

Producción de antisuero contra el virus X de la papa (*Solanum tuberosum* L.) y su incorporación a los servicios de detección mediante ELISA

Weller F.M.; Rodríguez F.I.; Medina G.I. y Muñoz J.O.

RESUMEN

Se purificó el virus X de la papa a partir de *Nicotiana glutinosa* L., clarificando el jugo vegetal por medio de ciclos de centrifugación a baja velocidad, precipitación con polietilenglicol, colchón de sacarosa y ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Con los purificados se inmunizaron conejos obteniéndose un antisuero con título 1/128 en pruebas de micro precipitación. Se purificó la gammaglobulina, parte de la cual fue conjugada con fosfatasa alcalina para utilizarla en pruebas ELISA. La gammaglobulina y conjugados obtenidos han sido incorporados al servicio de detección de virus de papa.

SUMMARY

The potato virus X was purified from *Nicotiana glutinosa* L. tissues, clarifying the plant sap by low speed centrifugation cycles, precipitations with polyethyleneglycol, sucrose cushion and sucrose density gradient ultracentrifugation. Rabbits were immunized with the purified preparations and a titer of 1/128 in micro-precipitation tests was obtained. The immunoglobulin G was purified, and conjugated with alkaline phosphatase to be used in ELISA tests. The immunoglobulin G and conjugate are at present being used by the department in virus detection in potatoes.

F.M. Weller, F.I. Rodríguez, G.I. Medina y J.O. Muñoz, Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, U.N.C.

INTRODUCCION

Entre las numerosas enfermedades de importancia que afectan al cultivo de la papa en Argentina, las virosis ocupan un lugar de relevancia, especialmente por las dificultades que se plantean para encarar el control (Calderoni, 1978; Escande *et al.*, 1984).

Para este fin, es fundamental contar en los programas de producción de papa semilla con un buen método de detección (Derrick, 1973; Clarck & Adams, 1977; Baulcombe *et al.*, 1984; Graddon & Randles, 1986; Salazar, 1986). Actualmente ésta se lleva a ca

bo mayoritariamente mediante el empleo de ELISA. El uso de esta técnica implica recurrir a menudo a la importación de antisueros debido a que no hay una adecuada provisión de producción nacional.

Es por esto que en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias se ha comenzado a ejecutar un proyecto de obtención de antisuero contra los principales virus de papa, con la finalidad de emplearlos en los servicios de diagnóstico mediante ELISA.

El objetivo de la primera etapa del trabajo consistió en la obtención de antisuero contra el virus X, el que ha

sido purificado por diversos métodos (Corbett, 1961; Francki & Mc Lean, 1968) y se caracteriza por ser fuertemente inmunogénico y alcanzar altas concentraciones en los hospedantes (Bercks, 1970).

Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

MATERIALES Y METODOS

Fuente de virus:

El material de partida para los aislamientos fue recolectado de distintos cultivos de papa del cinturón verde de la ciudad de Córdoba y de la zona de Villa Dolores (Provincia de Córdoba).

Para la identificación del virus se utilizaron técnicas de inoculación mecánica sobre hospedantes diferenciales y ELISA (Clarck & Adams, 1977; de Bokx, 1980; Salazar, 1986). Al aislamiento utilizado en este trabajo se lo denominó PVX-FCA 1.

Aislamiento y multiplicación:

Los aislamientos se realizaron a partir de lesiones locales en *Gomphrena globosa* L., utilizándose como hospedante multiplicador *Nicotiana glutinosa* L. (Bercks, 1970). Luego de inoculadas las plantas se mantuvieron en invernáculo a 18-23°C durante tres semanas, al cabo de las cuales se cosecharon las hojas de los dos tercios superiores y se almacenaron en crióstato a -20°C hasta la purificación.

Purificación del virus:

La purificación se realizó mediante ciclos de centrifugaciones diferenciales en una centrífuga Sorvall RC2-B y ultracentrifugaciones en colchón y gradiente de densidad de sacarosa (Brakke, 1960; Griffith, 1983) en una ultracentrífuga Beckman L2-65B según un protocolo elaborado en el Centro Internacional de la Papa (Nakashima, J., comunicación personal).

