

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Virología

Protocolo de Diagnóstico:
Potato mop-top virus (PMTV)
(Mop-top de la papa)

Tecámac, Estado de México, agosto 2018

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DCNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia del virus *Potato-mop top virus*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Información sobre la plaga	1
2.2. Información taxonómica	2
2.3. Flujo de trabajo.....	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	4
3.1. Identificación molecular	4
3.1.1. Extracción de RNA	4
3.1.2. Cuantificación y verificación de la calidad del RNA	5
3.1.3. RT-PCR punto final	5
3.1.3.1. Síntesis de cDNA con primers específicos.....	5
3.1.3.1.1. Síntesis de cDNA en un paso para el ensayo de control endógeno 18S	6
3.1.3.1.2. Síntesis de cDNA en dos pasos para el ensayo de PMTV	6
3.1.3.2. PCR punto final.....	7
3.1.3.2.1. Ensayo para control endógeno	7
3.1.3.2.2. Ensayo para PMTV	8
3.1.3.3. Controles para las pruebas moleculares	8
3.1.4. Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final	9
3.2. Identificación de la plaga.....	10
4. REGISTROS	11
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	11
6. RECONOCIMIENTO	11
7. REFERENCIAS	11
8. ANEXOS.....	13
8.1. Síntomas	13
8.2. Preparación de soluciones	13

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de gen endógeno 18S.....	9
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de PMTV.....	10
Figura 3. Síntomas de PMTV en papa.....	13

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de PMTV y control endógeno 18S	5
Cuadro 2. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para control endógeno 18S.....	6
Cuadro 3. Incubación de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA de control endógeno 18S.....	6
Cuadro 4. Mezcla del extracto de RNA con los primers para PMTV	6
Cuadro 5. Condiciones para la desnaturalización e hibridación de la mezcla RNA/primers.....	6
Cuadro 6. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA en el ensayo de PMTV	7

Cuadro 7. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno 18S.....	7
Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección del control endógeno 18S.....	7
Cuadro 9. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final de PMTV.....	8
Cuadro 10. Programa del termociclador para la detección del PMTV.....	8

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir el procedimiento para la identificación de *Potato mop-top virus* mediante RT-PCR.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

La enfermedad de mop top de la papa es causada por el patógeno *Potato mop-top virus* (PMTV), que pertenece al género *Pomovirus*. El PMTV fue reportado por primera vez en Gran Bretaña en 1966; posteriormente, en Irlanda, Países Bajos, Noruega, Suecia, Finlandia, Dinamarca, Los Andes en Sudamérica y en Asia. Se ha reportado en Israel y Japón, en Canadá se reportó entre 1991 y 1992, y en Estados Unidos de América en 2002 (Johnson, 2002).

El PMTV es frecuente de regiones con clima frío y húmedo; esto favorece la diseminación de las esporas del hongo vector *Spongospora subterranea*, las cuales resisten en el suelo hasta 18 años. Altos niveles de humedad y temperaturas frías del suelo (12-20°C) estimulan la germinación de las esporas de resistencia, liberando al virus de las zoosporas. Las zoosporas recorren distancias cortas en el suelo y requieren del agua para una mayor diseminación, éstas introducen al virus en la planta de papa al infectar las raíces, los estolones o los tubérculos. El movimiento sistémico de los virus dentro de la planta es generalmente lento y errático. En áreas donde la temperatura del suelo es superior a 20°C o la humedad es escasa, la dispersión llega a hacer muy pequeña o nula. A pesar de que las raíces son infectadas por *S. subterranea*, hay cultivos que muestran alguna resistencia al desarrollo de la enfermedad que ocasiona este hongo (conocido como sarna pulverulenta); sin embargo, éstos posiblemente sean susceptibles a PMTV (Ministerio de Agricultura, 1996; Rousselle, Robert y Crosnier, 1999). En cultivares sensibles al virus, las pérdidas en el rendimiento llegan a ser hasta de un 25% y los tubérculos no se comercializan (Ministerio de Agricultura, 1996); las especies susceptibles al virus se encuentran dentro de las familias *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* y *Tetragoniaceae*.

