PVY^N (McDonald y Kristjansson, 1993).

El método serológico de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas (ELISA) doble anticuerpo (DAS), es la variante más comúnmente utilizada del ELISA y ha demostrado su confiabilidad para la detección de PVY^N. Esta prueba consiste en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno seguida de la adición de los antígenos o fitopatógenos los cuales reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa. Para formar el sandwich se agregan nuevamente anticuerpos ligados con enzimas que se adhieren a los patógenos capturados en la placa. Una vez formada la secuencia biológica de anticuerpo+antígenos+anticuerpo ligado a una enzima, se adiciona el sustrato, el cual es hidrolizado por la enzima dando lugar a un cambio de color de la solución, lo que permite apreciar los resultados visualmente y cuantificarlos (Clark y Adams, 1977, Cruz y Frías, 1997). A la fecha se han desarrollado y evaluado varios antiseros monoclonales para la detección de este fitopatógeno (Cuadro 1) siendo el VN-295.5 (de Rose y Hubbard, 1986) y Mab 4E7 (de Oshima *et al*, 1990) los antiseros con mayor especificidad para detectar variantes del PVY^N presentes en Norteamérica (Singh *et al*, 1993). McDonald *et al* (1994), evaluaron varios anticuerpos monoclonales (4E7, Bioreba, 1F5 y 295.5) utilizando aislamientos del PVY obtenidos de campos Canadiense y los resultados obtenidos fueron que todos los Anticuerpos monoclonales reaccionan en cierto grado con los aislamientos de la variante común del PVY (PVY^O), pero el 4E7 fue el más específico al PVY^N, sin haberse observado reacción cruzada al nivel o por enzima de la relación señal ruido límite de 4:1. Ellis *et al* (1996), también evaluaron varios anticuerpos monoclonales (295.5, 4E7, C9, 1F5, 8D10, 59H, Mab2, 5B9, 2G7, 6H11 y 4C3) utilizando 24 aislamientos del PVY^N, 21 del PVY^O, 2 del PVY^C y otros siete aislamientos relacionados serologicamente, provenientes de varias partes del mundo. Los anticuerpos monoclonales 295.5 y 1F5, demostraron ser más específicos al PVY^N.

Cuadro 1. Identificación de serotipos PVY^N, PVY^O y PVY^C basado en la reacción de 7 anticuerpos monoclonales con una colección internacional de 52 variantes del PVY (Ellis *et al.*, 1997).

SEROTIPOS	NO. DE VARIANTES	REACCIÓN CON ANTICUERPOS MONOCLONALES						
		295.5	4E7	1F5	59H	Mab2	5B9	6H11
PVY ^N								
N1	20	+	+	+	-	-	+	-
N2	2	-	+	+	-	-	+	-
N3	1	-	+	-	-	-	+	-
N4	1	+	+	+	-	-	-	-
N5	1	+	-	+	-	-	-	-
PVY ^O								
O1	8	-	-	-	+	+	+	-
O2	5	-	-	-	-	+	+	-
O3	4	-	-	-	+	+	-	-
O4	2	-	+	-	+	+	-	-
O5	2	-	+	+	+	+	-	-
O6	1	-	+	-	+	+	+	-
O7	1	-	-	-	-	+	+	-
O8	1	-	-	-	-	+	-	-
O9	1	-	-	-	-	+	+	-
PVY ^C								
C1	2	-	-	-	+	+	+	+

Estos resultados demuestran la gran especificidad de reacción de los anticuerpos monoclonales a serotipos del PVY^N, que pudiera ser un arma de doble filo. Asumiendo que se cuenta con uno solo de estos anticuerpos, se podría identificar la presencia de ciertas variantes del PVY^N, pero no detectar otras, pero si nuestro objetivo es la simple detección del PVY^N, no detectaríamos otras variantes con las que no reacciona el monoclonal.

En el presente trabajo se pretende identificar anticuerpos que reaccionen con las variantes necróticas del PVY, pero no con otras variantes usando aislamientos de Canadá.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo, se llevó a cabo de 1997-1999, en el Laboratorio de Virus Fitopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección General de Sanidad Vegetal (CNRDF-DGSV) y el Laboratorio de Fitovirología de la Universidad Autónoma Chapingo, analizando brotes de papa, procedentes de Canadá por medio de la técnica serológica ELISA (Clark, y Adams, 1977, Cruz y Frias, 1997).

Muestreo de Tubérculos

Los tubérculos para este estudio fueron muestreados durante 1997 a 1999 por inspectores fitozoosanitarios, tomando 400 tubérculos aleatoriamente en embarques de 30 toneladas. Los tubérculos se colocaron en cajas de carton o arpillas bolsas de poliestireno o cartón anotando su respectiva clave de identificación. Un total de 34,400 tubérculos provenientes de 172 embarques (Cuadro 2) fueron analizados, para detectar la presencia del PVY^N en el Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitaria (CNRDF).

Cuadro 2. Cantidad de remisiones analizadas y destino final del tubérculo-semilla de papa canadiense sujeto al muestreo para el diagnóstico al PVY^N.

