PN ABU-643
94290

UNIDAD TECNICA DE CAPACITACION 1

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA DE PLANTAS

Fascículos

Editores: U. Jayasinghe y L. F. Salazar

Departamento de Patología

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)
Apartado 5969 - Lima, Perú. Télex: 25672 PE. Cables: CIPAPA, Lima
Teléfonos: 366920; 354354. FAX: 351570. Correo electrónico: 157:CGI801; 157:CGI043

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)** constituyen materiales impresos de estudio para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP, y están compuestas por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

Citación correcta del Manual

Jayasinghe, U.; Salazar, L. F. (eds.) 1993. Manual de técnicas en virología de plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). CIP, Lima, Perú.

Ejemplo de citación correcta de un fascículo

Centro Internacional de la Papa (CIP). 1993. Prueba de látex. In: Jayasinghe, U.; Salazar, L. F. (eds.). Manual de técnicas en virología de plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). CIP, Lima. Fasc. 3.3.5, 3pp.

Procesado por el Departamento de Capacitación y Transferencia de Tecnología, CIP, Lima, Perú.
Coordinación: Ing. M.C. Américo Valdez M.
Editado e impreso en la Unidad de Comunicación, CIP, Marzo, 1993.
Copias impresas: 400

PRESENTACION

Desde el inicio de sus operaciones en 1972, el Centro Internacional de la Papa (CIP) se comprometió a proveer capacitación en actividades de producción de papa a los programas nacionales de los países en desarrollo. La actividad más requerida fue capacitación en Virología debido a su importancia en la producción de semillas de papa y a que el control de las enfermedades causadas por virus es posible por métodos preventivos, pero no por métodos curativos. Un buen conocimiento de las entidades virales y de los métodos de detección son instrumentos fundamentales para el control.

A través de los años la Unidad de Virología del CIP ha desarrollado un conocimiento profundo sobre los virus que afectan a la papa, y también ha adaptado o desarrollado métodos ultrasensitivos para su detección. El conocimiento sobre estas técnicas ha sido transferido a los programas nacionales de países en desarrollo mediante capacitación individual o cursos de virología, y los detalles técnicos han sido entregados a los participantes en presentaciones orales o en breves informaciones escritas.

Concientes de la necesidad de una fuente permanente de información, los miembros de Virología hemos compilado, mejorado y editado este manual técnico que describe la mayoría de las técnicas que en nuestros laboratorios han demostrado ser adecuadas, y que han sido probadas numerosas veces en los laboratorios de muchos países. En ningún momento creemos que esta información suple a la contenida en libros o en revistas científicas. Mas bien intentamos que esta información complemente la existente con técnicas o modificaciones que han sido exitosas en nuestro laboratorio.

Además, el haber compilado la información en fascículos sueltos permite facilmente poner al día la información cuando sea necesario, reduciendo la necesidad de publicar nuevas ediciones revisadas.

Los materiales aquí tratados cubren un rango amplio de técnicas para identificación caracterización detección y control de virus.

El staff que participó en la preparación de este manual fue liderado por el Dr. Upali Jayasinghe con colaboración especial de los siguientes miembros del laboratorio de Virología: Charlotte Lizarraga, Christian Delgado, Segundo Fuentes, Ciro Barrera, Ernesto Velit, José Rocha, Maddalena Querci, Ida

Bartolini, Miguel Cervantes, Miguel Espejo, Vidal Lazarte, Carlos Chuquillanqui, Josefina Nakashima, Ilse Balbo, Marco A. Meza y Jaime Arellano.

La incorporación de textos, diseño de computación y dibujo lo hicieron gracias al excelente trabajo de Gianinna Brigneti, también agradecemos al Departamento de Capacitación y Transferencia de Tecnología y a la Unidad de Comunicación del CIP por su apoyo y colaboración durante varias etapas de la producción y publicación de este manual.

Los miembros del Departamento de Virología dedican este manual al Dr. William J. Hooker, un patólogo que allanó el camino para obtener grandes logros en Virología, tanto en el CIP como internacionalmente.

Dr. L. F. Salazar
Jefe del Dpto. de Patología

ERRATA

Lugar	dice	debe decir
Presentación	Lizarraga	Lizárraga
Contenido: 3.4.5	Sondad	sondas
Solicitud de pedido	Pulbicación	publicación
	fasciculos	fascículos
Fasc. 3.2.1, Plantas Indicadoras	*Lycopersicum*	*Lycopersicon*
Fasc. 3.2.2, pág 2, penúltima línea	nemátodos	nematodos
Fasc. 3.3.6, pág. 2, 2º recuadro	0,2G NaN_3	0,2g NaN_3
Fasc. 3.4.2, pág. 2, 1er recuadro	H2O	H_2O.
Fasc. 4.1, pág. 1	$\frac{\text{LambdaxNA}}{2}$	$d = \frac{\text{LambdaxNA}}{2}$
pág. 5 Leyenda foto	alam-bre	alambre.
Pág. 7	$\frac{d}{do}$	$\frac{d}{do}$
Fasc. 5.3, pág. 3, 3er párrafo	10000 lux + 108 $uEm^{-2}s^{-1}$	10000 lux ó 108 $uEm^{-2}s^{-1}$

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA DE PLANTAS

CONTENIDO

1.0 INTRODUCCION

2.0 TRANSMISION

2.1 Transmisión de virus de plantas
2.2 Transmisión de virus de papas por áfidos

3.0 DETECCION

3.1 Sintomatología

3.1.1 Sintomatología de las enfermedades virales en plantas
3.1.2 Enfermedades producidas por organismos parecidos a micoplasmas en plantas de papa

3.2 Plantas indicadoras

3.2.1 Producción y mantenimiento de plantas indicadoras
3.2.2 Desinfección del sustrato de siembra
3.2.3 Inoculación de plantas indicadoras para la detección de virus de plantas

3.3 Serología

3.3.1 Introducción a la Serología
3.3.2 Producción de antisueros
3.3.3 Purificación y conjugación de antisueros
3.3.4 Prueba de doble difusión en gel (Ouchterlony)
3.3.5 Prueba de látex
3.3.6 Ensayos inmunológicos con conjugados enzimáticos: doble anticuerpo o "Sandwich" (DAS-ELISA)
3.3.7 Ensayos inmunológicos con conjugados enzimáticos: en membranas de nitrocelulosa (NCM-ELISA)
3.3.8 Ensayos inmunológicos con conjugados enzimáticos: conjugado enzimático de penicilinasa (PNC-DAS-ELISA)

3.4 PSTVd

3.4.1 El viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd)
3.4.2 Detección de PSTVd por electroforesis en gel de acrilamida
3.4.3 Hibridación de ácidos nucleicos
3.4.4 Preparación de muestras para la detección de PSTVd mediante hibridación de ácidos nucleicos
3.4.5 Preparación de sondad con ^{32}P mediante el sistema de transcripción
3.4.6 Preparación de sondas con ^{32}P mediante la técnica "nick translation"
3.4.7 Preparación de sondas no radiactivas mediante la técnica "nick translation"

4.0 MICROSCOPIA

4.1 Microscopía electrónica
4.2 Técnicas serológicas en microscopía

5.0 CONTROL

5.1 Estudio de poblaciones de áfidos
5.2 Técnica de inoculación masiva con pistola pulverizadora para evaluar la resistencia a los virus X e Y de la papa

5.3 Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos

6.0 PURIFICACION

6.1 Fundamentos de la purificación de virus de plantas
6.2 Protocolos de purificación de virus de plantas
6.3 Conceptos generales sobre centrifugación

LA UNIDAD TECNICA DE CAPACITACION (UTC), *constituye un material de apoyo y estudio para los profesionales involucrados en acciones de adiestramiento o capacitación desarrollados por los Programas del CIP, con base en un programa especializado en un área de investigación.*

El diseño de cada UTC. responde a la urgencia de apoyar los cursos con materiales de información sin que éstos estén necesariamente completamente editados. Cada una está formada por una serie de artículos, a modo de fascículos, que siguen un orden programado, los que podrán completarse y sustituirse progresivamente con materiales más avanzados y editados. Una UTC es un material para el estudio y trabajo, que trata de integrar conocimientos, informaciones, prácticas y referencias acerca de una materia determinada, configurando una unidad de capacitación.

Los fascículos, pueden o no estar completos en un inicio pero se irán completando en el tiempo, lo cual permitirá mantener una relación con los participantes del curso, aunque éstos hayan retornado a sus lugares de origen.

Se puede apreciar que cada fascículo lleva impreso en su margen inferior derecho una clave que lo identifica y ubica en el lugar correspondiente, según la tabla de contenido. En el margen inferior izquierdo está indicada la fecha de publicación. Existen además separadores que facilitan la ubicación de los capítulos.

