

Figura 30.1. Pruebas serológicas empleadas frecuentemente para la detección de virus.

- A) *Doble difusión en agar*: la celdilla central contiene antisuero y las externas el extracto vegetal; las líneas oscuras corresponden al precipitado de la reacción antígeno-anticuerpo.
- B) *Floculación de látex*: la gota superior muestra el látex distribuido homogéneamente, lo que corresponde a una reacción negativa; en la gota inferior el látex ha floculado indicando una reacción positiva (Foto: Salazar, 1980).
- C) *ELISA*: placa de micro-ELISA en la que se observan reacciones positivas (blancas o grises en la foto) y negativas (negras, o transparentes sobre el fondo negro); las celdillas externas no han sido utilizadas en la prueba.

De las técnicas más generalizadas cabe mencionar la observación de partículas virales en extractos vegetales ('dip method'), la inmunoelectromicroscopía (IEM) con sus variantes, y los cortes ultrafinos de tejidos vegetales donde se observan, ya sea el patógeno directamente o ya las anomalías citológicas (inclusiones virales y efectos citopatológicos) que son una secuela de la presencia de aquél.

El material elegido para estudio debe someterse a distintos procesos que lo ponen en condiciones de ser observado al microscopio electrónico ofreciendo una visión adecuada de viriones y componentes celulares. Asimismo, es necesario un adecuado 'soporte' o porta-espécimen para lograr un buen preparado. La preparación del soporte y del espécimen se describen a continuación de manera resumida.

Básicamente, se emplean como portaespecímenes pequeñas rejillas de metales no magnéticos como cobre, níquel, oro y otros. Las más comunes son de cobre, tienen forma circular con 3 mm de diámetro, y un reticulado de malla 300.

El montaje del espécimen requiere a veces que se cubra la rejilla con una fina película transparente a los electrones, que ayude al sostén del material y a su visualización. Por lo común, las coberturas se hacen con los siguientes materiales: a) nitrocelulosa en solución (Colodión, Parlodión, Necolor-dine, etc.); b) formaldehídos polivinílicos (Formvar); c) deposición de carbón evaporado; d) una combinación de los anteriores.

Las películas de Colodión se preparan dejando caer una o dos gotas de Colodión disuelto al 2% en acetato de amilo, sobre una superficie de agua muy limpia: la solución se esparce sobre la superficie, el solvente se evapora, y queda flotando una película de Colodión. De varias maneras se coloca esa película sobre las rejillas; la más simple consiste en tomar la rejilla con una pinza, sumergirla en el agua por debajo de la película y, con un movimiento rápido, levantarla con el fin de que aquélla quede adherida a la superficie de la rejilla. La desventaja del Colodión es su debilidad frente al bombardeo de electrones; por ello, en algunos casos conviene reemplazarlo por Formvar o reforzarlo con una fina capa de carbón. Los detalles de estos procedimientos pueden consultarse en diversos textos (Kado y Agrawal, 1972; Noordam, 1973).

Preparados a partir de extractos vegetales. Las suspensiones virales pueden obtenerse de exudados celulares obtenidos de cortes de tejidos frescos, de trozos de callos, o de estrías de epidermis. Una forma simple de visualizar los viriones es el método de inmersión ('dips'), propuesto por Brandes en 1957 y mejorado con las variantes y modificaciones introducidas desde esa fecha. Consiste, básicamente, en colocar una gota de agua o

de alguna solución sobre un portaobjeto limpio y tocar su superficie con la zona recién cortada de un tejido vegetal fresco, durante unos segundos; de este modo, el contenido de las células rotas fluye hacia la gota de agua y los viriones quedan en suspensión. Se toma una rejilla, ya cubierta con una película, y se toca con ella la superficie de la gota permitiendo que la suspensión adhiera a la película; se retira luego el exceso de líquido y se deja secar la rejilla al ambiente, protegida del polvo.

Los virus son relativamente transparentes a los electrones y para visualizarlos eficazmente deben contrastarse con átomos de algún metal pesado. Las técnicas más empleadas, y aplicables al trabajo con plantas, son la de 'tinción negativa' y la de 'sombreado'; este último estaba muy difundido antes de que se propusiera la tinción negativa. El sombreado consiste en cubrir los viriones con una capa de un metal denso a los electrones como el paladio, el tungsteno, el platino, el oro, o el uranio. El proceso se realiza vaporizando esos metales en el interior de cámaras de alto vacío, de modo que los átomos proyectados se depositen sobre las partículas virales, cubriéndolas parcialmente. De esta manera se las puede visualizar y reconocer sin inconvenientes (Milne, 1972).

La tinción negativa ('dips') consiste en colocar el extracto celular en una solución de un metal pesado como el tungsteno, el molibdeno, o el uranio. Se han probado diferentes derivados de esos metales, pero los virólogos prefieren emplear el fosfotungstato de potasio, el molibdato de amonio, el silicotungstato de sodio, el acetato de uranio, o el formiato de uranio. De ellos, el más común es el fosfotungstato de potasio (KPT); se emplea en solución acuosa al 1%-2%, de pH 6.5-7.0 o en bófer de acetato de amonio 0.1 M, de pH 6.5 a 7.0. Sobre una rejilla previamente cubierta con Colodión u otra película se vierte una gota de KPT; flotando sobre su superficie se coloca un pequeño trocito de epidermis o del tejido que se estudia y se deja allí de 1 a 5 minutos. También se puede proceder a la inversa: sobre una gota colocada en un portaobjeto se rompen células del tejido que se observará y se deja flotar la rejilla en la gota de modo que la cara cubierta por la película quede en contacto con la superficie de la gota. Se toma luego la rejilla con una pinza de punta fina y se le retira el exceso de líquido, absorbiéndolo por uno de sus costados con un trozo de papel de filtro. Finalmente, se deja secar la rejilla y se observa.