Cuando PMTV infecta tubérculos-semillas, el virus es transmitido como una infección secundaria, pero sólo a un número limitado de tubérculos de la progenie (30 - 50%). Por lo tanto, la dispersión vía vector es obligada y la más importante (Ministerio de Agricultura, 1996; Rousselle, Robert y Crosnier, 1999).

Los síntomas primarios se desarrollan en los tubérculos de algunos cultivares cuando se infectan directamente en el suelo; los cuales consisten en la formación de anillos sobre la superficie, algunas veces de color marrón y necrótico que se extienden como arcos dentro de la pulpa del tubérculo (Anexo 8.1); en el centro de este anillo necrótico, aparece una lesión por roña que es la fuente de la infección. Los síntomas en el follaje son secundarios y son de tres tipos: marcas de color amarillo brillante ("aucuba"), especialmente en las hojas inferiores; manchas pálidas

en forma de V (sardineta) en las hojas superiores; y enanismo en los tallos ("mop-top"). Las marcas de color amarillo brillante consisten en puntos, anillos y formas en V (Anexo 8.1); estas últimas son las más características al diagnosticar el virus. A veces, sólo algunos de los tallos de una planta son infectados, de tal manera que una planta atacada por el virus también tiene tallos de aspecto normal. Sólo los cultivares sensibles desarrollan "mop-top" y síntomas secundarios severos en los tubérculos que consisten en deformaciones, grietas profundas, rajaduras finas en la superficie, y manchas o anillos de color marrón en el extremo del estolón (Ministerio de Agricultura, 1996).

2.2 Información taxonómica

Nombre científico: *Potato mop-top virus*

Potato mop-top pomovirus

Abreviación: PMTV

Nombres comunes: Mop-top (español)

Potato mop-top (inglés)

Kartoffelmop-top (Dinamarca)

Potet-mopp-topp (Noruega)

Potatismopptopp (Suecia)

Posición taxonómica:

Clasificación de Baltimore: Virus de RNA de cadena sencilla de sentido positivo [ssRNA (+)]