En las UTCs se pueden incluir materiales ya publicados o sus adaptaciones, tales como los CRGs, TIBs, diapositivas didácticas, o fotocopias de publicaciones.

Para cualquier información adicional dirigirse a:

Centro Internacional de la Papa - CIP
Departamento de Capacitación y Transferencia de Tecnología
Apartado Postal 5969 Lima - Perú
Fax 35-1570, Tel. 366920, Telex 25672 PE

Para pedidos dirigirse a:

Oficina de Distribución de Publicaciones

ORDER FORM
SOLICITUD DE PEDIDO

If you want to receive information about the publication of news fascicles or updated editions, please complete the form below and send it to:

Si desea recibir información sobre la pulbicación de nuevos fasciculos actualizados, por favor complete el siguiente formulario y envíelo a la siguiente dirección:

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)
DEPARTAMENTO DE CAPACITACION Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA
CASILLA POSTAL 5969
Lima - Perú

Name (Nombre): _____

Title (Título): _____

Organization (Institución): _____

Address (Dirección): _____

City, State, Zip (Ciudad, Estado, Código_____

Country (País): _____

Telephone (Teléfono) _____ FAX _____

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

DEPARTAMENTO DE CAPACITACION Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA

CASILLA POSTAL 5969

LIMA - PERU

AIR MAIL

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

2.0 TRANSMISION

Fascículo 2.1 Transmisión de Virus de Plantas

Los virus pueden ser transmitidos de diferentes formas:

1. Mecánicamente
2. Por injerto
3. Por propagación vegetativa
4. Por la semilla botánica
5. Por el polen
6. Por cúscuta
7. Por vectores

I. Transmisión Mecánica

Para que sea posible la transmisión mecánica es necesario que exista una herida previa en la planta y que se produzca el contacto del jugo celular infectado con una célula sana. Las heridas deben ser muy pequeñas, como las que son el resultado de quebraduras de pelos; en condiciones naturales la transmisión tiene lugar por el contacto entre hojas que se rozan. Sólo un número reducido de virus son diseminados en la naturaleza por contacto (TMV, PVX, PVS, APMV, APLV y PSTVd).

A) Transmisión por contacto entre tubérculos o brotes de tubérculos de papa

Algunos virus pueden diseminarse cuando los tubérculos sanos, especialmente si están brotando, se ponen en contacto con tubérculos infectados en el almacén. También ocurre transmisión cuando los tubérculos son cortados antes de la siembra.

B) Transmisión por contacto entre hojas y raíces

Bajo condiciones de campo el PVX y el PSTVd pueden ser fácilmente transmitidos a plantas sanas que están en contacto con plantas enfermas. El viento, que favorece el contacto entre plantas, incrementa las posibilidades de diseminación de estos virus.

Este tipo de diseminación depende de varios factores como la susceptibilidad del cultivar, la virulencia de la variante del virus, el estado de fertilidad del cultivo, el espaciamiento entre los surcos y la distancia entre las plantas, además de otros.

Aparentemente, la transmisión por contacto es más frecuente en invernaderos que en condiciones de campo. Esto quizás depende del estado fisiológico de las plantas, las cuales son más jugosas y susceptibles bajo condiciones de invernadero. Se ha observado la transmisión de PVX por contacto entre raíces, pero no existe tal evidencia para otros virus de papa.

La técnica de transmisión mecánica más popular es frotar el jugo proveniente de alguna planta infectada sobre hojas de plantas sanas.

Para un ensayo típico de transmisión mecánica se debe contar con el siguiente

material: mortero con su pilón, hisopos de algodón, abrasivo, tejido vegetal infectado con virus y buffer de inoculación. Se coloca el tejido vegetal dentro de un mortero y se le añade de 1 a 10 ml de solución amortiguadora por gramo de tejido. Las soluciones amortiguadoras comúnmente usadas son fosfato, citrato y borato en concentraciones de 0,01M a 0,1M y a pH de 6 a 9 para estabilizar al virus.

El tejido es macerado en el mortero. El inóculo es aplicado sobre la superficie de las hojas de plantas jóvenes, las cuales se espolvorean previamente con un abrasivo como el carburo de silicio (Carborundum), óxido de aluminio (Corundum) o tierra de diatomeas (Celite) de 600 mesh. El abrasivo puede ser espolvoreado usando un tubo que contiene atado una malla en su extremo o usando un asperjador. La aplicación del inóculo se hace pasando suavemente sobre las hojas un hisopo de algodón o el dedo índice humedecido con el inóculo. Las hojas inoculadas son enjuagadas con agua y colocadas en un invernadero. Los morteros usados son lavados y colocados en un depósito con lejía al 1% y posteriormente enjuagados. Luego son colocados en una estufa a 150°C durante 3 horas. Posteriormente estos morteros pueden ser nuevamente usados.

En los hospederos con lesiones locales, los síntomas aparecen con frecuencia al cabo de 3 a 7 días o más y el número de lesiones es proporcional a la concentración del virus en la savia.

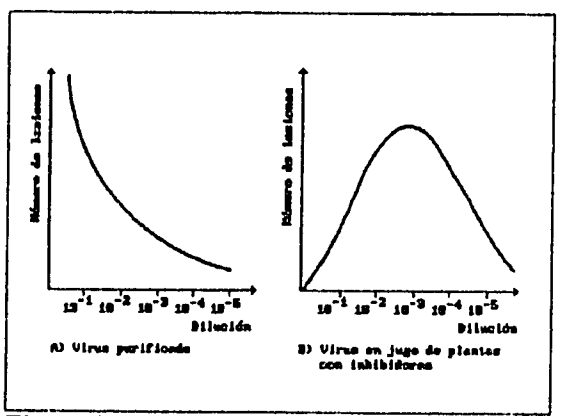
En los hospederos infectados sistémicamente, los síntomas comúnmente tardan entre 10 y 14 días o más para desarrollarse. Ocasionalmente, las mismas plantas pueden mostrar al principio lesiones locales y posteriormente síntomas sistémicos.

La inoculación mecánica mediante pulverización a alta presión ha sido efectiva con varios virus y es útil cuando se necesita inocular un gran número de plantas con un determinado virus.

La pistola pulverizadora es útil para inocular plantas individuales; con este método se incorpora alrededor de 1% de Carborundum fino al inóculo y se agita para mantenerlo en suspensión durante la inoculación. Se aplica la pulverización a una presión entre 50 y 75 lb/pulg^2, y se mantiene la boquilla a 2-5 cm de la superficie de la hoja. Esta técnica es utilizada en el tamizado para resistencia a virus (PVX, PVY).

Existen algunas sustancias en los tejidos de la planta que son factores limitantes en el éxito de la transmisión:

a) Inhibidores de la infección
b) Inactivadores de las partículas virales



Efecto de la dilución de la savia infectada en el número de lesiones locales producidas en plantas indicadoras.

a) Inhibidores de la infección

Son sustancias presentes en muchas plantas y que reducen la infección en la inoculación.

Al moler las hojas ciertas sustancias, como los inhibidores que se encuentran en la vacuola celular, son liberadas con la savia. Se cree que actúan de dos formas:

- Reduciendo la susceptibilidad del hospedero

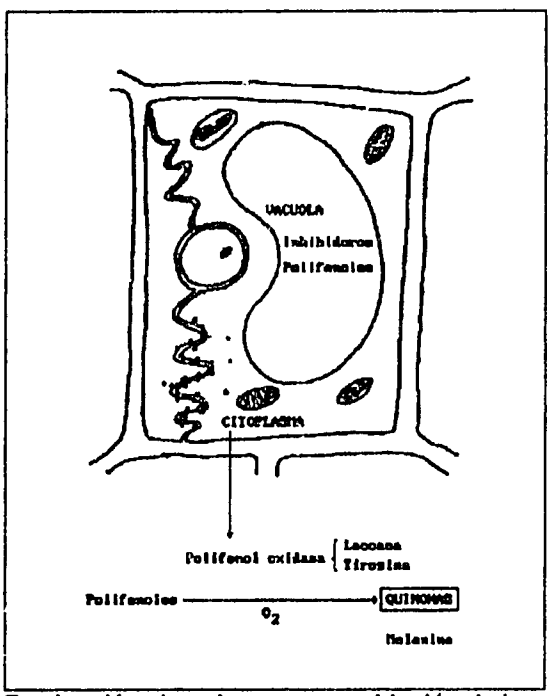
- Interfiriendo con el proceso de infección.

El efecto del inhibidor se puede contrarrestar haciendo diluciones del inóculo o utilizando algunas sustancias que atrapen al inhibidor (esto es algo difícil porque en muchos casos no se conoce la naturaleza del inhibidor).