DESTINO DEL TUBERCULO-SEMILLA	EMBARQUES/TUBERCULOS ANALIZADOS		
	1997	1998	1999
Chihuahua	10/2000	--	32/6,400
Coahuila	23/4,600	2/400	2/400
Estado de México	1/200	--	--
Hidalgo	1/200	--	--
Michoacán	4/800	--	--
Nuevo León	2/400	--	--
Puebla	6/1,200	--	--
Querétaro	1/200	--	--
Sinaloa	--	20/4000	11/2,200
Sonora	1/200	1/200	33/6,600
Veracruz	--	--	13/2,600
Zacatecas	1/200	--	8/1,600
Total	50/10,000	23/4,600	99/19,800

-- = No se recibieron tubérculos en el CNRDF para su diagnóstico al PVY^N con estos destinos.

Análisis de Tubérculos de Papa por Serología “ELISA”

Se analizaron los brotes de tubérculos recibidos, por medio de la técnica serológica ELISA, utilizando antisueros monoclonales (PVY4C3, PVYO+C, PVY^N1F5 y PVY^NRose) producidos por la compañía Agdia, Elkart, Indiana 46514, USA.

El antisuero PVY4C3, está formado por un anticuerpo policlonal y reacciona con todas las variantes del PVY; un conjugado enzimático que consta de dos partes: una (A) contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales con diferentes epítomos (anticuerpos generados contra diferentes regiones de la cubierta proteica) que reaccionan con todas las variantes del PVY. La otra parte (B) contiene anticuerpos anti-A producidos en una cabra y conjugados con la enzima fosfatasa alcalina.

El antisuero PVYO+C, cuyo anticuerpo también es policlonal y detecta todas las variantes del PVY; el conjugado (A) contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales que reacciona con las determinantes antigénicas de las variantes de los PVY^O y PVY^C y el (B) contiene anticuerpos policlonales anti-A conjugados a la enzima fosfatasa alcalina.

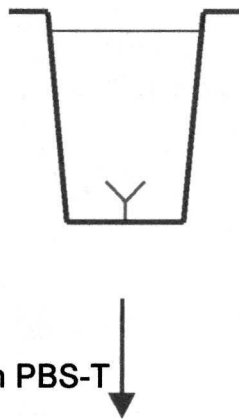
El antisuero PVY^N 1F5, contiene un anticuerpo policlonal que reacciona con todas las variantes del PVY. La diferencia con los antisueros descritos anteriormente radica en el conjugado enzimático, que contiene un anticuerpo

monoclonal (A) que reacciona con las determinantes antigénicas de las variantes necróticas del PVY (excepto con el serotipo N³ y reacciona con el serotipo O⁵ del PVY) y un conjugado enzimático (B) que contiene anticuerpos policlonales anti-A.

Con respecto al antisuero PVY^N Rose, también está compuesto por anticuerpos policlonales y el conjugado (A) es un anticuerpo monoclonal específico a la variante necrótica del PVY (no reacciona con el serotipo N^{2 y 3} del PVY y reacciona con el serotipo O⁷ del PVY).

El procedimiento TAS-ELISA que se utilizó para procesar la muestra fue el siguiente:

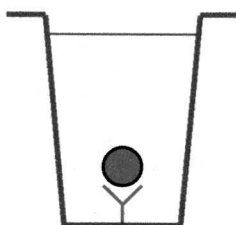
1.- Sensibilización de la placa.



Lavar la placa 4 veces con PBS-T

Se mezcló el anticuerpo policlonal PVY 4C3 en solución amortiguadora (SOLAM) de cobertura (pH 9.6) en una proporción 1:200. Posteriormente se depositaron 100 µl de la solución a los pozos de 4 placas de microtitulación y se incubaron 2 horas a temperatura de laboratorio.

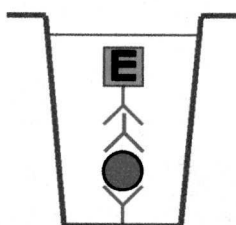
2.- Adición de la muestra.



Lavar la placa 6 veces con PBS-T



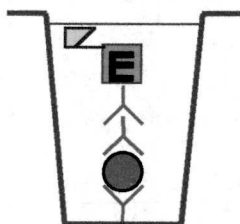
3.- Adición de la enzima conjugada.



Lavar 4 veces la placa con PBS-T



4.- Adición del sustrato.



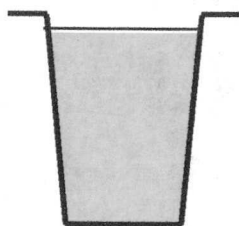
Se maceraron brotes de papa en bolsas de plástico con SOLAM de extracción (pH 7.4) en una proporción 1:10 (peso:volumen), respectivamente.

Se depositaron 100 μ l de extracto obtenida a 2 pozos de cada placa de microtitulación. Se incubaron 2 horas a temperatura de laboratorio.

En cuatro recipientes que contiene SOLAM de conjugado (pH 7.4) se mezclaron los anticuerpos monoclonales (A) y conjugados enzimáticos (B) de 4C3, O+C, 1F5 y Rose en una proporción de 1:200. Posteriormente se depositaron 100 μ l en los pozos de cada placa de microtitulación y se incubaron 2 h a temperatura de laboratorio.

Se diluyeron pastillas peletizadas de p-nitrofenil fosfato en SOLAM de sustrato en una proporción de 1 mg/ml de solución. Posteriormente, se adicionaron 100 μ l a los pozos de las placas y se incubaron de 10-15 minutos en lugar oscuro.

5.- Reacción positiva.



Cantidad de hidrólisis del sustrato es proporcional a la cantidad de partículas de virus.