La tinción negativa permite que el metal pesado se infiltre en las depresiones, intersticios y orificios de los viriones a medida que la solución se deshidrata. Al observar la muestra al microscopio electrónico aparecen oscuras las zonas donde se concentró el metal y claras las zonas de menor densidad (protuberancias), lo que da origen a una imagen 'negativa' del

espécimen. En la detección de virus en cultivos de tejidos, estos métodos se deben emplear con precaución, ya que los virus que se encuentren en baja concentración pueden no ser detectados.

Inmuno-electromicroscopía. Hay varios métodos que combinan las ventajas de la microscopía electrónica y del serodiagnóstico; en uno de ellos se emplean rejillas cuyo soporte ha sido cubierto con una capa de anticuerpos específicos al virus que se pretende detectar. El método fue originalmente publicado por Dervick en 1973 y ha sido denominado de diversas maneras: 'método Dervick', 'rejillas activadas con anticuerpos', 'microscopía electrónica serológicamente específica' (serologically specific electron microscopy, SSEM), y 'microscopía electrónica de inmuoadsorción' (immunosorbent electron microscopy, ISEM). Este último es probablemente el nombre más adecuado y se empleará en este capítulo al describir la técnica (Milne, 1980).

La técnica consiste en adsorber anticuerpos a la película soporte que se emplea para 'atrapar', en forma específica, cualquier partícula viral serológicamente relacionada. De esta manera se puede aumentar la sensibilidad hasta 10,000 veces en relación con las rejillas no tratadas.

Se necesitan dos etapas de incubación: a) para adsorción de los anticuerpos a la rejilla, y b) para adsorción del virus a los anticuerpos. En ambas etapas se pueden emplear períodos cortos [5 min para a) y 15 min para b)] o largos [1/2 h a 3 h para a) y hasta 70 h para b)]; la elección depende de la necesidad de un diagnóstico rápido o de una mayor precisión. Se recomienda emplear rejillas cuyas coberturas de carbón sean recientes. El antisuero debe emplearse en diluciones equivalentes al título para pruebas de difusión en agar o de precipitación en portaobjetos, si el título es de 1/1024 o mayor; si es menor que este valor, la dilución puede llevarse al doble del título. Las diluciones se hacen con bófer de fosfato 0.1 M, pH 7.0, o bien en Tris, veronal, o cacodilato. La temperatura de incubación puede variar entre 4 y 37 °C, aunque en general se prefieren temperaturas bajas para evitar problemas de evaporación o de interacción electrolítica con el metal de la rejilla. Los pasos que se siguen para aplicar la técnica son:

- 1) Colocar pequeñas gotas de antisuero diluido sobre trozos de 'Parafilm', en cajas Petri humedecidas. Incubar las rejillas durante 30 minutos haciéndolas flotar sobre las gotas por la cara cubierta por la película.
- 2) Enjuagar la cara húmeda de la rejilla (manteniendo la otra cara seca) con 20 gotas consecutivas de tampón (bófer) de fosfato 0.1 M, de

pH 7.0; eliminar luego el exceso con papel de filtro evitando que la rejilla se seque.

- 3) Colocar la rejilla por la cara sensibilizada sobre una gota del extracto que puede contener el virus, durante varias horas (p. ej. durante la noche) a baja temperatura.
- 4) Enjuagar, igual que en el paso 2), con 30 gotas de agua destilada.
- 5) Enjuagar con 6 gotas de acetato de uranilo disuelto en agua al 2%, para proporcionar contraste, y retirar luego el exceso con papel de filtro. Dejar secar y observar al microscopio electrónico.

Estudio de cortes ultrafinos. Los cortes ultrafinos permiten observar las partículas virales en las células, así como los efectos citopatológicos que son consecuencia de la infección viral. En este último caso, las anomalías citopatológicas (p. ej., la deformación de cloroplastos o membranas, la presencia de inclusiones, etc.) son suficientes para confirmar la infección viral. Los cortes se pueden preparar con material procedente de cualquier etapa del cultivo de tejidos o de plantas establecidas en tierra.

El método es costoso y se justifica su empleo sólo cuando otras técnicas han resultado dudosas y cuando se trata de relaciones hospedante-patógeno suficientemente documentadas que facilitan el reconocimiento de los efectos citopatológicos. Sin embargo, es un elemento valiosísimo para asegurar la presencia de ciertos patógenos como los micoplasmas. Los detalles y los procedimientos para aplicar esta técnica escapan al objetivo de este trabajo y pueden consultarse en Kado y Agrawal, 1972.

Observación de inclusiones virales en el microscopio de luz

Uno de los cambios específicos más espectaculares causados por la infección viral es la producción, en la célula, de pequeños cuerpos, llamados inclusiones, que difieren de las estructuras celulares normales. Estos cuerpos varían en forma y composición y pueden estar localizados en el núcleo o en el citoplasma. En términos generales, las inclusiones se clasifican como amorfas y cristalinas (Figura 30.2) y dentro de estos tipos hay variantes que en muchos casos, por sus características, permiten realizar un diagnóstico certero del virus (Rubio-Huertos, 1972; Edwardson, 1974). Las inclusiones pueden visualizarse directamente con óptica de contraste de fase o se tifican para diferenciarlas de otros elementos celulares. Las inclusiones son abundantes en las células epidérmicas de hojas y tallos que