Al diluir la savia infectada, el efecto del inhibidor tiende a desaparecer más rápidamente que la infectividad del virus.

Cuando el inhibidor es extraído químicamente de la savia la infección se restablece, por lo tanto, este no tiene ningún efecto sobre la partícula viral, sino sobre el proceso de infección.

b) Inactivadores de la partículas virales



Producción de quinonas por oxidación de los polifenoles presentes en la vacuola celular.

Son compuestos formados por la oxidación de los polifenoles (presentes en las vacuolas) que entran en contacto con las enzimas presentes en el citoplasma y que se oxidan al macerar los tejidos.

Las quinonas son compuestos muy tóxicos que pueden destruir algunas proteínas: actúan a nivel de las subunidades proteicas del virus, exponiendo el ácido nucleico a las ribonucleasas (enzima muy común en el reino vegetal). Basta una sola ruptura en el ácido nucleico viral para que este deje de ser infectivo. El inactivador actúa sobre el mismo virus (lo inactiva permanentemente) y su efecto no desaparece al realizar diluciones. Las quinonas dan origen a reacciones posteriores que forman compuestos pigmentados oscuros (melanina).

El efecto de los inactivadores se puede contrarrestar de la siguiente manera:

- Con antioxidantes, que compiten con el polifenol por el O_2, reduciendo la proporción de quinonas. Algunos de los más utilizados son el 2-mercaptoetanol, el ácido ascórbico, la cisteína, el bisulfito de sodio y el ácido tioglicólico. Se utilizan en proporciones de 0,1 a 1%.

- Con sustancias que capturan polifenoles como cafeína, nicotina, Al_2O_3 y PVP (polivinilpirrolidona). Se utilizan en proporción de 10% p/p.

- Con inhibidores de la enzima polifenol oxidasa como DIECA (0,001 a 0,01M) que es un agente quelante (captura iones de Cu).

Algunos de estos productos son agregados en los buffers de homogeneizado durante el proceso de purificación de virus, ya que también producen la ruptura de tejidos.

II. Transmisión por injerto

El injerto es una técnica en la que las superficies cortadas de los tejidos de diferentes plantas se ponen en íntimo contacto, de manera que se establezca la unión.

Todos los virus que son sistémicos en su hospedero pueden ser transmitidos, con mayor o menor facilidad, mediante injertos. Debido a ello el injerto ha sido denominado como el método universal de transmisión de virus.

El injerto es útil para los virus restringidos al floema, los que no se transmiten mecánicamente, los virus cuyos vectores no son aún conocidos o para detectar virus que se encuentran en bajas concentraciones.

El uso de injertos a veces resulta en menos de un 100% de transmisión. Esto puede deberse a la inhabilidad del virus de traspasar la zona de unión. En algunos casos puede ser que la planta fuente de virus no esté totalmente invadida y la porción usada para injertar puede haber estado libre de virus (por distribución irregular del virus).

La transmisión exitosa depende de las propiedades del virus y de la unión del injerto. Un virus como el PLRV, que se limita al sistema vascular, puede transmitirse sólo cuando se unen los tejidos vasculares; mientras que un virus que afecta sólo el parénquima es más fácil de transmitir, pues depende sólo de la unión de la corteza o medula. Los virus muy contagiosos como el PVX y TMV sólo requieren del contacto mecánico entre el trozo injertado y portainjerto.

Existen diversas formas de realizar el injerto: de púa, de cuña, de aproximación, de yema y de inserción de cilindro en tubérculos de papa (injerto de corazón).

- Injerto de cuña. Se hace un corte diagonalmente hacia el centro del tallo de la planta sana. Se corta una porción de la planta infectada en forma de cuña y se coloca en el corte del tallo. Se cubre el injerto con Parafilm y luego la planta con una bolsa plástica humedecida durante 4 días.

- Injerto de púa. Se realiza en forma similar al anterior con excepción de que se corta la punta del portainjerto y se hace una hendidura en la parte superior, sobre la que se coloca la porción de la planta infectada en forma de cuña.

III. Transmisión mediante propagación vegetativa

Siempre que las plantas se propaguen vegetativamente mediante gemación o injerto, esquejes, tubérculos, cornos, bulbos o rizomas, si la planta madre se encuentra infectada, la progenie también resultará infectada. Este medio de tran misión es el más importante para estos tipos de plantas.

IV. Transmisión por Semilla Sexual

Casi un centenar de virus son transmitidos por la semilla sexual (comunmente llamada semilla botánica o semilla verdadera en el caso de la papa). En virología este tipo de transmisión es conocida como transmisión vertical.

La transmisión por semilla es muy importante cuando existe un vector. Por ejemplo, el virus del mosaico común del frijol tiene un porcentaje de transmisión por semilla muy alto y posee vectores (áfidos) muy eficientes. Si el porcentaje de semillas infectadas que se siembra es bajo, los áfidos se encargan de incrementar la infección en el cultivo.

Los virus puede transmitirse por semillas bajo dos formas:

- Externamente, en la cubierta de la semilla. Esto ocurre por contaminación de la pulpa del fruto en la cubierta de la semilla (virus del mosaico del tabaco en el ají). En este caso la semilla se puede desinfectar con productos químicos, como HCl (37%) diluido 1/20 durante 4 a 8 horas.

- Internamente, en el embrión y endospermo. En este caso el virus no se puede eliminar por desinfección con productos químicos u otra

forma. El virus permanece en el interior de la semilla por largo tiempo y la diseminación del virus a larga distancia es muy efectiva (bean common mosaic, tobacco ring spot).

Entre los factores que influyen en el porcentaje de transmisión de virus por semilla sexual tenemos:

- Tipo o strain del virus (tobacco ringspot en 100%, APLV en 1%).

- Especie y variedad del hospedero. Los Nepovirus son transmitidos en muchos hospederos (barley stripe virus de 0 a 75%, dependiendo de la variedad).

- La época en que la planta es infectada. En general, mientras más pequeña es la planta infectada, la probabilidad de que haya transmisión por la semilla sexual es mayor. En el frijol habrá transmisión si la infección ocurre antes de la floración, pero no si la planta fue infectada después de la floración.

- Edad de la semilla. Algunos virus pierden rápidamente su infectividad en la semilla con los años de almacenamiento antes que la semilla pierda su poder germinativo. El "cherry necrotic ring spot virus" desaparece a los 6 años. Algunos virus se detectan cuando la semilla se está formando; pero cuando madura desaparecen. Esto ocurre porque en las semillas maduras o en germinación hay sustancias que van a actuar como inactivadores y que no existen en las semillas jóvenes. En la mayoría de los virus transmitidos a través de las semillas de las plantas parece ser que el virus proviene principalmente del óvulo de las plantas infectadas, pero se conocen varios casos en los que el virus que se encuentra en la semilla parece provenir, con la misma frecuencia, del polen que fertilizó la flor.

En papa, dada su alta transmisión por la semilla sexual (hasta 100%) el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd) es el más importante. PVT ha sido transmitido experimentalmente con alta frecuencia (hasta 65%). APLV ha sido transmitido en 1%.

La determinación experimental de la transmisión por semilla se realiza recolectando las semillas de las plantas infectadas y dejándolas crecer para observar el porcentaje de las plántulas que demuestran infección. Como testigo se pueden sembrar semillas de la misma variedad del hospedero pero procedentes de plantas sanas, simultáneamente con las semillas en prueba. Unos pocos centenares de semillas pueden ser adecuados para determinar el porcentaje de transmisión por semilla en el caso de un virus que tiene un índice alto de transmisibilidad, pero se pueden necesitar millares si la transmisibilidad es muy pobre.

V. Transmisión por Polen

Los virus transmitidos por el polen pueden infectar no sólo a las semillas y plántulas que se desarrollan a partir de el, sino lo que es más importante, puede propagarse a través de la flor fecundada y descender hasta la planta madre, a la que infectan.

Aunque la polinización de las flores con polen infectado con un virus puede redundar en una menor producción de frutos que los que se obtienen con el polen libre de virus, la transmisión de este patógeno de planta en planta a través del polen es, al parecer, bastante rara o se produce en sólo unos cuantos virus.

Tanto el PSTVd como el PVT son transmitidos por el polen o el óvulo de plantas infectadas, pero no se ha podido demostrar que se infecte la planta madre al usar polen infectado.

VI. Transmisión por Cúscuta

La cúscuta es una planta parásita, la cual por intermedio de sus haustorios puede absorber la savia, y a menudo, los virus del hospedero. La transmisión se realiza a través de la unión que

se forma entre los tallos enroscados de la cúscuta y el tallo de la planta.