Dominio: Virus

Orden: Sin asignar

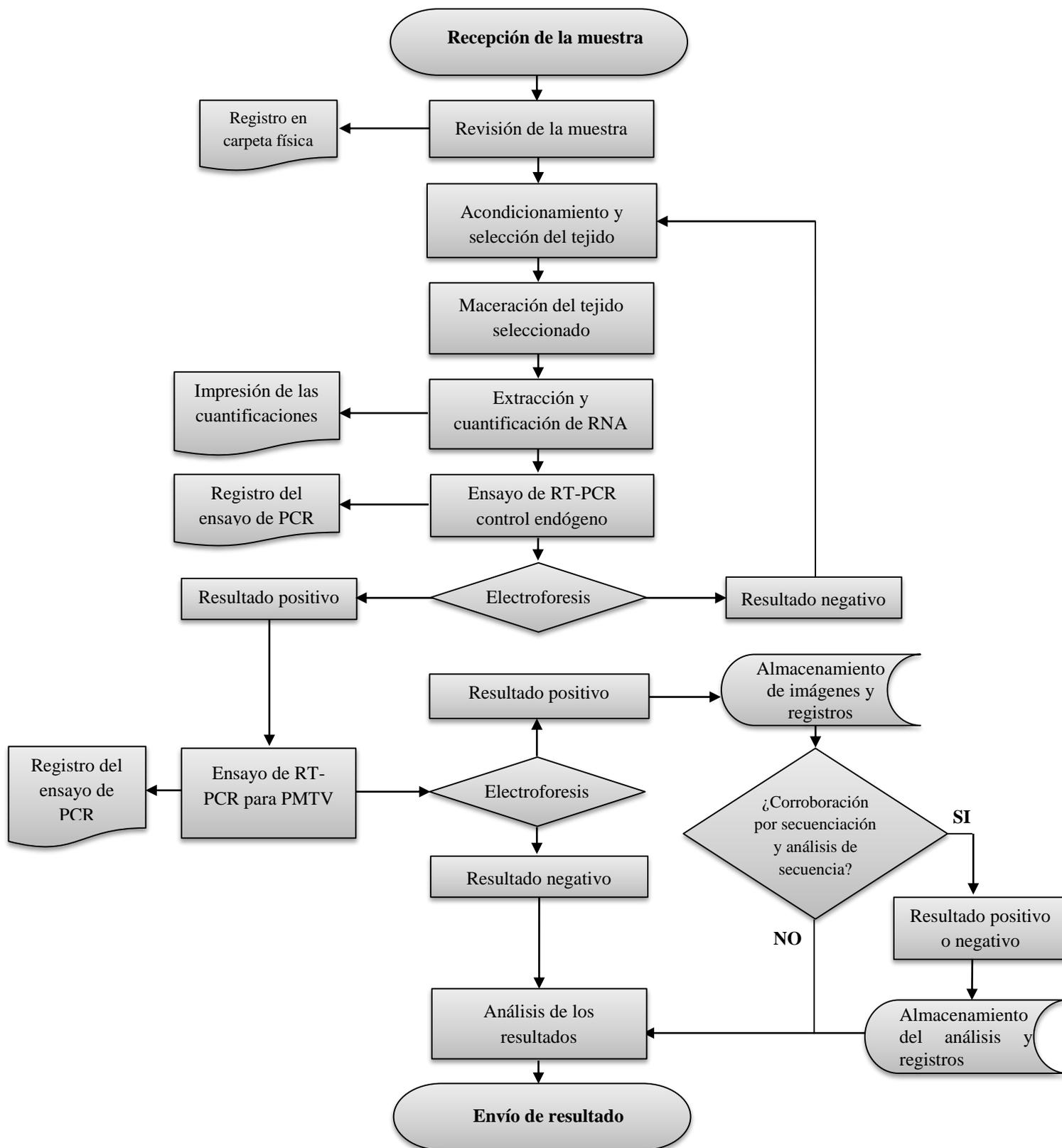
Familia: *Virgaviridae*

Género: *Pomovirus*

Especie: *Potato mop-top virus*

(ICTV, 2018)

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

El diagnóstico de PMTV se basa en un ensayo de RT-PCR.

Las muestras pueden ser de cultivos de la familia *Solanacea*, tales como papa, tomate, chile, berenjena y tabaco; así como de otras familias botánicas. Si la muestra se compone de más de una variedad o lote, es necesario que se señale en la hoja de remisión y cada elemento debe venir bien identificado y separado. A cada variedad o lote se le hace un diagnóstico por separado.

El diagnóstico se realiza a partir de estolón o de brotes del tubérculo; en caso de contar con la planta completa, emplear las hojas.

Para la brotación de los tubérculos de papa, éstos se deben mantener en condiciones de oscuridad para favorecer el crecimiento. La muestra debe contener como mínimo 200 tubérculos de papa fresca cuando va dirigido a consumo y a la industria; y un mínimo de 400 tubérculos cuando sea para semilla, cantidades por cada embarque de veinte toneladas (NRMF No. 3, 2011). De cada tubérculo se deben tomar todos los brotes posibles y se pueden mezclar en una muestra compuesta de hasta 20 tubérculos. Los brotes deben ser por lo menos de 0.5 cm de longitud pero no más de 3.0 cm.

En caso de utilizar el estolón, se combinan en una muestra compuesta de hasta 50 tubérculos, en tubérculos dormantes tomar una muestra removiendo 0.5 g de tejido (1 cm de profundidad y 1 cm de diámetro), mientras que en tubérculos que rompieron dormancia el tejido es tomado de la parte apical del brote (0.5 g) (Xu, De Haan y De Boer, 2004). Si la muestra son hojas, las plantas no deben de estar etioladas y tener al menos 15 cm de longitud; pueden someterse a pruebas las hojas producidas a partir de los tubérculos muestreados. Se acepta la prueba de una hoja sencilla, completamente extendida de la región media del tallo de cada planta. Se puede combinar el tejido de hasta 25 hojas en una muestra compuesta.