Doscientos gramos de tejido infectado fueron homogeneizados en buffer fosfato de Na y K 0,1 M pH 8,0 (2 ml/gr de tejido) con 0,2% de 2-mercaptoetanol y 10% de etanol absoluto, durante 30 segundos. Luego de filtrado por gasa triple, el jugo fue centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. Al sobrenadante se le agregó 1% de Triton X-100 y se agitó por una hora a 4°C, siendo luego centrifugado a 8.000 rpm por 20 minutos. Al clarificado se le agregó polietilenglicol 8.000 (Sigma) en una proporción del 4% y NaCl 0,2 M, sometiénolo a agitación por una hora a 4°C, dejando en reposo por una hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm por 20 minutos. El sedimento se resuspendió en buffer fosfato 0,05 M pH 8,0 (1/10 del volumen inicial) más 1% de Triton X-100 y se dejó en agitación durante 18 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó en un colchón de sacarosa al 30% en el mismo buffer a 25.000 rpm por 228 minutos, usando el rotor SW25,1. El sedimento se resuspendió en buffer fosfato 0,05 M pH 7,2 y se centrifugó a 8.000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se

colocó sobre un gradiente de densidad de sacarosa 30-60% en buffer fosfato 0,01 M pH 7,2 con 0,01 M de EDTA y se centrifugó durante 228 minutos a 25.000 rpm con el rotor SW25,1. Las bandas de virus se recolectaron y se precipitaron a 40.000 rpm por 60 minutos con el rotor SW65 Ti. El virus precipitado se resuspendió en 0,5 ml de buffer fosfato 0,01 M pH 7,2.

La concentración y pureza de las suspensiones virales se determinaron por medio de espectrofotometría (Noordam, 1973) y microscopía electrónica para lo que se usaron un espectrofotómetro Beckman BK-2A y un microscopio electrónico Siemens-Elmiskope 101.

Obtención de antisuero. Inmunización:

Con los purificados obtenidos se llevó a cabo un programa de inmunización en conejos de raza californiana de trece meses de edad en los que se inyectó de manera intramuscular una serie de dosis de suspensión viral emulsificada en coadyuvante de Freund incompleto (Weiler, 1986) (Cuadro 1).

Fase de inmunización	Días a partir de la 1° inyección	Dosis inyectada (ml susp viral/ml CFI)	Vol extraído (ml)
Preinmunización	0	0,2/0,25	
Fomentadoras	7, 14, 21	0,2/0,25	
Fomentadoras	42	0,4/0,5	
Extracciones	49, 56		20
Fomentadoras	70	0,4/0,5	
Extracciones	77, 84		20

Abreviaturas CFI Coadyuvante de Freund incompleto

Cuadro 1 Esquema de inmunización en conejos.

Determinación del Título:

Después de cada extracción la sangre se dejó coagular durante tres horas a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se descartó el coágulo y se clarificó el suero mediante una centrifugación a 5.000 g durante treinta minutos (Noordam, 1973). El título del antisuero obtenido se determinó mediante la prueba de microprecipitación en soporte sólido (van Slogteren, 1955).

Purificación de la gammaglobulina:

Al suero clarificado se lo centrifugó a 12.000 g durante 20 minutos con una solución de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturada para precipitar las globulinas. El pellet se resuspendió en 8 ml de PBS 0,5x, dializándose luego contra PBS 0,5x.

Posteriormente se corrió por una columna de intercambio iónico de DEAE celulosa, eluyendo con PBS 0,5x y se recogieron las fracciones que constituían el primer pico de lectura a 280 nm (Salazar, 1982; van

Regenmortel, 1982)

ELISA:

Se conjugaron pequeñas fracciones de la inmunoglobulina G anti-PVX purificada (concentrada a 1 mg/ml) con fosfatasa alcalina (Type VII T, Sigma), utilizando glutaraldehído al 0,06% como agente acoplante (Salazar, 1982) y se realizaron ensayos de prueba ELISA (Clarck & Adams, 1977; de Bokx *et al*, 1980; Gugerli & Gehriger, 1980) probándose distintas diluciones de gammaglobulina y conjugado. Los resultados se determinaron por observación visual y mediante lecturas a 405 nm en un lector Bio-Tek Instrumentes Microplate EL308.