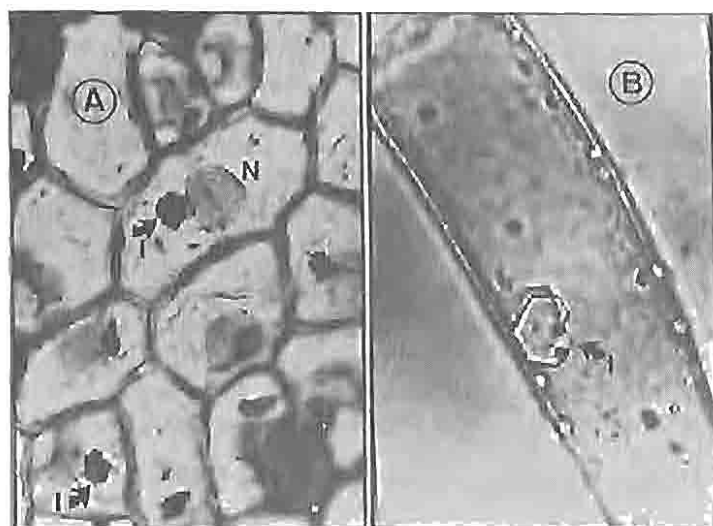


Figura 30.2. Inclusiones virales observadas con microscopio de luz.

A) Tricoma de *Nicotiana tabacum* donde se observa una inclusión cristalina (I) del virus del mosaico del tabaco. B) Células epidérmicas de *Vicia faba* donde se observan inclusiones amorfas (I = inclusiones; N = núcleo).

muestran síntomas de la enfermedad. En consecuencia, este método permitiría discriminar los síntomas virales de aquéllos producidos por anomalías fisiológicas. Las inclusiones se pueden observar en estrias epidérmicas obtenidas de hojas, en tricomas, o en cortes cuando no es posible extraer la epidermis o cuando las inclusiones están localizadas en otros tejidos.

Algunos de los colorantes empleados en métodos rápidos son 'Calco-mine orange 2 Rs', 'Congo rubin', 'Luxol brilliant green BI', 'Methyl green', 'Methylene blue chloride' y 'Phloxine'. Todos ellos pueden disolverse en una mezcla de 'Methyl cellosolve' al 1%, alcohol etílico de 95%, y agua, en la proporción 2:1:1 (Christie, 1967). Los detalles sobre el empleo de estas técnicas y los resultados obtenidos con ellas pueden consultarse en el trabajo de Rubio-Huertos (1972).

Detección de viroides por electroforesis

En el Centro Internacional de la Papa (CIP), además de las plantas indicadoras como tomate (*Lycopersicon esculentum*) y *Scopolia sinensis*,

se ha puesto en práctica un método electroforético para detectar el viroide del 'tubérculo ahusado de la papa', PSTV (Potato Spindle Tuber Viroid). Los viroides no se recubren de proteína y están constituidos únicamente por ácido nucleico (RNA) de bajo peso molecular. La mayoría de los métodos aplicados en forma rutinaria para la detección de virus (microscopio electrónico, serología) no son aplicables a los viroides y por ello es necesario 'visualizar' el RNA del viroide separándolo de los RNA de la planta mediante electroforesis. El procedimiento según Salazar (1982) incluye los siguientes pasos:

- 1) Extraer la savia de 0.5 g de tejido infectado con 1.5 ml de bófer de extracción (20 ml tetraacetato de etilendiamino de sodio (EDTA) 0.1 M + 10 ml NH_4OH 4 M + 60 ml LiCl 10 M + 50 ml H_2O) y con 2 ml de fenol saturado que contenga 10% de m-cresol y 0.1% de 8-hidroxiquinolina. Agitar. Mantener los extractos en hielo.
- 2) Centrifugar el extracto a 9000g durante 10 minutos.
- 3) Extraer la fase acuosa y añadir dos volúmenes de etanol. Agitar la mezcla y almacenarla a -20°C de 30 minutos a 1 hora.
- 4) Hacer sedimentar el ácido nucleico a 10,000 rpm durante 10 minutos; disolver el precipitado ('pellet') en 0.1 ml de agua destilada más una gota de sacarosa al 20% con azul de bromofenol.

Las muestras así procesadas se siembran en geles laminares ('slabs') de poliacrilamida y se someten a una corriente de 100 voltios durante 4 horas (a $12-15^\circ\text{C}$) o hasta que el marcador (azul de bromofenol) haya migrado de 9 a 10 cm. Se tifican toda la noche con azul de toluidina 0.1% o con azul de metileno y se destifican con dos o tres cambios de agua corriente. El RNA del PSTV migra más lentamente que el 9S RNA y suele ubicarse en la mitad del camino recorrido por éste, junto con el 5S RNA. Su ubicación se hace por comparación con el testigo sano que siempre debe incluirse en la prueba.

Detección de Microorganismos Patógenos Vasculares

Al hacer un cultivo con explantes que poseen sistema vascular diferenciado (p. ej., ápices de estolones, yemas o meristemas apicales con varios primordios foliares), debe tenerse en cuenta la posibilidad de una infección sistémica por hongos y bacterias fitopatógenos, como ocurre con algunos

representantes de los géneros *Fusarium*, *Verticillium* y *Erwinia*. Esta situación es común al multiplicar especies ornamentales como helechos, *Dieffenbachia*, crisantemos, claveles, y otras especies. En algunos casos, la acidez del medio, acentuada por acción de las raíces de las plantas (p. ej., de *Dieffenbachia*) impiden que las bacterias presentes en el tejido vegetal se manifiesten visiblemente en el medio de cultivo; por ello, las plantas que allí crecen pueden estar infectadas.