3.1 Identificación molecular

El diagnóstico molecular de PMTV se basa en el método de la retrotranscripción (o transcripción reversa) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como RT-PCR (Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction en inglés). Esta técnica permite la detección y amplificación de regiones específicas del genoma del virus, mediante una copia de cDNA (DNA complementario) a partir de una región del genoma de RNA del virus, y una reacción subsecuente de PCR.

3.1.1 Extracción de RNA

Para la prueba de RT-PCR, se toma como mínimo 0.1 g de la muestra compuesta y se congelan a -70°C hasta su procesamiento. Realizar dos repeticiones por muestra.

La extracción de RNA total se realiza a partir de estolón, brotes de yemas u hojas y tallos. Se sugiere el uso del kit comercial PureLink[®] Plant RNA Reagent.

Nota: los pasos de extracción son los indicados en la guía del fabricante (No. catálogo 12322012).

3.1.2 Cuantificación y verificación de la calidad del RNA total

Al finalizar el proceso es importante verificar la calidad y cantidad del RNA obtenido; para ello se utiliza un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad. La calidad óptima del RNA está dada por la absorbancia $A_{260/280} = 1.8-2.0$ y $A_{260/230} = 2.0-2.2$. Para corroborar que el RNA obtenido es apto para ser amplificado debe realizarse un ensayo de control endógeno, evitando así falsos negativos. En la práctica, las absorbancias fuera de los intervalos óptimos son permitidas solamente cuando amplifique exitosamente el control endógeno.

3.1.3 RT-PCR punto final

3.1.3.1 Síntesis de cDNA con primers específicos

Para la síntesis de cDNA, utilizar los primers que se usan en la reacción de PCR (Cuadro 1); éstos dirigen la síntesis a la misma región del amplicón, obteniendo una mayor especificidad.

Los primers a utilizar para PMTV son los propuestos por Xu, De Haan y De Boer (2004); los cuales amplifican una región dentro del gen que codifica para la proteína de la cápside. Para el ensayo de control endógeno se utilizan los primers propuestos por Zamboni, Pierantoni y De Franceschi (2008), que amplifican una región del gen que codifica para el RNA del 18S del hospedante.

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de RT-PCR para la detección de PMTV y control endógeno 18S.

Nombre de los primers	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Ensayo
C819	5'-CTATGCACCAGCCCAGCGTAACC-3'	460	PMTV
H360	5'-CATGAAGGCTGCCGTGAGGAAGT-3'		
18S Fw	5'-ACGGATCGCACGGCCTTCGTG-3'	300	Control endógeno 18S
18S Rv	5'-ACCAGACTTGCCCTCCAATGG-3'		

3.1.3.1.1 Síntesis de cDNA en un paso para el ensayo de control endógeno 18S

1) Realizar la mezcla de reacción de acuerdo al Cuadro 2:

Cuadro 2. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA para control endógeno 18S.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10 X	2
MgCl ₂	50 mM	2
dNTPs	10 mM	2
Primer 18S Fw	10 µM	0.4
Primer 18S Rv	10 µM	0.4
Transcriptasa reversa M-MLV	200 U/µL	0.25
RNase OUT	40 U/µL	0.5
RNA	100 ng/ µL	5
Agua ° PCR		7.45
	Volumen total	20

2) Incubar la mezcla con las siguientes temperaturas (Cuadro 3):

Cuadro 3. Incubación de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA de control endógeno 18S.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
42	30	1
99	5	1
12	∞	

3.1.3.1.2 Síntesis de cDNA en dos pasos para el ensayo de PMTV

1) Mezclar cada extracto de RNA con los primers de acuerdo al Cuadro 4:

Cuadro 4. Mezcla del extracto de RNA con los primers para PMTV.