Una gran cantidad de virus han sido transmitidos en esta forma con frecuencia entre plantas que pertenecen a familias bastante separadas desde el punto de vista taxonómico y en las que la transmisión por injerto es imposible debido a la incompatibilidad de los tejidos. Este tipo de transmisión es efectiva cuando la inoculación mecánica no da resultado.

Cúscuta campestris y *C. subinclusa* son las especies más usadas.

En este tipo de transmisión el procedimiento usual es hacer crecer la cúscuta parasitando las plantas con síntomas viróticos. Cuando se forman nuevos tallos, se colocan las plantas de prueba junto a la infectada para permitir que la cúscuta las parasite; así se forma un puente de tejido vivo a través del cual pueden pasar los virus. También se pueden tomar brotes cortados de una cúscuta que ha crecido en una planta enferma y enrollarlos alrededor del tallo y hojas de la planta sana.

En el proceso de transmisión el virus involucrado puede multiplicarse en los tejidos de la cúscuta. Esta propiedad se utiliza para separar virus.

Si la transmisión de un virus se realiza entre plantas infectadas y sanas crecidas bajo una fuente de luz, el porcentaje de transmisión es bajo (5 de 10 plantas). En cambio, si la transmisión se realiza colocando la planta infectada bajo una fuente de luz y la planta sana bajo sombra, el porcentaje de transmisión es mayor (10 de 10 plantas). Esto se debe a que hay una mayor translocación de nutrientes y virus, a través de la cúscuta, de la planta crecida bajo luz a la planta crecida bajo sombra.

VII. Transmisión por vectores

En la naturaleza muchos virus se transmiten a través de vectores. Un vector es un agente diseminador de la enfermedad que lleva las partículas virales de plantas enfermas a plantas sanas. Entre los vectores de virus de plantas tenemos a los insectos, los nematodos y los hongos.

1) Transmisión por insectos

Es la forma de transmisión de virus más importante en la naturaleza, siendo la mayoría de los transmisores insectos chupadores. Los áfidos transmiten más virus que cualquier otro grupo de insectos; las cigarritas o saltahojas ocupan el segundo lugar, y les siguen la mosca blanca, las querezas blandas, los trips, los chinches de las plantas y los escarabajos. Los ácaros, aunque no son insectos, se consideran así por ser conocidos vectores de algunos virus.

A continuación se dan algunos conceptos que se deben tener en cuenta:

- Período de adquisición (P.A.): es el tiempo que necesita el insecto para adquirir el virus de la planta enferma.

- Período de inoculación (P.I.): es el tiempo que necesita el insecto para transmitir el virus al posarse sobre una planta sana.

- Período de latencia o de incubación (P.L.): es el tiempo que necesita el insecto para ser capaz de transmitir el virus entre la adquisición y la inoculación.

- Período de retención (P.R.): es el tiempo que el insecto permanece viruífero.

Se conocen tres tipos de transmisión de virus:

a) Transmisión no persistente. Los virus son adquiridos y transmitidos en pocos minutos (menos de 5 minutos). Estos virus han sido denominados "virus transmitidos por estilete" y

son rápidamente eliminados del insecto (por ejemplo, el virus Y de la papa - PVY).

b) Transmisión semipersistente. Los virus son adquiridos en unos 15 minutos y transmitidos hasta por dos días (por ejemplo, el virus de la tristeza de los cítricos).

c) Transmisión persistente. Los virus son adquiridos y transmitidos en periodos más largos. Entre adquisición e inoculación es necesario un periodo de latencia o incubación. Los insectos pueden retener estos virus por el resto de su vida (por ejemplo, el virus del enrollamiento de la hoja de papa - PLRV).

Las diferencias entre la transmisión no persistente y la transmisión persistente son:

-Transmisión no persistente. Se realiza exclusivamente por áfidos. Los periodos de inoculación y de adquisición varían de 5 segundos a pocos minutos, y no existe periodo de latencia. El periodo de retención varía de unos pocos minutos a un par de horas, dependiendo de si el áfido se está alimentando o no. No existe especificidad entre el virus y su vector, es decir, un mismo virus puede ser transmitido por varias especies de áfidos. El ayuno aumenta la eficacia de la transmisión. Este tipo de virus es muy estable y alcanza altas concentraciones en los tejidos, pudiendo ser transmitido mecánicamente. Ejemplos: PVY, APMV.

-Transmisión persistente. Los vectores pueden ser áfidos, cigarritas, mosca blanca, trips y escarabajos. Los periodos de adquisición e inoculación varían de 10 a 60 minutos, y el periodo de latencia de 12 horas a varios días. El periodo de retención es de por vida. Este tipo de transmisión es más específico ya que algunos virus sólo son transmitidos por un vector determinado. El ayuno no tiene ningún efecto en la eficiencia de la transmisión. Generalmente, los virus de este grupo se encuentran restringidos al floema de sus plantas hospederas y alcanzan muy bajas concentraciones, por lo que no pueden ser transmitidos mecánicamente. Ejemplo: PLRV.

Los virus que se transmiten en forma no persistente y semi-persistente son conocidos como virus no circulativos, mientras que los que se transmiten de forma persistente se conocen como virus propagativos o circulativos, según se multipliquen o no en el vector, respectivamente.

2) Transmisión por nematodos

Los virus que se transmiten por nematodos tienen un rango amplio de hospederos y también se transmiten por semilla y polen.

Aproximadamente una docena de los virus que infectan plantas son transmitidos por una o más especies de tres géneros de nematodos ectoparásitos (que se alimentan de la parte externa de las raíces). Los géneros *Xiphinema* y *Longidorus* son los vectores de virus de partícula isométrica que pertenecen al grupo de los Nepovirus, por ejemplo, el "ringspot" del tabaco y del tomate, el virus de la hoja en abanico de la vid, entre otros. El género *Trichodorus* transmite dos virus con partículas tubulares que pertenecen al grupo Tobravirus, el "rattle" del tabaco y el "early browning" de la arveja.

Las especies de *Xiphinema* y *Longidorus* varían de 3 a 10 mm de longitud en su estado adulto y poseen un estilete recto y largo de aproximadamente 200 um que insertan en las raíces de las plantas para alimentarse del contenido celular. Las especies de *Trichodorus* son relativamente pequeñas y gruesas y miden aproximadamente 1 mm de longitud. El estilete es curvado y mide alrededor de 50 um. Se alimentan de las células epidermales de la punta de la raíz.

La transmisión de los virus se realiza cuando estos nematodos se alimentan de plantas enfermas y luego se desplazan hacia las raíces de

plantas sanas. En circunstancias favorables pueden adquirir virus en un período de tiempo que varía de 15 minutos a una hora; siendo necesario un tiempo similar para transmitirlos a una planta sana. Las partículas virales quedan adheridas en el canal de alimentación del nematodo cuando este se alimenta de savia. La liberación de las partículas ocurre cuando la saliva pasa en dirección contraria hacia las células vegetales de las cuales el nematodo se está alimentando.

Los lugares de retención de los virus varían de acuerdo al género y a veces de acuerdo a la especie de nematodo; así *Longidorus* retiene al virus en la parte anterior del estilete, mientras que *Xiphinema* y *Trichodorus* lo retienen tanto en el estilete como en las paredes del esófago. Estos distintos lugares de retención son proporcionales al tiempo en que el nematodo permanece infectivo; *Xiphinema* y *Trichodorus* conservan la capacidad infectiva por más tiempo (10 meses) que *Longidorus* (menor a tres meses).

Tanto las larvas y los adultos adquieren y transmiten virus, pero las larvas dejan de ser infectivas después de la primera muda. Los virus no se multiplican en los tejidos del nematodo y no se transmiten a la progenie a través de los huevos.

3) Transmisión por hongos

Se conocen cuatro géneros de hongos transmisores de virus, siendo todos ellos parásitos obligados unicelulares o de pocas células que forman esporangios de descanso de pared gruesa y que son capaces de sobrevivir al desecamiento por un largo período de tiempo en el suelo. La determinación de si la enfermedad se transmite a través de suelo desecado al medio ambiente nos da una clave valiosa sobre la naturaleza del vector involucrado, ya que los nematodos transmisores de virus no pueden sobrevivir en suelo desecado a temperatura ambiente.

Dos de estos géneros, *Olpidium* y *Synchytrium*, pertenecen al orden Chytridiales y los otros dos, *Polymyxa* y *Spongospora*, pertenecen al orden Plasmodiophorales. *Olpidium brassicae* transmite "tobacco necrosis virus", "lettuce big vein virus" y "tobacco stunt virus"; *O. cucurbitacearum* transmite el "cucumber necrosis virus"; *Polymyxa graminis* transmite los mosaicos del trigo y de otros cereales que son transmitidos a través del suelo; y *Spongospora subterranea* es considerado vector del "potato mop-top virus" (PMTV). Existen informes de que *Synchytrium endobioticum* es un vector de PVX, pero esto no ha sido confirmado en condiciones de campo.