Un método eficaz para detectar esas infecciones enmascaradas ha sido propuesto para *Dieffenbachia picta* 'Perfection' (Knauss, 1976) y puede adaptarse perfectamente a otras especies. El método consta de varios pasos que pueden resumirse de la siguiente manera (Figura 30.3). A una planta desarrollada en un medio de cultivo se le separa el tallo de la raíz, que es eliminada; el tallo se corta en secciones o discos de 0.5 a 1.0 mm de espesor, comenzando desde la porción basal y dejando intacto el ápice, que se siembra en un medio de enraizamiento para producir una nueva planta. Las secciones se dividen en grupos de cuatro, para sembrar cada una de ellas en cuatro medios diferenciales. La incubación se realiza durante 3 semanas, a una temperatura de 26 a 28 °C, en tubos agitados periódicamente para promover la aireación. El crecimiento de hongos o bacterias en cualquiera de los tubos significa la eliminación del ápice que se conservó para hacerlo arraigar. Si no se observa el crecimiento de organismos, la prueba se repite de igual modo con la planta derivada del ápice; si de nuevo hay resultado negativo, se hace una tercera prueba para decidir definitivamente sobre el destino de la planta resultante. Los cuatro medios de cultivo empleados son: a) Extracto de levadura, 10 gr; dextrosa, 10 gr; caldo de cultivo, 1 litro. b) 'Sabourad' Difco. c) 'Broth AC' Difco. d) Caldo 'Trypticase Soy' BBL.

Aplicaciones

A. Pruebas para detectar virus de frutilla (fresa)

Objetivo

Determinar la presencia de alguna de las siguientes enfermedades transmisibles de la frutilla: 'mottle', 'veinbanding', 'crinkle', 'mild yellow-edge', 'tomato ring spot', 'pseudo mild yellow-edge', 'latent C' y 'leaf roll' (Frazier, 1974a y 1974b).

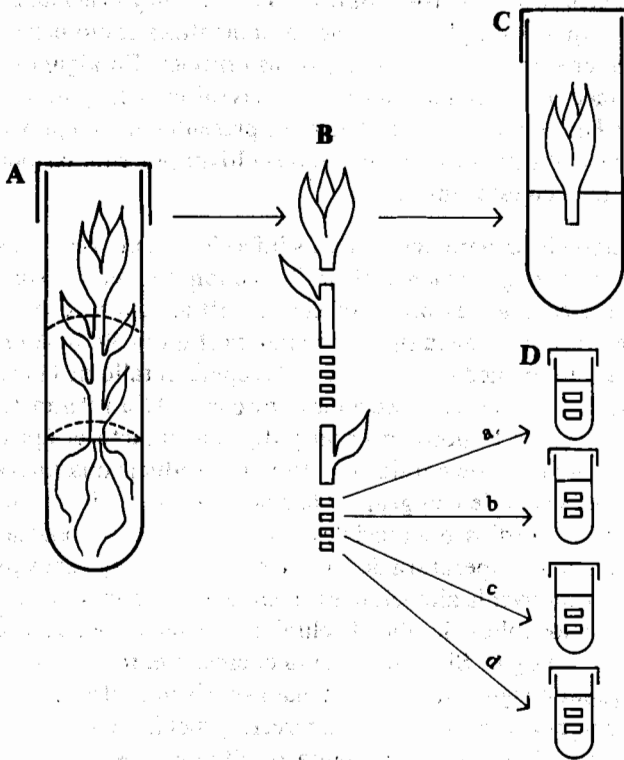


Figura 30.3. Esquema del método de detección de bacterias y hongos en plantas cultivadas in vitro (según Knauss, 1976).

A) Planta que ha adquirido un desarrollo adecuado para iniciar la prueba. **B)** La planta se retira del tubo y se secciona asépticamente en pequeños discos dejando intacto el ápice. **C)** El ápice se coloca en un tubo con medio para enraizamiento. La planta enraizada se somete al mismo proceso dos veces consecutivas. **D)** Los discos del tallo se siembran en cuatro medios de cultivo diferentes (a, b, c y d). Evaluación: si no se observa crecimiento de hongos o bacterias en los medios empleados después de repetir tres veces la prueba, se considera que la planta está libre de ellos. Si, por el contrario, hay crecimiento, en cualquiera de ellos, el cultivo y la planta se eliminan.

Materiales

- Plantas de frutilla obtenidas de cultivos de meristemas apicales o tratadas por termoterapia —o ambas cosas: cultivadas y tratadas— presuntamente libres de virus y micoplasmas.
- Plantas sanas y bien desarrolladas de las siguientes especies y clones:

- a. de *Fragaria vesca*: clones UC-4, UC-5, UC-6;
- b. de *Fragaria virginiana*: clones UC-10, UC-11 y UC-12;
- c. de *Fragaria vesca* Alpine, provenientes de semilla.

El grupo mínimo que se inocula debe incluir por lo menos los clones UC-5, UC-11 y Alpine.

- Hojas de afeitar.
- Cintas de látex, 'Parafilm' o polietileno para atar los injertos.