Simbología:

Anticuerpo= 

Antígeno= 

Anticuerpo monoclonal= 

Enzima Conjugada con Anticuerpo= 

Sustrato= 

Inoculación y Caracterización Biológica

Los tubérculos que resultaron serológicamente positivos al PVY^N, se sembraron en macetas bajo Invernadero, para obtener plantas infectadas con el virus. Las hojas de cada una de estas plantas de papa se usaron para inocular 5 plantulas de *Nicotiana tabacum* var. samsun para confirmar y caracterizar biológicamente la detección serológica del PVY^N.

Las plantulas de tabaco se inocularon cuando presentaron una altura de 10 cm (6 hojas verdaderas). La inoculación se realizó con extracto obtenido de hojas de papa infectadas con el PVY^N, producto de la maceración con solución

amortiguadora de fosfato 0.03 M+glicina 0.05 M de pH 9.6, con la relación de 1 gramo de hojas jóvenes por 2 ml de solución amortiguadora. Un cotonete impregnado con el extracto se frotó sobre hojas apicales de tabaco previamente asperjadas con un abrasivo (carborundo de 600 mallas) para causar lesiones y facilitar la infección (Figura 2).

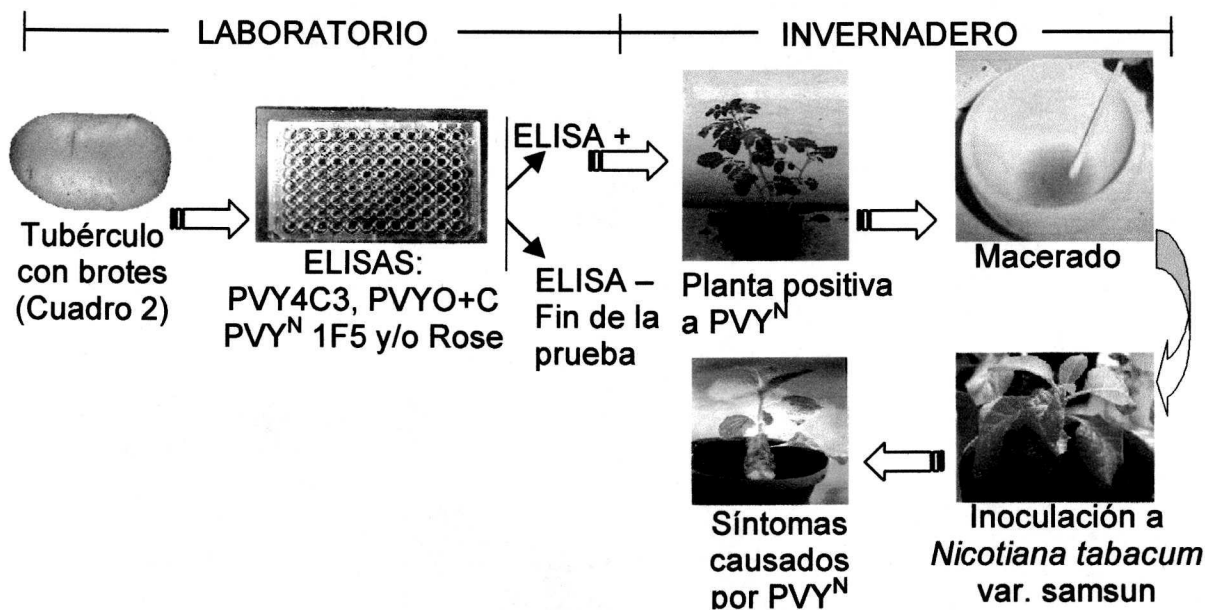


Figura 2. Secuencia de procedimientos para la detección serológica y confirmación biológica de tubérculos infectados con PVY^N.

RESULTADOS

Análisis de Tubérculos por ELISA

En 1997 se analizaron 50 embarques de muestras de papa provenientes de Canadá (Cuadro 2). De los cuales 23 tenían como destino al estado de Coahuila, 10 a Chihuahua, 6 a Puebla, 2 a Nuevo León, 4 a Michoacán, 1 a los Estados de México, Querétaro, Sonora , Hidalgo y Zacatecas. De los 50 embarques de papa analizados, ocho resultaron serologicamente positivos al PVY^N (Cuadro 3) y de estos siete produjeron necrosis en *Nicotiana tabacum* var samsun (Cuadro 4). El destino de estos embarques fue: Saltillo, Coahuila (3), uno a Aldama y Jiménez, Chihuahua (1 embarque por Municipio) y uno a Fresnillo, Zacatecas (1) y a Apan, Hidalgo (1).

Para 1998, se analizaron 23 embarques (Cuadro 2), 18 tuvieron como destino final, Los Mochis y Ahome, Sinaloa, dos a Saltillo, Coahuila y uno a Cajeme, Sonora. De los 23 embarques; 3 que tenían como destino a Los Mochis y Ahome, Sinaloa, resultaron serologicamente positivos al PVY^N (Cuadro 3) y de estos, 2 produjeron necrosis en *Nicotiana tabacum* var samsun (Cuadro 4).

En 1999, se analizaron 99 embarques de papa procedentes de Canadá (Cuadro 2) uno de ellos resultó serologicamente positivo al PVY^N (Cuadro 3) y no causó necrosis en *Nicotiana tabaco* var samsun (Cuadro 4).