RESULTADOS

Purificación del virus, rendimientos. Pureza:

Después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa las bandas opalescentes correspondientes al virus se ubicaron aproximadamente a 2,5 cm por debajo del menisco. Luego de precipitadas y resuspendidas el espectro de absorción corrido se correspondió con el de las nucleoproteínas (Figura 1), dando un valor de A_{260} de 1,440 y de A_{280} de 1,230, luego de diluir la suspensión viral 1/4. El cociente $A_{260/280}$ fue de 1,17 y el rendimiento de virus fue de 7,76 mg/kg de tejido, asumiendo que $A_{260} = 2,97$ equivale a 1 mg/ml (Bercks, 1970).

En el microscopio electrónico se observaron gran cantidad de partículas alargadas flexuosas, en su mayoría completas (Figura 2).

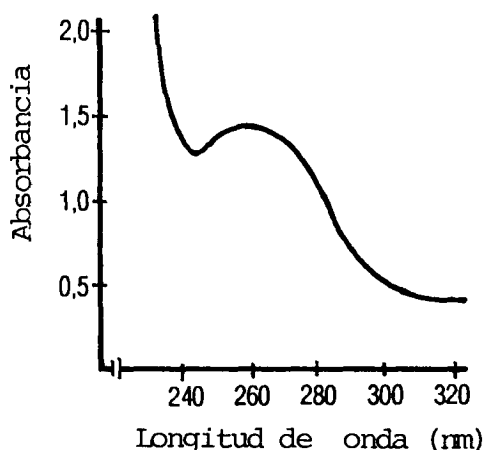


Figura 1. Espectro de absorción en UV de la suspensión viral purificada diluida 1/4.

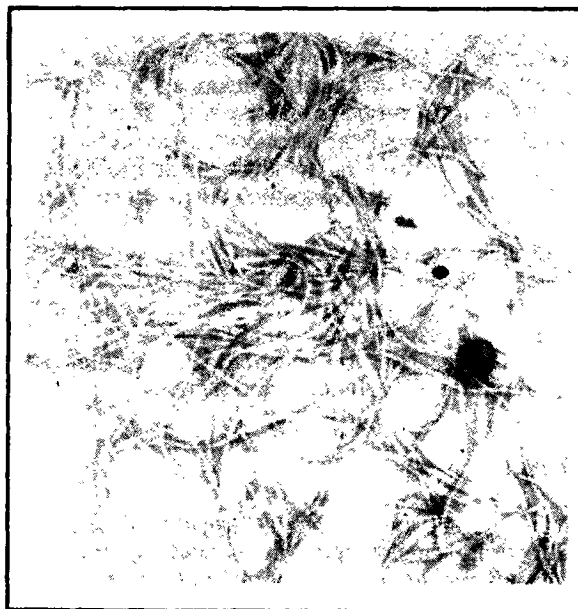


Figura 2. Micrografía electrónica de la suspensión viral, mostrando partículas flexuosas (30000X).

Producción de antisuero:

El título del antisuero obtenido fue de 1/128, establecido mediante la prueba de microprecipitación.

Detección de virus por ELISA:

En todas las diluciones probadas de gammaglobulina (hasta 1 µg/8 ml) y de conjugado gammaglobulina-fosfatasa alcalina (hasta 1 µg/8 ml) se observaron claras diferencias entre los controles sanos y enfermos, tanto en observación visual como en lecturas de absorbancia a 405 nm (Cuadro 2). El antisuero dio reacción negativa con aislamientos de PVY y PLRV.