Procedimiento

- 1) Elegir una hoja madura (de la mitad de la planta) que posea un pecíolo vigoroso. Separar el folíolo central preparándolo en forma de cuña, cuyo extremo más fino deje visibles los haces vasculares. Mantener esa porción sumergida en agua para evitar deshidratación (Figura 30.4, A y B).
- 2) Elegir una planta de cada clon indicador; tomar de ella hojas desarrolladas completamente, cortar el folíolo central, y practicar una incisión a lo largo y por el centro del pecíolo, de longitud similar a la de la cuña del folíolo preparado antes (Figura 30.4, C).
- 3) Insertar el folíolo de la planta que se probará en el corte del pecíolo de la planta indicadora. Atar con la cinta de látex, 'Parafilm' o polietileno (Figura 30.4, D).
- 4) Cortar todas las demás hojas del clon indicador y cubrir la planta con una bolsa de polietileno, o ponerla en ambiente de alta humedad relativa (Figura 30.4, E).
- 5) Al cabo de 2 a 5 semanas observar síntomas en las nuevas hojas desarrolladas (Figura 30.4, F).

Nota: Conviene dejar una planta de cada clon, a la cual se han cortado también las hojas, como testigo sano.

B. Pruebas serológicas de floculación de látex

Objetivo

Verificar la presencia de virus en tejidos vegetales de diversas especies, especialmente en papa y cultivos hortícolas. La prueba, según Salazar (1982), se describe así:

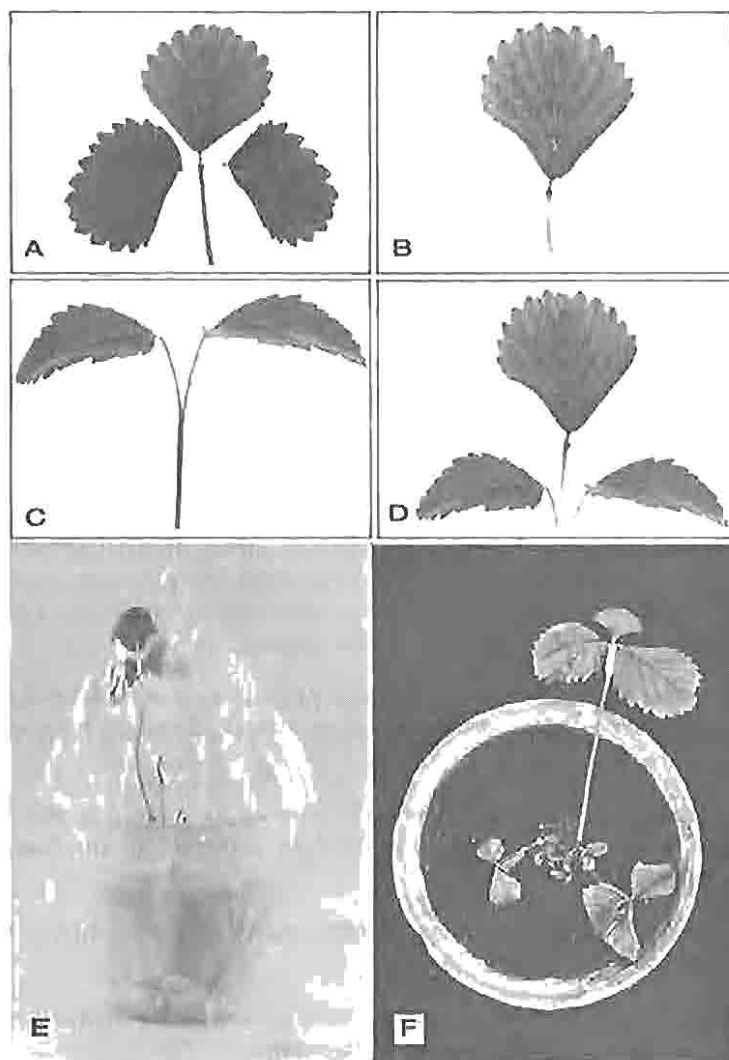


Figura 30.4. Detección de virus en frutilla (fresa) mediante el método de injerto de hoja en plantas indicadoras. A) Hoja de la planta que se quiere probar; se han separado los folíolos laterales. B) Se corta el peciolo en forma de cuña con el extremo tan delgado que permita visualizar los haces vasculares. C) Hoja de la planta indicadora en la cual se ha retirado el folíolo central y en cuyo peciolo se ha practicado un corte longitudinal. D) Se inserta el folíolo de la planta que se prueba en el peciolo de la indicadora y se ata con cinta plástica o de látex. E) Se elimina el resto de las hojas de la planta injertada y se cubre con plástico por 2-4 días. F) Los síntomas se observan en las hojas nuevas.

Materiales

- Cajas Petri plásticas, o las de vidrio recubiertas con Formvar.
- Pipetas de diversos tamaños y micropipetas automáticas o de vidrio estirado a mano, o jeringas con agujas finas.
- Solución salina (0.85% de cloruro de sodio).
- Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2.
- Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2 + PVP (polivinil pirrolidona grado 40) 0.02% + N_3Na (azida sódica) 0.05%.
- Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0 + bisulfito de sodio 1% + Tween-20 0.05%.
- Látex 0.81 μ (Difco Laboratories).
- Antisuero.
- Palillos.
- Lápiz de cera.
- Agitador rotatorio regulable, aproximadamente 120 oscilaciones/minuto.
- Lupa con aumentos de 80X a 100X.
- Centrifuga.
- Muestras para estudio, incluyendo testigos sanos y enfermos.
- Gammaglobulina.

Procedimiento

- 1) Purificar la gammaglobulina y diluirla a la concentración más adecuada.
- 2) Diluir 1 ml de la suspensión de látex en 14 ml de solución salina (1/15).
- 3) Sensibilizar el látex mezclando partes iguales (1 ml de cada uno) de la gammaglobulina diluida y del látex también diluido. Dejar 30 minutos a temperatura ambiente agitando periódicamente; centrifugar a 6000g durante 20 minutos.