Caracterización Biológica en *Nicotiana tabacum* var. samsun.

La inoculación en *Nicotiana tabacum* var. samsun con sabia de hojas de papa serológicamente positivas a PVY 4C3, PVY^N 1F5, PVY^N Rose y negativo o positivo al anticuerpo PVYO+C (Cuadro 3), produjo síntomas de necrosis de nervaduras (Figura 3a), de pecíolo (Figura 3b) y del tallo (Figura 3c), colapso y muerte de hojas basales (Figura 3d).

Con respecto a los aislamientos que reaccionaron serologicamente positivos al PVY 4C3, PVYO+C, PVY^N 1F5 y negativo al PVY^N Rose (Cuadro 3) las plantas presentaron síntomas de mosaicos únicamente (Cuadro 4).

Cuadro 3. Reacción serológica y de bioensayo con savia extraída de tubérculos-semilla de papa importados de Canadá durante 1997-1999.

ORIGEN DEL TUBÉRCULO-SEMILLA DE PAPA	No. DE EMBARQUES +/AÑO	REACCION SEROLOGICA				BIOENSAYO
		PVY 4C3	PVY O+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
New Brunswick	013/1997	+	+	+	+ ¹	+
New Brunswick	014/1997	+	-	+	+ ¹	+
New Brunswick	025/1997	+	+	+	+ ¹	+
Principe Island Edward	026/1997	+	+	+	+ ¹	+
Principe Island Edward	039/1997	+	+	+	+ ¹	+
New Brunswick	063/1997	+	+	+	+ ¹	+
New Brunswick	071/1997	+	+	+	+ ¹	+
New Brunswick	078/1997	+	+	+	- ²	-
New Brunswick	2146/1988	+	+	+	- ²	-
New Brunswick	2375/1998	+	+	+	+ ¹	+
New Brunswick	2455/1998	+	+	-	+ ¹	+
New Brunswick	114/1999	+	+	+	- ²	-

+ = Reacción serológica positiva (Cruz y Frías, 1997).

- = Reacción serológica negativa (Cruz y Frías, 1997).

¹ Embarques que produjeron necrosis en tabaco.

² Embarques que no produjeron necrosis en tabaco.

Cuadro 4. Reacción de plántulas de *Nicotiana tabacum* var. samsun inoculadas con savia de hojas de papa ELISA/positivas a PVY^N.

No. DE EMBARQUES +/AÑO	REACCION BIOLÓGICA* EN <i>Nicotiana tabacum</i> var. samsun	SÍNTOMAS DEL PVY ^N
013/1997	nn, np, nt, chb y maha	Positiva
014/1997	nn, np, nt, chb, maha y e	Positiva
025/1997	nn, np, nt, chb y maha	Positiva
026/1997	nn, np, nt, chb y maha	Positiva
039/1997	nn, np, nt, chb y maha	Positiva
063/1997	nn, np, nt, chb y maha	Positiva
071/1997	nn, np, nt, chb y maha	Positiva
078/1997	mh	Negativa
2146/1988	mh	Negativa
2375/1998	nn, np, nt, chb y maha	Positiva
2455/1998	nn, np, nt, chb, maha y e	Positiva
114/1999	mh	Negativa

+= positiva, nn= necrosis de nervaduras, np= necrosis de peciolo, nt= necrosis del tallo, chb= colapso y muerte de las hojas basales, maha= mosaicos y arrugamiento de hojas apicales; e= enanismo de la planta, mh= mosaicos en las hojas, *= Síntomas observados a los 12 días después de la inoculación.