Considerando que todos estos hongos son intracelulares (penetran al interior de las células de las raíces) y que producen zoosporas (esporas flageladas móviles), la transmisión de virus se realiza de la siguiente manera: el hongo produce esporangios de descanso en los tejidos de las raíces de las plantas cultivadas al final de la campaña. Estos esporangios se diferencian formando zoosporas que salen y nadan en el suelo humedecido por las fuertes lluvias o por el agua de riego. Las zoosporas llegan a la planta enferma, se enquistan perdiendo su flagelo y emiten un tubo germinativo al interior de las células de las raíces. Dentro del tejido de la planta infectada, el hongo crece en el citoplasma de las células de la raíz del hospedero y si hay partículas virales, estas serán incorporadas al interior del citoplasma del hongo. Luego se repite el proceso de formación de esporangios de descanso y zoosporas, que si encuentran una planta sana, transmitirán el virus que llevaban cuando incorporen su citoplasma al interior de las células de la raíz mediante el tubo germinativo. Esta forma de transmisión ocurre con *Polymyxa*, *Spongospora* y *Olpidium* al diseminar el "lettuce big vein virus" y el "tobacco stunt virus".

Otra forma de transmisión se da cuando las zoosporas adquieren partículas virales que se encuentran libres en el suelo, llegando a

recubrir la superficie de la misma incluyendo su flagelo. Al momento del enquistamiento, el flagelo que lleva las partículas virales es reabsorbido al citoplasma de la zoospora y luego transmitido a tejidos de plantas sanas, como en el caso anterior. Este caso de transmisión ocurre con *Olpidium* cuando disemina el "tobacco necrosis virus" y el "cucumber necrosis virus".

Bajo condiciones de campo es fácil reconocer cuando una enfermedad viral es transmitida por un agente del suelo (nematodos y hongos) o por un agente aéreo (insectos), pues, para el primer caso, la enfermedad ocurre generalmente como manchas o parches de plantas infectadas, siendo lenta su diseminación debido a la distribución horizontal del agente y a su movilidad relativa en el suelo.

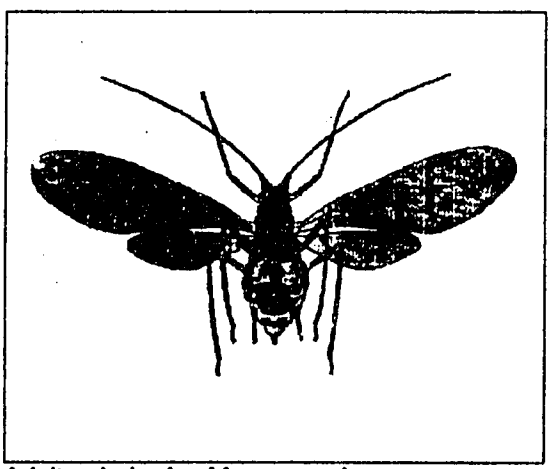
Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

2.0 TRANSMISION

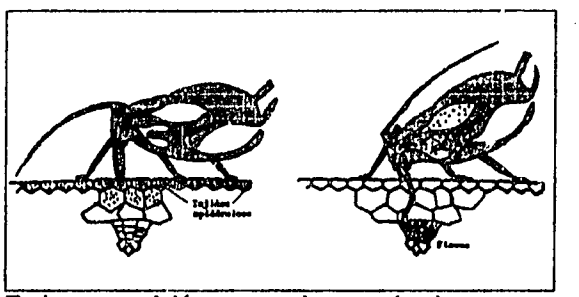
Fascículo 2.2 Transmisión de Virus de Papa por Afidos

Se conocen más de veinte virus que infectan a la papa, entre los cuales hay muchos que causan severas reducciones en el rendimiento. Existen varios mecanismos de diseminación de virus, pero los virus más dañinos de la papa son transmitidos por insectos vectores, especialmente áfidos. El control de la diseminación de virus es la manera más efectiva de reducir las enfermedades virosas en la producción de semilla porque no es factible eliminar virus de plantas infectadas. Los virus pueden ser diseminados de muchas maneras: por tubérculos-semilla infectados, mediante el contacto con plantas infectadas o herramientas contaminadas, o por vectores como insectos, nematodos y hongos. Entre los insectos, los vectores más importantes son las siguientes especies de áfidos:



Adulto alado de *Myzus persicae*.

Myzus persicae (áfido verde del melocotonero), *Macrosiphum euphorbiae* (pulgón de la papa) y *Aulacorthum solani* (áfido de los invernaderos).



En la transmisión no persistente de virus (izquierda), los áfidos adquieren los virus durante los breves períodos en que prueban los tejidos epidérmicos de las plantas infectadas. Para que haya transmisión persistente (derecha), un áfido tiene que alimentarse del floema.

Estos áfidos causan más daño al transmitir virus que al alimentarse de las plantas. El áfido vector más importante es *Myzus persicae*.

Los áfidos transmiten los virus de la papa de dos maneras:

- transmisión no persistente,
- transmisión persistente.

Transmisión no persistente. Los áfidos pueden adquirir los virus durante los breves períodos en que prueban los tejidos

epidérmicos de las plantas infectadas o se alimentan de ellos. Sólo toma unos segundos para que las partes bucales queden contaminadas y, luego, el áfido puede transmitir los virus inmediatamente a otras plantas. Los áfidos permanecen infecciosos (viruliferos) durante un período corto, generalmente menor de dos horas, y los virus sólo pueden ser llevados a cortas distancias. Con excepción del virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV), todos los virus de papa provenientes de áfidos son transmitidos de manera no persistente. Estos comprenden los virus Y, A, M (PVY, PVA, PVM) y algunas variantes del PVS. De este grupo, el PVY es el virus más importante.

Transmisión persistente. Los virus que son transmitidos de manera persistente, se localizan en el floema de las plantas. Para adquirir éstos, un áfido tiene que alimentarse del floema y no basta solamente explorar la superficie de la hoja. Esto puede tomar 20 a 30 minutos. El virus entra en el cuerpo del áfido y, durante un período adicional de latencia o incubación que dura varias horas, los áfidos permanecen normalmente no viruliferos. El virus persiste luego durante el resto de la vida del áfido y puede ser llevado a distancias largas. El más conocido de los virus de la papa, entre los transmitidos en forma persistente, es el virus de enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV), el cual es también el más importante de los virus de la papa.

Biología de los áfidos

Los áfidos sobreviven en estado de huevo durante el invierno o las estaciones desfavorables. En la primavera, los huevos revientan y las ninfas se desarrollan como adultos de primera generación. Durante las siguientes generaciones, las hembras producen sin fertilización (por partenogénesis) progenies vivas (vivíparas). Hacia el otoño o en temporadas que no favorecen la reproducción de áfidos, pueden aparecer de nuevo machos y hembras que producen huevos sexualmente (ovíparas). En la zona tórrida (la zona que posee un clima moderado a través del año), los áfidos logran reproducirse por partenogénesis durante todo el año.

Los áfidos pueden alcanzar rápidamente proporciones de plaga. Un áfido puede dar origen a 30 ninfas y, durante una temporada favorable, pueden sucederse ocho generaciones. De este modo, un áfido puede teóricamente producir 30^8 - lo cual supera los 6 x 10^{11} - áfidos. Felizmente, la naturaleza restringe las poblaciones de áfidos por medio de condiciones climáticas desfavorables, parásitos, predatores y deficiencias nutritivas en la planta hospedera.