- 4) Lavar el sedimento mediante centrifugación por tres veces consecutivas, empleando 2 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2 + 0.02% PVP + 0.5% N_3Na .
- 5) La solución final de látex sensibilizado se suspende en 1 ml de tampón (bófer) Tris-HCl + PVP + azida sódica 0.05%. Conservarla a 4 °C.
- 6) Extraer jugo de hojas infectadas y sanas (testigos) en mortero o prensa empleando un tampón Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0 + bisulfito de sodio 1% + Tween-20 0.05%. Hacer dos o más diluciones (p. ej. 1/10 y 1/100) del extracto.
- 7) En el fondo de la caja Petri dibujar con lápiz de cera una cuadrícula de 8 mm de lado.
- 8) Con una micropipeta o jeringa colocar en los cuadrados las gotas (0.1 ml aproximadamente) del jugo diluido, comenzando por la mayor dilución. Emplear un cuadrado para cada una. Agregar sobre el antígeno, con una micropipeta o jeringa, una gota de látex sensibilizado. Homogeneizar las mezclas con un palillo, empezando por las de menor dilución.
- 9) Tapar la caja y colocarla en agitador rotatorio a 130 vueltas por minuto, de 1/2 h a 1 h.
- 10) Leer a simple vista o con lupa, sobre fondo oscuro.

La reacción positiva se observa como grumos distribuidos homogéneamente en la gota; en las negativas la gota mantiene un aspecto lechoso (Figura 30.1, B).

Nota: La gammaglobulina puede purificarse de modo similar al descrito en la prueba de ELISA. La concentración óptima se determina en una prueba previa haciendo reaccionar diluciones dobles (de 1/4 hasta 1/2048) de gammaglobulina, con diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-6} del antígeno. La reacción más clara con la mayor dilución del antígeno señala la dilución óptima de la gammaglobulina para sensibilizar mayores cantidades de látex. Más antecedentes se pueden consultar en Ball (1974) y en Salazar (1982).

C. Prueba inmunoenzimática ELISA

Objetivo

Detectar virus que se encuentren en baja concentración en tejidos vegetales y realizar pruebas con un número elevado de muestras. La prueba, según Clark y Adams (1977b), se describe así:

Materiales

- Placas para micro-ELISA.
- Pipetas automáticas de 0.50 μ l y 50-200 μ l.
- Fotómetros para lectura a 405 nm y en ultravioleta.
- Tampones: PBS; PBS-T; PBS-T-PVP; 'sensibilizado'; 'sustrato' (ver fórmulas más adelante).
- Polivinil pirrolidona PM 40,000.
- Ovoalbúmina.
- Gammaglobulina purificada (IgG).
- Fosfatasa alcalina tipo VII-T o Tipo VII-TA (Sigma Chemical Co.)
- Sustrato para fosfatasa alcalina (fosfato de p-nitrofenilo).

Procedimiento

- 1) Agregar 200 μ l de IgG diluida en tampón de 'sensibilizado' (la concentración óptima debe ajustarse previamente para cada lote, probando valores de 0.1, 1.0 y 10 μ g/ml). Cubrir con Parafilm o colocar en cámara húmeda. Incubar de 2 a 6 horas a 37 °C. Vaciar la placa y lavar con PBS-T tres veces consecutivas. Vaciar nuevamente y secar la superficie con papel filtro.
- 2) Añadir a cada celdilla 200 μ l de jugo de planta o de antígeno (o de la solución que se prueba) diluidos (aprox. 1/10) en PBS-T-PVP. Emplear como testigos celdillas con muestra de planta sana, de planta enferma y con tampón PBS-T-PVP. Cubrir para evitar la evaporación e incubar durante la noche a 4 °C. Lavar como en el paso anterior.
- 3) Agregar a cada celdilla 200 μ l de conjugado diluido (se determina previamente el óptimo con valores de dilución de 1/400, 1/1200 y 1/3600) en PBS-T-PVP + ovoalbúmina 0.2%. Incubar a 37 °C, de 3 a 8 horas. Lavar como en el paso anterior.
- 4) Añadir 200 μ l de sustrato (fosfato de p-nitrofenilo) recién disuelto en tampón sustrato en concentración de 0.6-1.0 mg/ml. Incubar a temperatura ambiente hasta visualizar la reacción (generalmente, 1/2 hora a 2 horas). La aparición de color en los testigos sanos es una señal para estimar el tiempo máximo de reacción.
- 5) Si la lectura no se realiza inmediatamente o se prolonga por mucho tiempo, detener la reacción agregando 50 μ l de NaOH 3N.

- 6) Hacer la lectura visualmente o con fotómetro para valores de absorbancia A 405 nm.

Teóricamente, cualquier valor de A 405 superior al del testigo sano debiera considerarse procedente de tejido enfermo. Sin embargo, las lecturas en los testigos negativos (sanos) suelen ser variables. Como límite para separar lo sano de lo enfermo se puede considerar dos veces la desviación estándar de los testigos sanos o el doble del promedio de los mismos. El criterio que se emplea debe ajustarse a la experiencia acumulada en cada caso.

Nota: Las placas se pueden reutilizar, manteniendo la sensibilización con la IgG, mediante lavado con 0.2 ml de glicina-HCl de pH 2.2 durante una hora (Bar-Joseph et al., 1979b). También se puede emplear HCl 1N durante 24 horas, en cuyo caso las placas no quedan sensibilizadas.