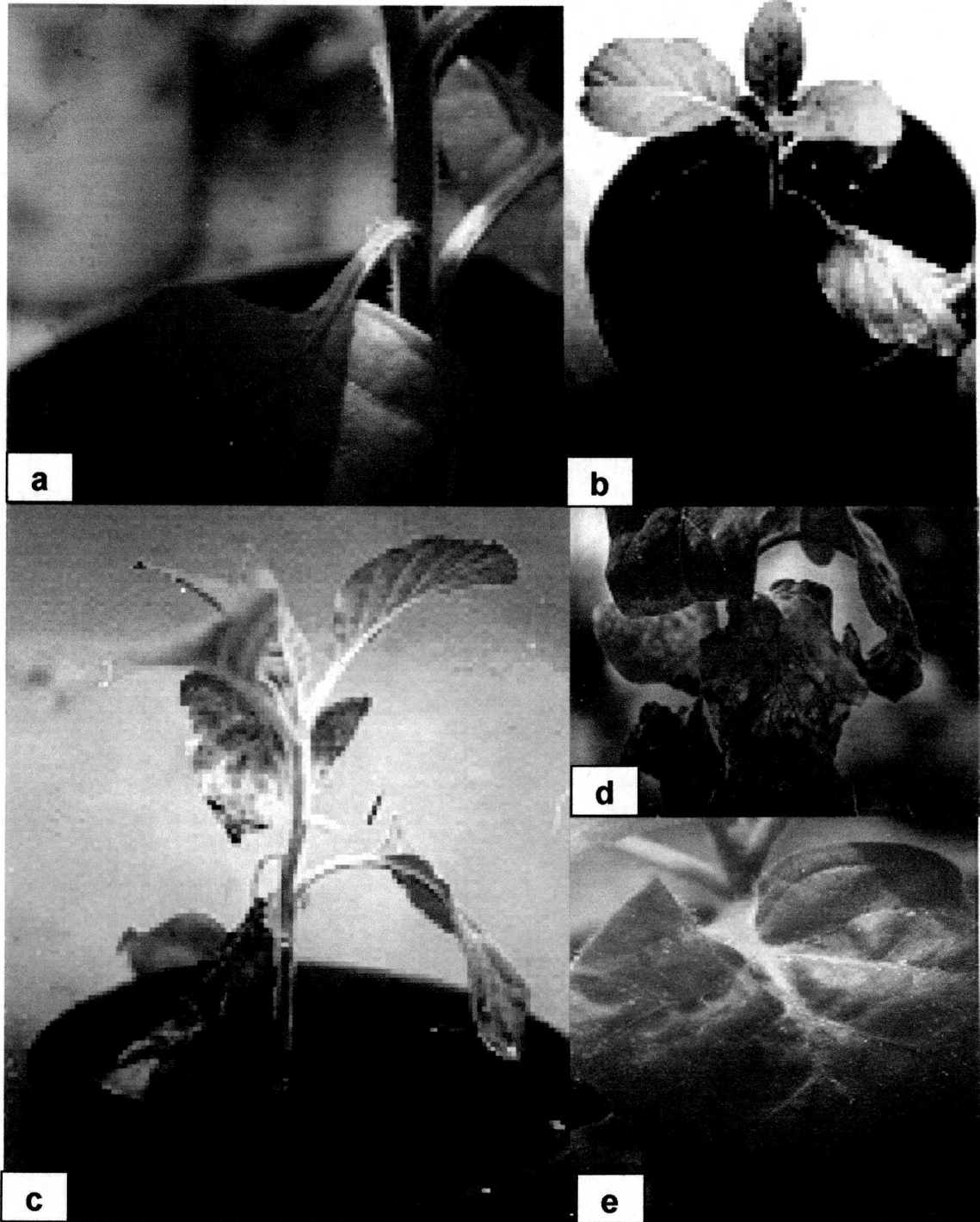


Figura 3. Síntomas inducidos por el PVY^N en *Nicotiana tabacum* var samsun. a) necrosis de nervadura, b) de pecíolo, y c) de tallo; d) colapso y muertes de hojas y e) mosaicos cloróticos y arrugamiento de hojas

DISCUSIÓN

El PVY 4C3 demostró ser un antisuero confiable en la detección del PVY por medio de la técnica serológica ELISA triple anticuerpo; siendo considerados por Ellis *et al.*, (1996), como un antisuero genérico que detecta todas las variantes del PVY.

La reacción del embarque de papa 014/97 diagnosticada serologicamente como positiva a antisuero PVY4C3, negativa con PVYO+C, positiva con PVY^N1F5 y Rose, aparentemente no requiere confirmación por bioensayo (inoculación en tabaco) ya que el antisuero PVYO+C detecta las variantes "O" y "C" y no presenta reacción con variantes necróticas del PVY (Ellis *et al.*, 1997).

Los resultados en esta investigación al inocular tabaco, respaldan la confiabilidad y eficiencia de la reacción serológica descrita anteriormente como prueba rápida y confiable de la presencia del PVY^N.

Para los casos en donde las muestras de papa diagnosticadas serologicamente positivas a PVY4C3, PVYO+C, PVY^N1F5 y negativas a PVY^N Rose, al ser inoculadas en *Nicotiana tabacum* var. samsun, no presentaron

síntomas típicos que induce el PVY^N en este hospedante. Lo anterior puede explicarse por la reacción que el antisuero PVY^N1F5 presenta con variantes comunes del PVY (McDonald y Kristjansson, 1993, Ellis *et al.*, 1997).

Las muestras de papa que reaccionaron serológicamente positivas con el antisuero PVY 4C3, positivas o negativas a PVYO+C y positivas a PVY 1F5 y Rose, al ser inoculadas en plantas de *Nicotiana tabacum* var. Samsun, desarrollaron síntomas de: necrosis de nervaduras, de pecíolo y de tallo, arrugamiento de hojas y achaparramiento de la planta. Estos resultados coinciden con las reportadas por Singh, (1992) y McDonald y Kristjansson (1993).

Los resultados obtenidos demuestran que el diagnóstico del PVY^N se puede utilizar el antisuero Rose y O+C para saber si hay infecciones combinadas del PVY^O, PVY^C y PVY^N.

CONCLUSIONES

La prueba de Inmunoadsorción Ligada a Enzimas Conjugadas Triple Anticuerpo, utilizando anticuerpo monoclonal 1F5 no fue confiable la detección del virus Y de la papa variante necrótica.

En antisuero Rose resultó ser 100% efectivo para detectar las variante necrótica del PVY presentes en Canadá (New Brunswick y Pricipe Island Edward).

Las muestras de papa que reaccionaron serologicamente positivas con PVY^N Rose desarrollaron síntomas típicos que induce el virus Y de la papa variante necrótica en *Nicotiana tabacum* var. samsun.