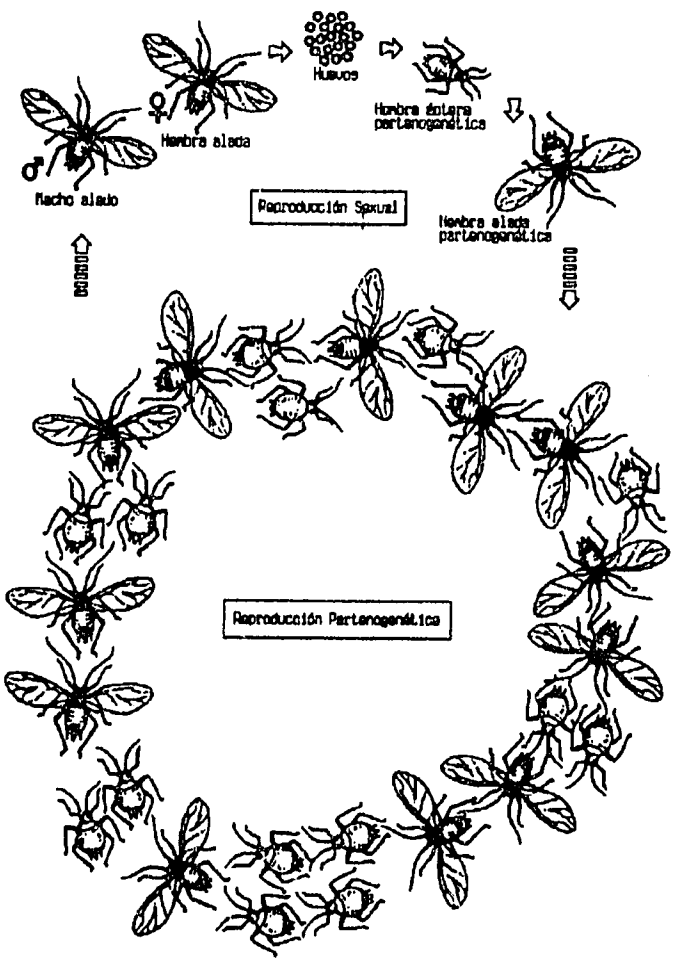
Muchas especies de áfidos viven en una sola planta hospedera. Se dice de ellos que son autoicos. Otros migran entre hospederos primarios o para invernar, que generalmente son plantas leñosas, y hospederos secundarios que generalmente son plantas herbáceas. Estos áfidos son heteroicos. *Myzus persicae*, por ejemplo, puede invernar en el melocotonero (*Prunus persica*); de ahí el nombre de áfido verde del melocotonero. Durante los ciclos reproductivos subsecuentes, invade muchos hospederos secundarios, entre ellos, la papa.

Después de invernar, surgen áfidos alados que pueden migrar de hospederos primarios a secundarios. Durante las siguientes generaciones, pueden producirse simultáneamente tanto formas aladas como ápteras.

Normalmente, los áfidos no vuelan cuando la temperatura es inferior a 13°C. Las temperaturas altas y las precipitaciones escasas son ideales para la multiplicación de los áfidos. La actividad de éstos crece a medida que la temperatura sube hacia los 30°C. Una velocidad del viento por debajo de 1 km/h favorece el movimiento de los áfidos. Las cor-

rientes de aire caliente pueden levantar los áfidos a varios cientos de metros en el aire, y se han encontrado ejemplares a distancias de más de 1000 km del origen más cercano.

Como los áfidos son insectos chupadores que se alimentan de savia, al llegar a una planta, exploran para determinar si la planta les conviene como alimento. En caso positivo, puede tardar varios minutos o a veces hasta horas en introducir sus partes bucales, los estiletes, dentro del tejido de la planta hasta el floema. La infestación de una planta depende de su estado fisiológico. La sequía aumenta la concentración, en la savia, de solutos que son provechosos para la alimentación de los áfidos. Las deficiencias de nitrógeno y potasio influyen en el metabolismo de la planta y en las con-



El áfido *Myzus persicae* puede invernar en el melocotonero. Durante los ciclos reproductivos subsecuentes, invade muchos hospederos secundarios, incluyendo a la papa. En la zona tórrida, los áfidos pueden reproducirse por partenogénesis durante todo el año.

diciones osmóticas de las células vegetales, lo cual predispone las plantas a una infestación mayor. La composición de las hojas cambia durante el desarrollo de la planta. *M. persicae* prefiere las hojas inferiores, cuya madurez es mayor. Otros áfidos, como *Macrosiphum euphorbiae*, prefieren las hojas jóvenes y por eso se ubican en las partes superiores de la planta. Las plantas que tienen una apariencia amarilla por enfermedades o deficiencias, pueden ser más atractivas para los áfidos alados que las plantas de aspecto saludable.

Identificación de áfidos

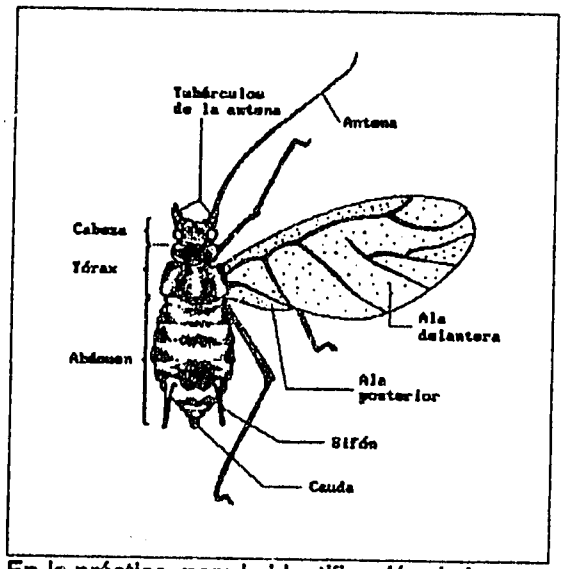
Las especies de áfidos difieren en su capacidad para transmitir virus. En zonas templadas, la única correlación significativa entre la diseminación de virus de papa y áfidos aparece con *Myzus persicae*. La identificación, el estudio de poblaciones y el control de los áfidos deben, por eso, concentrarse en esta especie. Sin embargo, debido a la falta de datos de los países de la zona tórrida, también se deben observar otras especies predominantes, especialmente en zonas nuevas para la producción de papa.

Los áfidos son insectos de cuerpo blando, que miden unos pocos milímetros de longitud. Tienen hasta 50 características identificables. Sólo algunas de éstas son importantes en la práctica, especialmente las correspondientes al cuerpo, la cabeza, las alas, los sifones y la cauda. Pueden ser observadas en aumentos de 6 a 10x con un buen lente de mano o un microscopio estereoscópico.

Cuerpo. El cuerpo de un áfido consta de tres partes: cabeza, tórax y abdomen. Estas partes poseen tamaño, forma y color distintivos en las diferentes especies de áfidos.

Cabeza. La forma de la cabeza es determinada por los tubérculos de las antenas, que pueden ser pronunciados o estar ausentes. Estos llevan las antenas, que en la mayoría de las especies de áfidos son largas y delgadas, con cinco a seis segmentos. La proporción entre la longitud de la antena y la del cuerpo es utilizada frecuentemente para la identificación.

Alas. Las alas nacen en el tórax y consisten de un par de alas delanteras grandes y un par de alas posteriores más pequeñas. Las formas



En la práctica, para la identificación de los áfidos, sólo son importantes algunas características, especialmente las que corresponden al cuerpo, la cabeza, las alas, los sifones y la cauda.

de las alas (sobre todo, de las delanteras) y el diseño de las nervaduras contribuyen a la identificación de los áfidos.

Sifones. Los sifones son estructuras tubulares que se proyectan hacia arriba, en pares, desde el quinto o el sexto segmento del abdomen. Su forma, longitud y color varían mucho entre las especies.

Cauda. El último segmento abdominal está modificado para formar una cauda cuya forma, longitud, color y cantidad de pelos sirven para distinguir las especies.

Myzus persicae

Myzus persicae es el áfido de la papa más ampliamente distribuido y el vector más importante de los virus de la papa. Normalmente, se alimenta de las partes inferiores de la planta de papa.

Cuerpo. Los adultos miden de 1,5 a 2,5 mm de longitud. Las formas ápteras son generalmente de un color verde claro a casi transparente, pero también pueden ser de un rosado oscuro o del color del melocotón. El contorno del cuerpo es ovoide; la parte posterior es redondeada.

Las formas aladas se distinguen por cabeza y tórax de color entre pardo y negro. El abdomen puede ser verde, rosado o de un rojo opaco y está marcado con una mancha negra característica. El contorno del cuerpo es similar al de las formas ápteras, pero modificado por la presencia de las bases de las alas.

Cabeza. La cabeza es marcadamente indentada. Tanto en los áfidos alados como en los ápteros, los tubérculos de las antenas son prominentes y apuntan hacia adentro. Las antenas son casi tan largas como el cuerpo.

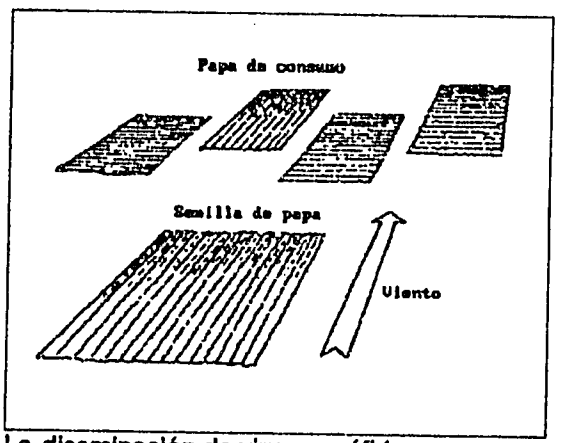
Alas. Normalmente no se utilizan características de las alas para identificar los áfidos M. persicae.