Componentes	Concentración inicial	Volumen (µL)
RNA	100 ng/µL	5
Primer C819	10 µM	1
Primer C360	10 µM	1

2) Incubar la mezcla de acuerdo al Cuadro 5:

Cuadro 5. Condiciones para la desnaturalización e hibridación de la mezcla RNA/primers en el ensayo de PMTV.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
80	5 minutos	1
37	15 minutos	1
12	∞	

3) Al finalizar el tiempo de incubación, colocar las muestras en hielo y adicionar a cada tubo 13 µL de la mezcla del resto de los reactivos e incubar (Cuadro 6):

Cuadro 6. Mezcla de reacción para la síntesis de cDNA en el ensayo de PMTV.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)	Incubación Temp./tiempo
Buffer	5 X	4	42 °C/50 min
dNTPs	10 mM	2	
Transcriptasa reversa M-MLV	200 U/µL	0.5	
RNase OUT	40 U/µL	0.5	
DTT	0.1 M	2	
Agua ° PCR		4	
	Volumen total	13	

3.1.3.2 PCR punto final

3.1.3.2.1 Ensayo para control endógeno

Para el ensayo de control endógeno, utilizar los primers mencionados en el Cuadro 1.

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno 18S.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.5
Primer 18S Fw	10 µM	1
Primer 18S Rv	10 µM	1
Taq DNA Pol	5 U/µL	0.25
cDNA		1
Agua °PCR	-	18
	Volumen total	25

- 2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Programa del termociclador para la detección del control endógeno 18S.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	90 segundos	1
Desnaturalización	94°C	40 segundos	30
Alineamiento	55°C	40 segundos	
Extensión	72°C	60 segundos	
Extensión final	72°C	3 minutos	1
Pausa	12°C	∞	

Correr los productos de PCR a 100 V en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (hasta asegurar la separación adecuada de las bandas del marcador de peso molecular de DNA), o usar otro método adaptable que permita interpretar los resultados. Si se corre en gel de agarosa, teñir en una solución de 1 µg/mL de bromuro de etidio u otra solución que permita visualizar exitosamente las bandas.

3.1.3.2.2 Ensayo para PMTV

1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final de PMTV.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.5
Primer C819	10 µM	1
Primer H360	10 µM	1
Taq DNA Pol	5 U/µL	0.25
cDNA		2.5
Agua °PCR	-	16.5
Volumen final		25

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Programa del termociclador para la detección del PMTV.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	60 segundos	35
Alineamiento	64°C	60 segundos	
Extensión	72°C	60 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1
Pausa	12°C	∞	

Correr los productos de PCR a 100 V en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (hasta asegurar la separación adecuada de las bandas del marcador de peso molecular de DNA), o usar otro método adaptable que permita interpretar los resultados. Si se corre en gel de agarosa, teñir en una solución de 1 µg/mL de bromuro de etidio u otra solución que permita visualizar exitosamente las bandas.

3.1.3.3 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede ser RNA genómico o el fragmento clonado del amplicón; éste debe estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: corresponde a un extracto de matriz sin el virus (hospedante). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde. Permite descartar falsos positivos y contaminación de la reacción.

Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En el ensayo de control endógeno, el control positivo y cada una de las muestras debe de generar una banda de tamaño de 300 pb; el control negativo de reactivos no debe de generar bandas (Figura 1).
- El control negativo de reactivos y el control negativo de matriz no deben de generar bandas en el ensayo de PCR de PMTV utilizando el par de primers C819/H360 (Figura 2).