LITERATURA CITADA

- Barnett, O. W. 1992. A summary of potyvirus taxonomy and definitions. pp. 435-444. *In: Potyvirus Taxonomy* O.W. Barnett, ed. Springer Verlag, New York.
- Bem, F. y Varveri, B. C. 1999. First report of occurrence of potato tuber necrotic ringspot disease in Greece. *Disease notes, Plant Dis.* 83:488.
- Boiteau, G., Singh, R. P., Parry, R.H. and Pelletier, Y. 1988. The spread of PVY^O in New Brunswick potato fields: Timing and vectors. *Am. Potato Journal* 65:639-649.
- Büchen-Osmond, C. 1995. Index to taxonomic structure of the family potyviridae. Compiled from the data presented in the Sixth ICTV Report by Barnett OW, Adam G, Brunt AA, Dijkstra J, Dougherty WG, Makkouk K, Morales FJ, Ohki ST, Shikata E, Shukla DD, Uyeda I. Research School of Biological, Institute of Advanced Studies, Australian National University, PO Box 475, Canberra, Australia.
<http://life.anu.edu.au/viruses/lctv/fs_potyv.htm> [Consulta: 11 nov 2000].

- Büchen-Osmond, C. 1998. Potato virus Y. Compiled from the data presented in the Sixth Report by Barnett OW, Adam G, Brunt AA, Dijkstra J, Dougherty WG, Makkouk K, Morales FJ, Ohki ST, Shikata E, Shukla DD, Uyeda I. Research School of Biological, Institute of Advanced Studies, Australian National University, PO Box 475, Canberra, Australia. <<http://life.anu.edu.au/viruses/ICTVdB/57010001.htm>>. [Consulta: 11 nov 2000].
- Clark, M. F. and Adams, A. M. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. of General Virology 34: 357-393.
- Cruz, F. M. y Frías, T. G. A. 1997. Guía ilustrada de la prueba de inmonoadsorción ligado a enzimas para la detección de fitopatógenos. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. México, D.F. 18 p.
- De Bokx, J. A. 1980. Virosis de la papa y de la semilla de la papa. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina, 303 p.
- Dhar, A. K., Singh, R. P. and et Boucher, A. 1994. Molecular cloning and sequencing of the capsid and the nuclear inclusion protein genes of a North American PVY^N isolate. Can. J. Microbiol 40: 798-804.

- Ellis, P., Stace-Smith, Bowler, G. and Mackenzie, D. J. 1996. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. *Can. J. of Plant Pathology* 18:64-70.
- _____, Stace-Smith, R. and de Villiers, G. 1997. Identification and geographic distribution of serotypes of potato virus Y. *Plant. Dis.* 81:481-484.
- EPPO. 1999. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Plant Quarentine Retrieval System. Versión 3.9.
- Espino de la Paz, A. I., Méndez, P. P. and Jordá-Gutiérrez, P. 1997. New host of potato Y potyvirus (PVY) identified in the Canary Islands. *Plant Dis.* 81:1096 (Abstr.).
- Francki, R. I. B., Milne, R. G. and Hatta, T. 1985. Atlas of plant viruses. Vol. II. CRC Press Inc. Florida, USA. Pp. 159-210.
- Hooker, W. J. 1980. Compendium of potato diseases. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú, 166 p.
- Horton, D. 1992. La papa: Producción, comercialización y programas. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú, 260 p.

- Kus, M. 1990. Potato tuber ring necrosis disease. *In*: 11 triennial conf. of Eur. Assoc. for Potato Res (Abstr.). Edinburgh, Escocia. 196 p.
- Le Romancer, M, Kerlan, C. and Nedellec, M. 1994. Biological caracterización of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol* 43:138.144.
- McDonald, J. G. and Kristjansson, G. T. 1993. Properties of strains of potato virus Y^N in North America. *Plant Dis.* 77:87-89.
- ____ Singh, R. P. 1993. Assessment of North America Isolates of PVY for strains that induce tuber ring necrosis disease. *A. Potato Journal* 70(11):827 (Abstr.)
- NAPPO. 1988. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas Normas NAPPO sobre medidas fitosanitarias. Doc. 956-022-01. Requisitos para la importación de papas hacia un país miembro de NAPO. Ontario, Canadá, 28 p.
- Salazar, L. F. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú, 226 p.

- Singh, R. P. 1992. Incidence of the tobacco veinal necrotic strain of potato virus Y (PVY^N) in Canada in 1990 and 1991 and scientific basis for eradication of disease. Can. Plant Dis. Survey 72:113-119.
- _____ and Somerville, T. H. 1983. Effect of storage temperatures on potato virus infectivity levels and serological detection by enzyme-linked immunosorbent assay. Plant Dis. 67:1133-1136.
- _____, Boucher, A., Somerville, T. H. and Dhar, A. K. 1993. Selection of monoclonal antibody to detect PVY^N and its use in ELISA and DIBA assays. Can. J. of Plant Pathology 15:293-300.
- Singh, M. and Singh, R. P. 1994. A fast reacting bioassay for the tobacco veinal necrotic strain of potato virus Y (PVY^N). Plant Dis. 78:775-778.
- _____. 1995. Host dependent cross-protection between PVY^N, PVY^O, and PVA in potato cultivars and *Solanum brachycarpum*. Can. J. of Plant Pathology 17:82-86.
- Smith, K. M. 1972. Plant virus diseases. pp. 418-424. Academic Press. New York and London.

Smith, K. M. 1981. Potato virus Y. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 242.

Stibick, J. N. 1994. New pest response guidelines. Potyviridae. United States Department of Agriculture. pp. 10.25-10.26. Plant Protection and Quarentine.