Sifones. Los sifones son de color claro y ligeramente hinchados hacia los extremos.

Cauda. La cauda es de color claro y mide aproximadamente la mitad de la longitud de los sifones.

Control de la diseminación de virus

No es factible el control directo de la diseminación de los virus. El control indirecto, sin embargo, contribuye a reducir la transmisión de virus. Esto comprende la



La diseminación de virus por áfidos virulíferos, se puede disminuir situando los campos de producción de semilla de tal manera que el viento no llegue a ellos desde los campos de papa de consumo. Lo ideal sería que las áreas de producción de semilla estuvieran completamente separadas de las de la producción de papa de consumo.

consideración del área de cultivo, las prácticas agronómicas y el control

Area de Cultivo. Debido a que existe una relación entre la diseminación de los virus y las poblaciones de áfidos, hay que seleccionar las áreas de producción de semilla basándose en los datos del estudio de poblaciones de áfidos. Las poblaciones de áfidos son generalmente bajas en las áreas de temperatura baja, abundante precipitación y alta velocidad de viento.

Dentro de un área de cultivo de papa, y para disminuir la diseminación de los virus por áfidos virulíferos, los campos de producción de semilla deben estar situados de tal manera que el viento no llegue a ellos desde los campos de papa de consumo o de cultivos de hospederos alternos. Lo ideal sería separar completamente las áreas de producción de semilla de las de producción de papa para el consumo.

Epoca de siembra. La época de migración de los áfidos puede ser un dato más importante que el número total de áfidos capturados. Los vuelos de los áfidos alcanzan frecuentemente puntos culminantes, definidos, en ciertas épocas del año. La diseminación de virus que ocurre temprano en la temporada, es un problema más serio que la diseminación más tardía, pues las plantas jóvenes generalmente son más susceptibles Además, las plantas que son infectadas temprano, se vuelven fuentes más eficaces para aumentar la diseminación de virus que las plantas infectadas posteriormente en la temporada.

Fuentes de infección. Elimine los hospederos primarios. Evite las áreas cercanas a las de producción de papa de consumo, a invernaderos o a huertas caseras. Dentro de un campo de producción de semilla, elimine tan pronto como sea posible las plantas de papa infectadas. Elimine las malezas de flores amarillas y cualquier otra planta hospedera dentro del campo y alrededor de él.

Manejo del cultivo. La resistencia de las plantas a la infestación de áfidos puede ser aumentada mediante una fertilización balanceada y un buen manejo del agua de riego.

Epoca de cosecha. Después de que un áfido viruífero ha estado alimentándose en el follaje, un virus necesita algún tiempo para llegar a los tubérculos. Los tubérculos-semilla de grado superior deben ser cosechados a más tardar 8 a 10 días después de que el estudio de poblaciones acuse una acumulación crítica de áfidos. Ese plazo es suficiente para evitar que la infección de virus llegue a los tubérculos.

Almacenamiento de tubérculos. Los brotes de los tubérculos son fácilmente colonizados por los áfidos. Impida la transmisión de virus mediante un almacenamiento que excluya a los áfidos y con aplicaciones de aficidas.

Control químico. El grado de eficiencia de los aficidas para controlar la transmisión de virus depende del tipo de transmisión de virus.

En la transmisión no persistente de virus, los áfidos transmiten los virus (por ejemplo PVY) rápidamente sin dar tiempo a que los aficidas comunes puedan matar al vector. Dentro de un campo, los aficidas pueden reducir ligeramente la transmisión no persistente de virus, pero no la pueden impedir. Tampoco pueden controlar las infecciones que llegan desde fuera del campo causadas por áfidos que migran.

En la trasmisión persistente, los virus (por ejemplo, el PLRV) tienen un periodo de incubación suficientemente largo para permitir que los aficidas controlen a los vectores. Los aficidas pueden reducir considerablemente la diseminación del PLRV dentro de un campo, pero no pueden controlar las infecciones originadas desde fuera, causadas por áfidos que migran.

Los aficidas más convenientes son los organofosfatos de acción sistémica, para aspersión, o los insecticidas granulados de carbamato aplicados al suelo.

Las aspersiones de aceite mineral son efectivas para reducir los virus transmitidos de manera no persistente, pero no impiden la diseminación del PLRV. En todo caso, consulte a los expertos locales.

Adaptado de "Boletín de Información Técnica 2 - Transmisión de Virus de Papa por Afidos", CIP, Lima-Perú, 1985.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

3.O DETECCION

3.1 SINTOMATOLOGIA

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3.1 DETECCION / Sintomatología

Fascículo 3.1.1 Sintomatología de las Enfermedades Virales en Plantas

El término "síntoma se define como la variación macroscópica y/o microscópica (forma , color, tamaño, etc.) manifiesta en la planta como consecuencia de acciones patogénicas, deficiencia de nutrientes, condiciones ambientales adversas, etc.

El estudio de la sintomatología causada por enfermedades virales requiere de observaciones cuidadosas y periódicas de las plantas infectadas (plantas indicadoras), a fin de determinar con precisión el tipo, la intensidad y la prevalencia de cualquier anormalidad. Los síntomas más evidentes son aquellos que se manifiestan en las hojas, aunque algunos virus pueden causar también síntomas en tallos, frutos, raíces u otras partes de la planta.

El síntoma más común de las enfermedades causadas por virus es la reducción de la tasa de desarrollo, manifestada a través de grados de achaparramiento o enanismo en la planta. Por otro lado, casi todas las enfermedades virosas causan reducciones en los rendimientos totales. Estos efectos pueden ser severos y fácilmente perceptibles o pueden ser insignificantes.

En casi todas las enfermedades virosas que ocurren en el campo, el virus está presente en toda la planta (infección sistémica) y los síntomas producidos son llamados "sistémicos". En plantas inoculadas artificialmente, ciertos virus causan pequeñas lesiones generalmente necróticas, en el punto de entrada (infección local) y los síntomas son llamados "lesiones locales".

Muchos virus pueden infectar ciertos hospederos sin causar el desarrollo de síntomas evidentes; tales virus son llamados comúnmente "virus latentes" y los hospederos, "asintomáticos". En ambos casos, las plantas que comúnmente desarrollan síntomas al ser infectadas con un determinado virus, pueden permanecer temporalmente asintomáticas bajo ciertas condiciones medio ambientales, por ejemplo, alta o baja temperatura. A esto se le denomina "enmascaramiento".

Finalmente, las plantas infectadas con virus pueden mostrar síntomas muy severos inmediatamente después de la inoculación, pudiendo incluso producirse la muerte de éstas. Si la planta sobrevive a la fase de shock inicial, los síntomas se tornan suaves ("síntoma crónico") con el subsiguiente desarrollo parcial o total de la planta. A esto se le denomina "recuperación". Por otro lado, los síntomas pueden progresivamente incrementarse en severidad y pueden resultar en una reducción gradual o en un declive rápido de la planta.

Los síntomas producidos en plantas por infección viral se pueden dividir en:

a) Síntomas locales.

Generalmente se producen en las hojas inoculadas de la planta. Son lesiones isométricas discretas, es decir, que se pueden contar y, en algunos casos, sirven para realizar ensayos cuantitativos. Normalmente no tienen importancia económica, pero son muy útiles para la diagnosis.

Dentro de los síntomas locales tenemos:

- Manchas cloróticas
- Puntos cloróticos
- Anillos cloróticos
- Manchas necróticas
- Puntos necróticos
- Anillos necróticos

b) Síntomas sistémicos.

Se producen en las hojas de las plantas que no han sido inoculadas. Son los más importantes porque pueden afectar cualquier parte de la planta (flor, fruto, peciolo, etc.).

Dentro de los síntomas sistémicos tenemos:

- **Mosaico**. Es la alternancia de áreas verdes normales con áreas cloróticas. Esta alternancia es irregular y no sigue un patrón. Algunas veces comienza con una aclaración de nervaduras.

Dentro de los síntomas del tipo mosaico pueden considerarse a los moteados, bandeamiento de nervaduras, estrías cloróticas, etc.

- **Amarillamiento**. Consiste en una clorosis generalizada o parcial.

Dentro de los síntomas del tipo amarillamiento pueden considerarse: clorosis, cálico, aucuba, amarillamiento de nervaduras, clorosis intervenal, etc.

- **Necrosis**. Se produce en infecciones sistémicas como necrosis apicales, necrosis de nervadura y/o tallo, anillos necróticos sistémicos, etc.

c) Anormalidades de crecimiento.