	IgG	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000
Conj.					
1/1000		> 3,00	> 3,00	> 3,00	2,351
1/2000		> 3,00	2,446	2,245	1,793
1/4000		1,623	1,576	0,897	0,925
1/8000		0,851	0,692	0,317	0,654

Promedio de controles sanos: -0,172

Promedio de buffer extracción: 0,008

Abreviaturas: IgG: gammaglobulina anti-PVX

Conj.: conjugado gammaglobulina fosfatasa alcalina

Cuadro 2. Valores de absorbancia a 405 nm de ELISA de extractos de hojas infectadas con PVX.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El cociente $A_{260/280} = 1,17$ indicó un alto grado de

pureza de las suspensiones virales obtenidas, lo que fue corroborado por las observaciones al microscopio electrónico, en las que se vieron partículas con morfologías correspondientes a potexvirus y sin contaminaciones. Esto, unido a los rendimientos de virus indican que el método de purificación resultó muy satisfactorio.

El antisuero preparado a partir de las suspensiones virales demostró alta sensibilidad para la detección de PVX y su utilidad para ser incorporado al servicio de diagnóstico rutinario mediante ELISA.

La disponibilidad de antisuero producido es suficiente para proveer a otros laboratorios.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo forma parte del proyecto "Producción de propágulos hortícolas de sanidad controlada", parcialmente subsidiado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

BIBLIOGRAFIA

- Baulcombe, D. C., Flavell, R. B., Boulton, R. E. and Jellis, G. J. 1984. The sensitivity and specificity of rapid nucleic acid hybridization method for the detection of PVX in crude sap samples. *Plant Pathology* 33: 361-370.
- Bercks, R. Potato Virus X. En: *Description of Plant Viruses*. Set 1. Sheet 4. Surrey, Inglaterra, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1970. 4pp.
- Brakkø, M. K., 1960. Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. *Advances in Virus Research* 7: 193-224.
- Calderoni, A. V. Enfermedades de la papa y su control. Bs. As., Ed. Hemisferio Sur, 1978. 145pp.
- Clarck, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Corbett, M. K., 1961. PVX purification without aggregation. *Virology* 15: 8-15.
- de Bokx, J. A. Plantas indicadoras. pp 115-126. En: *Virosis de la papa y de la semilla de papa*. J. A. de Bokx. Bs. As., Ed. Hemisferio Sur, 1980.
- de Bokx, J. A., Piron, P. G. M., Maat, D. Z., 1980. Detection of PVX in tubers with the ELISA. *Potato Research* 23: 129-131.
- Derrick, K. S. 1973. Quantitative assay of plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56: 652-653.
- Escande, A. R., Calderoni, A. V., Melegari, A. L. La papa. Diagnóstico y control de sus enfermedades. Balcarce, INTA, 1984. 48pp.
- Francki, R. I. B. and Mc Lean, G. D., 1968. Purification of PVX and preparation of infectious ribonucleic acid by degradation with lithium chloride. *Australian Journal of Biological Sciences* 21: 1311-1318.
- Graddon, D. J. and Randles, J. W. 1986. Single antibody dot immunoassay. A simple technique for rapid detection of plant virus. *Journal of Virological Methods* 13: 63-69.
- Griffith, O. M. Techniques of preparative, zonal and continuous flow ultracentrifugation. 4° ed. California, Spinco Division, Beckman Instruments, 1983. 50 pp.
- Gugerli, P. and Gehriger, W. 1980. ELISA for the detection of PLRV and PVY in potato tubers after artificial break of dormancy. *Potato Research* 23: 353-359.
- Noordam, D. Identification of plant viruses: methods and experiments. Capítulos 12 y 13: pp88-139. Wageningen, Pudoc, 1973.
- Salazar, L. F. Enfermedades virosas de la papa. Sección 5: pp41-63. Apéndices 1-3: pp103-105. Lima, C. I. P., 1982.
- Salazar, L. F., 1986. Detección de virus en la producción de semilla de papa. Montevideo, Ed Hemisferio Sur y C. I. P. 14pp. (Boletín de información técnica 18).
- van Regenmortel, M. H. V. Serology and immunochemistry of plant viruses. Capítulo 4: pp39-64. New York, Academic Press, 1982.
- van Slogteren, D. H. M. 1955. Serological microreactions with plant viruses under paraffin oil. *Proceedings of conferences on potato virus diseases*. pp51-54.
- Weiller, E. W. Immunology in plant sciences. Capítulo 1: pp 1-17. Adelaide, Australia, Springer-Verlag, 1986.