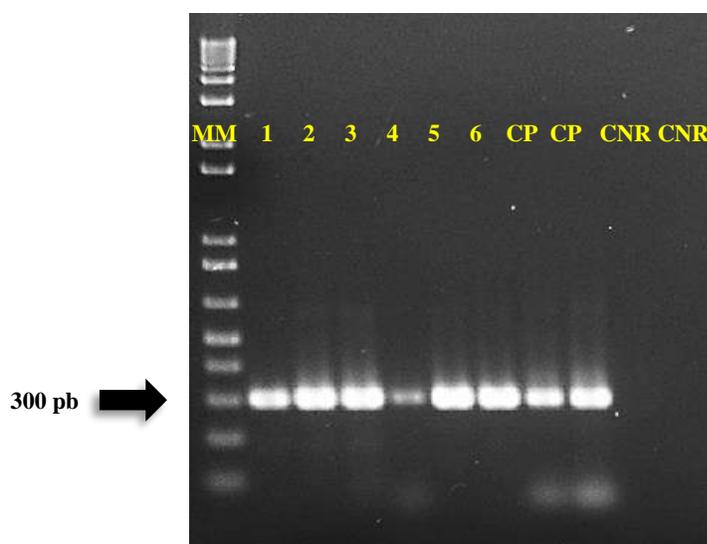


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de gen endógeno 18S. MM: marcador de peso 1 KB plus; 1-6: muestra; CP: control positivo; CNR: control negativo de reactivos.

- El control positivo para el ensayo de PCR de PMTV con el par de primers C819/H360 debe de generar una banda de tamaño de 460 pb (Figura 2).

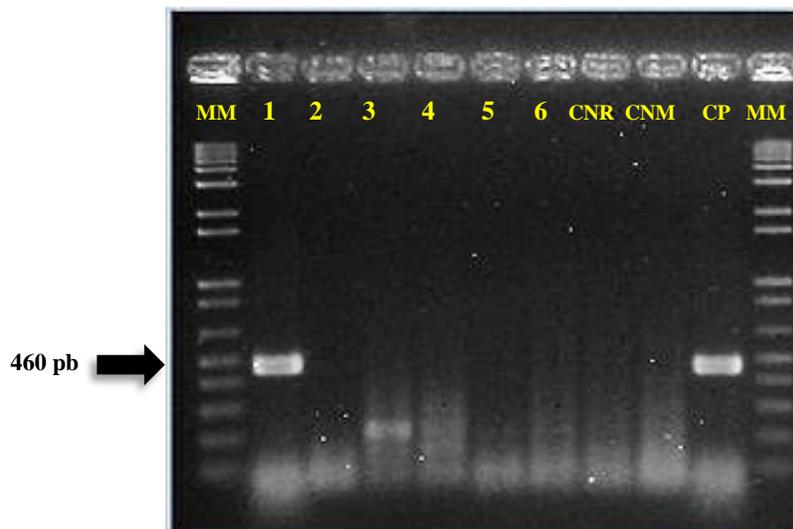


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del ensayo de PMTV. MM: marcador de peso 1 KB plus; 1-6: muestras; CNR: control negativo de reactivos; CNM: control negativo de matriz; CP: control positivo.

3.1.4 Identificación de la plaga

Se considera como resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 460pb con los primers específicos C819/H360.

El resultado es negativo si hay amplificación del control endógeno pero no del fragmento que resulta de la PCR con los primers específicos para PMTV.

Como prueba de corroboración, se debe de secuenciar el fragmento obtenido en el ensayo de PCR punto final con los primers C819/H360. Los casos en los que se debe de corroborar por secuenciación son:

- Detecciones en zonas reconocidas como libres del patógeno.
- Primeras detecciones en nuevos hospedantes.
- Cuando se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal.

Los datos de secuenciación se deben enviar al Laboratorio de Virología del CNRF para su análisis.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de PMTV. Concluido el diagnóstico, considerar lo siguiente:

Muestras positivas: almacenar el tejido vegetal a -20 °C y el RNA sobrante a -80 °C por un periodo de tres meses para contar con el material en caso de ser necesaria una corroboración. Posteriormente, de no ser requerido el material, esterilizar en autoclave a 15 psi por 20 minutos, antes de ser desechada.