Purificación de la IgG

- 1) Agregar 9 ml de agua destilada a 1 ml de antisuero.
- 2) Agregar 10 ml de solución saturada de sulfato de amonio para precipitar la IgG.
- 3) Dejar la solución a temperatura ambiente de 30 a 60 minutos.
- 4) Centrifugar a 10,000g durante 15 minutos. El sedimento se resuspende en 2 ml de PBS diluido a la mitad (PBS $\frac{1}{2}$).
- 5) Dializar tres veces contra 500 ml de PBS $\frac{1}{2}$, durante períodos de 4 horas o más.
- 6) Pasar la IgG a través de una columna de celulosa del tipo Whatman DE 22 o DEAE 52 equilibrado con PBS $\frac{1}{2}$. Un tamaño conveniente de columna es de 0.8 a 1.0 cm de diámetro y de 4 a 5 cm de alto.
- 7) Agregar PBS $\frac{1}{2}$ a la columna para eluir la IgG. Recoger fracciones que muestren mayor absorción a 280 nm (proteínas) y ajustar la mezcla a una concentración de 1 mg/ml, correspondiente a un valor de absorbancia de A 1.4.
- 8) Almacenar en tubos de vidrio tratados con siliconas o en tubos de plástico de 1 ml (Eppendorf) a -20 °C, o bien agregar Na₃Na 0.2% y almacenar a 4 °C.

Preparación del conjugado IgG con fosfatasa alcalina

- 1) La fosfatasa alcalina puede venir precipitada en sulfato de amonio Sigma (Tipo VII-S) o disuelta en NaCl Sigma (Tipo VII-T). Si se adquiere el primer tipo es necesario centrifugar 1 ml (aproximadamente 5 mg) y eliminar el sobrenadante. La del segundo tipo se puede emplear directamente.
- 2) Disolver el sedimento (o agregar la fosfatasa disuelta en NaCl) en 2 ml (= 2 mg) de IgG purificada.
- 3) Dializar tres veces consecutivas contra 500 ml de PBS.
- 4) Añadir glutaraldehído hasta una concentración final de 0.06%. Mezclar bien.
- 5) Dejar 4 horas a temperatura ambiente.
- 6) Eliminar el exceso de glutaraldehído mediante diálisis en 500 ml de PBS, tres veces.
- 7) Añadir albúmina de suero bovino hasta obtener una concentración final de 5 mg/ml y almacenar a 4 °C, hasta su empleo. No debe congelarse el conjugado. La azida sódica, incorporada a través del PBS de diálisis, permite su conservación.

Tampones necesarios para la prueba ELISA

- 1) PBS (pH 7.4):

8.0 g NaCl
0.2 g KH_2PO_4
2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
0.2 g KCl
0.2 g N_3Na

Completar el volumen hasta el litro. Se puede preparar una solución madre concentrada 10X.

- 2) PBS-T:

PBS + 0.5 ml Tween-20 por litro.

- 3) PBS-T-PVP:

PBS-T + polivinil pirrolidona PM 40,000 al 2%.

4) Tampón de 'sensibilizado' (coating), pH 9.6:

1.59 g Na_2CO_3
2.93 g NaHCO_3
0.20 g N_3Na

Disolver en un litro de agua destilada.

5) Tampón sustrato:

97 ml dietanolamina
800 ml agua destilada
0.2 g N_3Na

Agregar HCl 1 M hasta pH 9.8. Completar el volumen hasta un litro.

Referencias

- Aekers, G. K. y Steere, R. L. 1962. Restricted diffusion of macromolecules through agar-gel membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 59:137-144.
- Alconero, R.; Santiago, A.; Morales, F. y Rodríguez, F. 1975. Meristem tips culture and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopath.* 65:773-776.
- Ball, E. 1974. Serological test for the identification of plant viruses. *Am. Phytopathol. Soc., Ithaca, Nueva York.* 31 p.
- Barbara, D. J.; Clark, M. F. y Tress, J. M. 1978. Rapid detection and serotyping of Prunus Ringspot Virus in perennial crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Appl. Biol.* 90:395-399.
- Bar-Joseph, M.; Garnsey, S. M.; Gonçalves, D.; Moscovitz, M.; Purcifull, D. E.; Clark, M. E. y Loebenstein, G. 1979a. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Citrus Tristeza Virus. *Phytopath.* 69:190-194.
- ; Moscovitz, M. y Sharafi, Y. 1979b. Reuse of coated enzyme-linked immunosorbent assay plates. *Phytopath.* 69:424-426.
- Ben-Jacob, J.; Horst, R. K.; Geissinger, C. M.; Dimock, A. W. y Langhans, R. W. 1973. Virus indexing of callus cultures of *Chrysanthemum morifolium* by tissue implantation and mechanical inoculation. *Phytopath.* 63:37-38.
- Casper, R. 1977. Detection of Potato Leaf Roll Virus in potato and in *Physalis floridana* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopath. Z.* 90:364-368.
- Chistie, R. G. 1967. Rapid staining procedures for differentiating plant virus inclusions in epidermal strips. *Virology* 31:268-271.