APÉNDICE I

Cuadro 1. Resultados obtenidos del análisis serológico ELISA a tubérculos-semilla de papa provenientes de Canadá en 1997.

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
013	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Cremcas S de R.L.	Fresnillo, Zacatecas	+	+	+	+	2/+
026	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	+	+	1/+
027	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	-	-	-
029	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	-	-	-
030	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	-	-	-
039	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Cremcas S de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	+	+	1/+
040	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Cremcas S de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	-	-	-
044	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
048	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	-	-	-
054	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	Arteaga, Coahuila	+	+	-	-	-
058	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Ricardo Dávila López	Galeana, N.L.	-				-
059	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Ignacio Anselmo González Cepeda	Guadalupe, Saltillo.	-				-
063	200	Moree	Veracruz. Ver.	Corere Internacional, S.A. de C.V.	Apan, Hidalgo	+	+	+	+	1/+
062	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	La Gloria, Arteaga, Coahuila	-				-
064	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte S.P.R. de R.L.	La Gloria, Arteaga, Coahuila	-				-
065	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	PRO AGRO Mexicano S:A. de C.V.	Arteaga, Coahuila	-				-
066	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	PRO AGRO Mexicano S:A. de C.V.	Arteaga, Coahuila	-				-
071	200	Snowden	Piedras, Negras Coahuila.	Parra el Alto SPR de RL	Saltillo, Coahuila	+	+	+	+	1/+

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
073	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Humberto Fco. Guajardo Garza	Saltillo, Coahuila	-				-
075	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Humberto Fco. Guajardo Garza	Saltillo, Coahuila	-				-
076	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Humberto Fco. Guajardo Garza	Arteaga, Coahuila	-				-
077	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Humberto Fco. Guajardo Garza	Arteaga, Coahuila	-				-
078	200	Atlantic	Piedras Negras, coahuila	Desarrollo agroindustrial del Norte SPR	Arteaga, Coahuila	+	+	+	-	-
079	200	Alpha	Piedras Negras, coahuila	PRO AGRO Mexicano S.A. de C.V.	Napulcan, Puebla	+	+	-	-	-
081	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Cremcas S. de R.L.	Saltillo, Coahuila	-				-
083	200	Atlantic	Piedras Negras, coahuila	Cremcas S. de R.L.	Calimaya, Edo. de México	-				-
084	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Cremcas S. de R.L.	Sn. Rafael Galeana, N.L.	-				-
086	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	José Humberto Dávila López	Arteaga, Coahuila	-				-
087	200	Alpha	Piedras Negras, Coahuila	José Humberto Dávila López	Arteaga, Coahuila	-				-
014	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Aldama, Chihuahua	+	-	+	+	1/+
020	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Jiménez, Chihuahua	-				-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVAS (+) O NEGATIVAS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
021	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Jiménez, Chihuahua	-				-
022	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Jiménez, Chihuahua	-				-
025	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Jiménez, Chihuahua	+	+	+	+	3/+
026	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Aldama, Chihuahua	-				-
028	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Aldama, Chihuahua	-				-
034	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Hermosillo, Sonora	-				-
037	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Pedro Escobedo, Querétaro	-				-
038	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Guadalupe Victoria, Puebla	-				-
039a	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Aldama, Chihuahua	-				-
042a	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Guadalupe Victoria, Puebla	-				-
039b	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Aldama, Chihuahua	-				-
042b	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Guadalupe Victoria, Puebla	-				-
042c	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Guadalupe Victoria, Puebla	-				-
042d	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Guadalupe Victoria, Puebla	-				-
043	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S de R.L.	Aldama, Chihuahua	-				-
044a	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Zamora, Michoacán	-				-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVAS (+) O NEGATIVAS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
044b	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Zamora, Michoacán	-				-
044c	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Zamora, Michoacán	-				-
044d	200	Atlantic	Cd. Juárez, Chihuahua	Cremcas S. de R.L.	Zamora, Michoacán	-				-

Cuadro 2. Resultados obtenidos del análisis serológico ELISA a tubérculos-semilla de papa provenientes de Canadá en 1998.

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
100	200	Atlantic	Piedras Negras Coahuilaarios	Desarrollo Agroindustrial del Norte SPR	Saltillo, Coahuila	+	+	-	-	-
111	200	Atlantic	Centro internacional de Servicios Fitosanitarios	Desarrollo Agroindustrial del Norte SPR	Saltillo, Coahuila	+	+	-	-	-
2146	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Los Mochis, Sin.	+	+	+	-	-
2174	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2222	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Ocalles S.A.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2234	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Ocalles S.A.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2235	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Ocalles S.A.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2237	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Ocalles S.A.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2296	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Ocalles S.A.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2297	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Ocalles S.A.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2315	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Ocalles S.A.	Los Mochis, Sin.	+	+	-	-	-
2318	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2322	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2355	200	Alpha	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2375	200	Alpha	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	+	+	1/+
2393	200	Alpha	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A. de C.V.	Cajeme, Son.	+	+	-	-	-
2394	200	Alpha	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
2407	200	Alpha	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2448	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Los Mochis, Sin.	+	+	-	-	-
2455	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Los Mochis, Sin.	+	+	-	+	1/+
2467	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2468	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2579	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-

Cuadro 3. Resultados obtenidos del análisis serológico ELISA a tubérculos-semilla de papa provenientes de Canadá en 1999.