Muestras negativas: almacenar el tejido vegetal a 4 °C y el RNA sobrante a -80 °C por un periodo de un mes, para contar con el material en caso de ser necesaria una corroboración. Posteriormente, esterilizar el material en autoclave a 15 psi por 20 minutos, antes de ser desechada.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.virologia@senasica.gob.mx

Teléfono: (55) 59 05 1000, **Ext.** 51379

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Virología (M. en C. Grisel Negrete Fernández), Laboratorio de Biología Molecular (Ing. Mario Espinosa Mendoza) revisado por el Departamento de Fitopatología (M. en C. María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata e Israel David Rivas Avilés).

7. REFERENCIAS

Ephytia.../Potato mop top virus (PMTV)/Symtoms. S.f. Ephytia: Identify/Knowing/Controlling. Recuperado el 24 de julio del 2018 de <http://ephytia.inra.fr/en/C/21022/Potato-Symptoms>.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). (2018). *Información taxonómica*. (2018). Recuperado el 25 de julio del 2018 de <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

Johnson, S. B. (2002). *Potato Facts. Potato Mop-Top Virus (PMTV)*. The University of MAINE. Cooperative Extension Publications. Recuperado el 24 de julio del 2018 de <https://extension.umaine.edu/publications/2437e/>.

Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria. (1996). *Principales Enfermedades, Nematodos a Insectos de la Papa* (2da. Edición). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.

- NRMF (Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias) N° 3 (2011). *Requisitos para la importación de papa hacia un país miembro de la NAPPO*. Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO). Estados Unidos de América.
- Rousselle, P., Robert, Y., y Crosnier, J.C. (1999). *La patata: Producción, mejora, plagas y enfermedades, utilización* (3ra. Edición). Madrid, España: Paraninfo.
- Xu, H., De Haan, T.-L., and De Boer, S. H. (2004). Detection and confirmation of Potato mop-top virus in potatoes produced in the United States and Canada. *Plant Disease Journal*, 88, 363-367.
- Zamboni, A., Pierantoni L. y De Franceschi, P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other Woody-plants. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 1, 122-125.

Forma recomendada de citar:

- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Potato mop-top virus* (PMTV) (Mop-top de la papa) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Síntomas

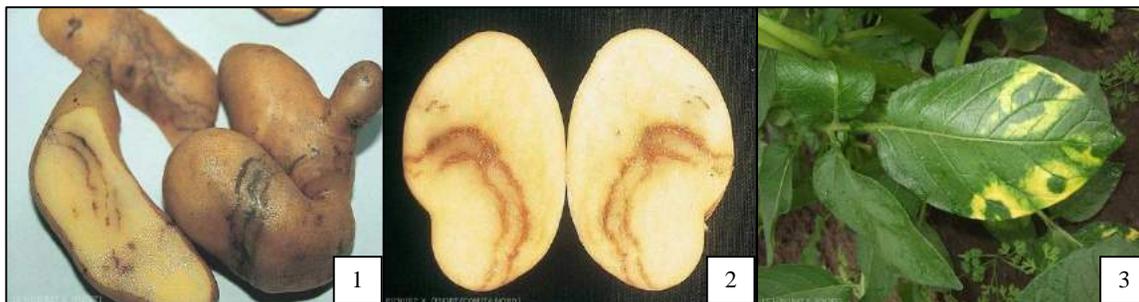


Figura 3. Síntomas de PMTV en papa. 1) Anillos necróticos de color marrón en la superficie. 2) Anillos necróticos en la pulpa del tubérculo. 3) Anillos o arcos amarillos en hojas. Recuperado de: <http://ephytia.inra.fr/en/C/21022/Potato-Symptoms>.

8.2 Preparación de soluciones

TAE 10x 1L

Tris base	48.46 g
Ácido acético	12.01 g
EDTA	3.72 g

Procedimiento: disolver en 800 mL de agua, ajustar el pH a 8.5 ± 0.2 . Aforar a 1L y volver a ajustar el pH. Para el TAE 1x diluir con agua destilada.