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. El cultivo de meristemas para saneamiento de clones de yuca: Guía de estudio. [Contenido científico: W. M. Roca y U. Jayasinghe. Producción: Fernández, F.]. Cali, Colombia. 45 p.
- Clark, M. F.; Flegg, C. L.; Bar-Joseph, M. y Rotten, S. 1977a. The detection of *Spyroplasma citri* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopath. Z.* 92:332-337.
- y Adams, A. N. 1977b. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Cropley, R. y Tomlinson, J. A. 1971. Cherry Leaf Roll Virus. Description of plant viruses no. 80, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.
- Devergne, J. C.; Cardin, L. y Bontemps, J. 1982. Indexage biologique et immunoenzymatique (ELISA) pour la production d'oeillets indemnes de virus de la marbrure (CarMV). *Agronomie* 2:655-666.
- Edwardson, J. R. 1974. Some properties of the Potato Virus Y group. Florida. *Agr. Expt. Sta. Monograph series no. 4.* 398 p.
- Fernández-Valiela, M. V. 1969. Introducción a la fitopatología; I: Virus. 3a. ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina. 1011 p.
- Frazier, N. W. 1974a. Six new strawberry indicator clones evaluated for the detection and diagnosis of twelve graft transmissible diseases. *Plant Disease Reporter* 58:28-31.
- . 1974b. Detection of graft transmissible disease in strawberry by a modified leaf grafting technique. *Plant Disease Reporter* 58:203-207.
- Fridlund, P. R. 1976. IR-2 interregional deciduous tree fruit repository. En: United States Department of Agriculture (USDA), *Agriculture handbook no. 437.* p. 16-22.
- Graça, J. V. da y van Vuvren, S. P. 1981. Use of high temperature to increase the rate of avocado sun blotch symptom development in indicator seedlings. *Plant Disease* 65:46-47.
- Hewitt, W. B.; Martelli, G.; Dias, H. F. y Taylor, R. H. 1970. Description of plant viruses no. 28, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.
- Hollings, M. 1972. *Chrysanthemum* virus B. Description of plant viruses no. 110, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.

- Houten, J. G. ten; Quak, F. y van der Meer, F. A. 1968. Heat treatment and meristem culture for the production of virus free plant material. Neth. J. Pl. Path. 74:17-24.
- Jones, R. A. C. 1981. Use of continuous light to improve diagnosis of Potato Leafroll Virus in tuber indexing test. Plant Pathol. 30:225-232.
- Kado, C. I. y Agrawal, H. O. 1972. Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. 688 p.
- Knauss, J. F. 1976. A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv. 'Perfection' free of fungi and bacteria. Proc. Fla. State Hort. Soc. 89:293-296.
- Koenig, R.; Dalchow, J.; Lesemann, D. E. y Preil, W. 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay as a reliable tool for the detection of Chrysanthemum Virus B in chrysanthemum throughout the year. Plant Dis. Repr. 63:301-303.
- Milne, R. G. 1972. Electron microscopy of viruses. En: Kado, C. I. y Agrawal, H. O. (eds). Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. p. 76-126.
- . 1980. Notes of the course of immunoelectron microscopy (IEM) of plant viruses. Instituto di Fitovirolgia Applicata, Torino, Italia. 19 p.
- Nome, S. F. y Salvadores, C. 1980a. Obtención de plantas de batata (*Ipomoea batatas* L.) libres de virus. Rev. Fac. Cienc. Agrop. Univ. Nac. de Córdoba (Argentina) 1:87-96.
- ; Raju, B. C.; Goheen, A. C.; Nyland, G. y Docampo, D. M. 1980b. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. Phytopath. 70:746-749.
- ; Abril, A. y Racca, R. 1981. Obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales. Phyton 41 (1/2):139-151.
- Noordam, D. 1973. Identification of plant viruses: Method experiments. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Holanda. 207 p.
- Nyland, G. 1968. Development and maintenance of virus-free propagating material. Proceedings of the International Plant Propagators Society Annual Meeting.
- ; Gilmer, R. M. y Moore, D. J. 1976. Prunus ringspot group. United States Department of Agriculture (USDA). Agriculture handbook no. 437. p. 104-134.

- Palukaitis, P.; Rakowsky, A. G.; Alexander, D. M. y Symons, R. H. 1981. Rapid indexing of the sun blotch disease of avocados using a complementary DNA probe to Avocado Sunblotch Viroid. *Ann. Appl. Biol.* 93:439-449.
- Pirone, T. P. 1972. Sugar cane mosaic virus. Description of plant viruses no. 88, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.
- Ramsdell, D. C.; Andrews, R.; Gillet, J. M. y Morris, C. E. 1979. A comparison between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *Quenopodium quinoa* for detection of Peach Rosette Mosaic Virus in 'concord' grapevines. *Plant Disease Reporter* 63:74-78.
- Remah, A.; Hafid, B. y Vanderveken, J. 1981. Essais de mise au point d'une technique d'échantillonnage pour l'indexage de la maladie du 'stubborn' des agrumes par le test ELISA. *Review of Plant Pathology* 60:267.
- Rubio-Huertos, M. 1972. Inclusion bodies. En: Kado, C. I. y Agrawal, H. D. (eds.). Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. p. 62-74.
- Salazar, L. F. 1982. Manual de enfermedades virales de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 111 p.
- Shepard, J. F. 1972. Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S and M. Department of Botany and Microbiology, Montana State University. 71 p.
- Stace-Smith, R. y Mellor, F. C. 1968. Eradication of potato viruses X and S by thermotherapy and axillary buds culture. *Phytopathology* 58:119-203.
- Stone, O. M. 1968. The elimination of viruses from carnation and Sweet William by meristem-tips culture. *Ann. Appl. Biol.* 62:119-122.
- Utermohlen, J. G. y Ohr, H. D. 1981. A polyacrylamide gel electrophoresis index method for avocado sunblotch. *Plant Disease* 65:800-802.
- Vetten, H. J. 1981. Indexing of nepoviruses on *Chenopodium quinoa* after elimination of virus inhibitors in grape leaf extracts. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 88:99-110.
- Wetter, C. 1972. Potato virus M. Description of plant viruses no. 87, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.
- Wooster, P. 1981. Post-harvest tuber indexing in the seed potato seed certification schemes of England and Wales, 1978. *Plant Pathol.* 30:153-158.