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
0011	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Hermosillo, Son.	+	+	-	-	-
0014	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Hermosillo, Son.	+	+	-	-	-
0018	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Hermosillo, Son.	+	+	-	-	-
0047	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Hermosillo, Son.	+	+	-	-	-
0081	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte	Saltillo, Coahuila	+	+	-	-	-
114	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila	Desarrollo Agroindustrial del Norte SPR	Saltillo, Coah.	+	+	+	-	-
289	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
290	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
291	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
292	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
292	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
295	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
295	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
296	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
297	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
298	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Fresnillo, Zac.	+	+	-	-	-
303	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
307	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
309	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
314	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
315	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
321	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
324	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
324	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
327	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
329	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
333	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Enrique Free Pacheco	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
336	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
336	200	Atlantic	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
359	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
369M1	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
369M2	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
371	200	Atlantic		José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
372M1	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
372M2	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
372	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
373M1	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
373M2	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
373	200	Atlantic	Nogales, Sonora.	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
374	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
375	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
377	200	Atlantic	Nogales, Sonora			+	+	-	-	-
379	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
385	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
386	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
387	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
391	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Hermosilloa, Son.	+	+	-	-	-
392	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
399	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Hermosilloa, Son.	+	+	-	-	-
400	200	Snowden	Piedras Negras, Coahuila.	Sabritas, S.A de C.V.	Perote, Ver.	+	+	-	-	-
408	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
409	200	Atlantic	Nogales, Sonora.	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
413	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
414	200	Atlantic	Nogales, Sonora.	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
419	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
430	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
431	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
433	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
434	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
435	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Hermosillo, Son.	+	+	-	-	-
436	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
440	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
441	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Pavos del Noroeste S.A.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
443	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
444	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
446	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
452	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
461	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
462	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
466	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
470	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
476	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
488	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
522	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
526	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
539	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
541	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
552	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
553	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
554	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
569	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
584	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Canachi, S.A.	Banamichi, Son.	+	+	-	-	-
639	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
685	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
734	200	Atlantic	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	+	-	-
748	1	Snowden	Nogales, Sonora	José A. Rogel M.	Casas Grandes, Chih.	+	+	-	-	-
768	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-

No. DE EMBARQUE	TUBERCULOS ANALIZADOS	VARIEDAD	PUNTO DE INGRESO A MEXICO	COMPANIA IMPORTADORA	DESTINO DEL PRODUCTO	ANTISUEROS UTILIZADOS				TUBERCULOS/ POSITIVOS (+) O NEGATIVOS (-) AL PVY ^N
						PVY4C3	PVYO+C	PVY ^N 1F5	PVY ^N ROSE	
849	200	Snowden	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayón, Son.	+	+	-	-	-
849-Bis	200	Snowden	Nogales, Sonora	Sabritas, S.A de C.V.	Rayon, Son.	+	+	-	-	-
2153	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2154	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2164	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2165	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2243	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2248	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2240	200	Atlantic	Nogales, Sonora	Cremcas, S. de R.L.	Ahome, Sin.	+		-	-	-
2280	200	Alpha	Nogales, Sonora	WNG Cozain Hermanso SPR	Los Mochis, Sin.	+	+	-	-	-
2340	200	Alpha	Nogales, Sonora	Enrique Free pacheco	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-
2420	200	Alpha	Nogales, Sonora	Elsa Guadalupe. Díaz R.	Ahome, Sin.	+	+	-	-	-

APÉNDICE II

Solución amortiguadora (SOLAM) de adsorción o cubrimiento.

Disolver en 1000 ml de agua destilada :

Carbonato de sodio	1.59 g
Bicarbonato de sodio	2.93 g
Azida de sodio	0.2 g
Ajustar pH a 9.6.	

Puede almacenarse por un mes, siempre y cuando se refrigere a 4-6 °C.

SOLAM de Fosfato + Tween 1X (SF+T):

Disolver en 1000 ml de agua destilada :

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Tween 20	0.5 ml
Ajustar pH a 7.4.	

Almacenar a temperatura ambiente y usarse como máximo una semana después de su preparación o bien almacenar a 4 °C y usarse como máximo tres semanas de su preparación, cuidando que el pH se mantenga en el recomendado.

SOLAM de extracción:

Diluir en 1000 ml de SF+T:

Sulfito de sodio	1.3 g
*Polovinilpirrolidona MW 24-40,000	20.0 g (2%)
Albúmina de huevo	2.0 g (0.2%)
Tween-20	20.0 ml
Azida de sodio	0.2 g
Ajustar a pH de 7.4.	

Almacenar a 4-6 °C y usarse como máximo una semana después de su preparación.

*Probablemente carcinogénico.

SOLAM para el conjugado enzimático:

Diluir en 1000 ml de SF+T:

Albúmina de suero bovino	2.0 g (0.2%)
Polivinilpirrolidona (MW 24-40,000)	20.0 g (2%)
Azida de sodio	0.2 g
Ajustar a pH de 7.4	

Almacenar de 4-6 °C y usarse como máximo una semana después de su preparación.

SOLAM de sustrato:

Agua destilada	800 ml
Dietanolamina	97.0 ml
Azida de sodio	0.2 g

Agregar agua destilada hasta completar un volumen total de 1 litro.
Ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico concentrado.

Esta solución amortiguadora debe ser preparada justo antes de cada aplicación.