Pueden presentarse en cualquiera de las partes de la planta y podemos citar al encarrujamiento de hojas, la epinastia, las ampolladuras, la proliferación de brotes, la rugosidad, el encrespamiento, las hojas coriáceas, el enanismo, etc.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.1 DETECCION / Sintomatología

Fascículo 3.1.2 Enfermedades Producidas por Organismos parecidos a Micoplasmas en Plantas de Papa

Ahora se sabe que muchas enfermedades de plantas que se creía eran producidas por virus están asociadas con otra clase de organismos patógenos parecidos a bacterias y a rickettsias. Sin embargo, el mayor grupo de patógenos de plantas que normalmente se confunde con virus es el de los organismos parecidos a micoplasmas (MLO, por sus siglas en inglés "Mycoplasma like organisms"). Los micoplasmas son transmitidos por saltahojas o psílidos y están asociados con enfermedades como la "escoba de bruja" y el amarillamiento.

Características de los organismos parecidos a micoplasmas

- Son microorganismos pleomórficos de 0,1 a 1,0 um de diámetro y pasan a través de filtros con poros de 450 nm de diámetro.
- Sus células están limitadas solamente por una membrana unitaria gruesa (10 nm) de tres capas.
- Sus células contienen ribosomas de tipo bacteriano.
- Contienen DNA y RNA.
- Se multiplican probablemente por fisión binaria.
- Algunos pueden ser cultivados en medios artificiales. En cultivos de agar producen colonias diminutas típicas con forma de huevo frito.
- Son resistentes a la penicilina y sensibles a la tetraciclina. A diferencia de las formas L de las bacterias, no revierten a la forma bacteriana cuando crecen en un medio sin penicilina.
- También se infectan con virus.

Se ha reportado más de 40 enfermedades de plantas producidas por micoplasmas. La mayoría de la evidencia se obtuvo mediante microscopía electrónica. Es difícil describir la morfología de los micoplasmas, ya que son pleomórficos y su forma varía de acuerdo al método utilizado en la preparación de los especímenes para su estudio por microscopía electrónica. Sin embargo, existen organismos que son diferentes a los MLOs que se pueden encontrar en plantas de maíz con enanismo. Estos organismos generalmente tienen forma helicoidal, miden cerca de 250 nm de ancho por 12 um de largo y se les denomina "espiroplasmas".

Algunos MLOs han sido cultivados en medios artificiales para ser inoculados en plantas sanas y producir la enfermedad. Muchas enfermedades de importancia económica como "potato purple top", "sandle spike", "mulberry dwarf", "pear decline", etc., son producidas por MLOs. Los MLOs infectan sistémicamente a la planta y generalmente tienen un rango amplio de hospederos. Ciertos síntomas provocados por MLOs en plantas son muy característicos y

rara vez son producidos por otros agentes patógenos. Estos incluyen la "escoba de bruja", el cambio del color de las flores a verde (virescencia) y la transformación de los pétalos de las flores en estructuras foliares (filodia).

Los estudios de microscopía electrónica muestran que la mayoría de los MLOs están restringidos al floema del tejido vegetal. El tamaño de los MLOs es mayor que el de los poros de las células cribosas, pero debido a su naturaleza pleomórfica pueden modificar temporalmente su forma y pasar a través de estos poros a la célula adyacente.

Se ha reportado que los saltahojas y los psílidos son vectores de los micoplasmas. Muchos MLOs también infectan a su vector y en algunos casos afectan el ciclo de vida del mismo. Generalmente, los vectores infectados con MLOs permanecen infectivos durante toda su vida. Algunos MLOs también se transmiten por pasaje transovariano.

Los MLOs son susceptibles a los antibióticos, especialmente a los del grupo de la tetraciclina, pero son resistentes a la penicilina. Cuando una planta infectada y con síntomas se inocula periódicamente con una solución de tetraciclina, los síntomas de la enfermedad generalmente desaparecen. Si los síntomas no son evidentes, su aparición se retarda. Es importante notar que la aplicación de tetraciclina no cura la enfermedad en la planta; los síntomas aparecen rápidamente después de finalizado el tratamiento con tetraciclina.

Los MLOs son susceptibles a las temperaturas altas. Estos se pueden eliminar de plantas infectadas, partes de plantas y órganos propagativos en dormancia mediante tratamientos de calor (30 - 37°C) que pueden durar semanas o meses, dependiendo del tipo de MLO.

Formas L de bacterias

Las bacterias que se cultivan en un medio que contiene penicilina son incapaces de producir paredes celulares. Estas bacterias sin pared celular son denominadas "Formas L". Las formas L tienen una morfología muy similar a la de los MLOs. Sin embargo, sólo se producen bajo condiciones de laboratorio y son muy inestables; retoman su forma original inmediatamente después que la penicilina se elimina del medio de cultivo.

Enfermedades producidas por micoplasmas en plantas de papa

En 1915, Maurice reportó por primera vez la existencia de los MLOs. La distribución de las enfermedades producidas por mycoplasmas en plantas de papa es mundial, pero en ciertos países como Guatemala, Panamá, México y Túnez son tan importantes como otras enfermedades que afectan al cultivo. Se han utilizado diferentes nombres para describir las enfermedades provocadas por MLOs en plantas de papa. Los síntomas producidos por los MLOs varían extremadamente. Organismos diferentes pueden provocar síntomas casi idénticos, y el mismo MLO puede provocar síntomas diversos en cultivares de papa diferentes y especies diferentes de plantas. Es por ello que la sintomatología se considera generalmente como una característica poco confiable, aunque existen descripciones voluminosas y detalladas realizadas con anterioridad por varios investigadores.

A pesar de las limitaciones de la sintomatología como herramienta en el diagnóstico de enfermedades, existen ciertos síntomas que regularmente se asocian con infecciones causadas por MLOs. Considerando estos síntomas, las enfermedades causadas por MLOs en plantas de papa se pueden clasificar en dos grupos distintos: "aster yellows" y "escoba de bruja".

1. Grupo "Aster yellows"

El "Aster yellows" ha sido denominado de muchas formas diferentes, entre ellas, "purple top", "purple top wilt", "haywire", "latebreaking

virus", "stolbur", "parastolbur", "metastolbur", "tomato bigbud" y "purple top roll". El "Aster yellows" tiene distribución mundial. En muchos países esta enfermedad no se considera económicamente importante.

Los síntomas de esta enfermedad varían considerablemente sugiriendo que existe una gran variabilidad entre tipos de MLOs. La severidad de los síntomas y la extensión de la infección al tubérculo también varía enormemente probablemente debido a la ocurrencia de cepas diferentes de MLOs. Debido a la carencia de métodos adecuados de diagnóstico, estas diferencias entre MLOs no han podido ser estudiadas. Los síntomas de "Aster yellows" han sido confundidos con los producidos en infecciones por *Rhizoctonia* o *Fusarium*. También se confunden con los síntomas primarios de la infección por PLRV.

Generalmente, los síntomas no aparecen hasta la floración. La base de los foliolos jóvenes de las plantas se tornan de un color morado a rojizo o amarillento. El pecíolo se vuelve erecto, los entrenudos se acortan y toda la planta muestra un hábito de crecimiento erecto. La clorosis puede ser generalizada y las hojas pueden volverse hacia arriba. Es común la aparición de tubérculos aéreos en las axilas de la planta. La decoloración de los tejidos vasculares es común y en algunos casos es muy severa. El cuello de la raíz se pudre, causando el marchitamiento de la planta. los estolones presentan "browning" que se puede extender hacia los tubérculos cercanos. Ciertas cepas de "Aster yellows" evitan que los tubérculos infectados broten o bien producen en ellos brotes ahilados de los que se originan plantas débiles que no sobreviven.

Otro tipo de "Aster yellows", como en el caso de la enfermedad "haywire", es transmitido mediante tubérculo semilla. Las plantas que crecen de tales tubérculo muestran síntomas severos de "purple top wilt", enanismo, encrespamiento de hojas y coloración rojiza o morada de los foliolos inmediatamente después que las plantas emergen. El MLO del "Aster yellows" tiene un rango de hospederos muy amplio que incluye plantas de muchas familias diferentes. Sus vectores son *Macrosteles divisus* y *M. fascifrons*.

La enfermedad "stolbur " o "parastolbur" reportada en Europa se parece al "Aster yellows", excepto que los síntomas son severos y se produce el marchitamiento y la muerte de las plantas poco después de la aparición de los síntomas. El "stolbur" no se propaga por tubérculos ya que los que se encuentran infectados se vuelven flácidos y se pudren antes de germinación. Los vectores del "stolbur" son *Hyalesthes obsoletus*, *Euscelis plebejus*, *Aphrodes bicinctus* y *Macrosteles laevis*.

Epidemiología

Los vectores de "Aster yellows" no muestran preferencia por plantas de papa como hospederas, y, bajo condiciones normales, viven y se propagan en malezas, pastos y gramíneas pequeñas. Debido al amplio rango de hospederos de los MLOs, muchas de estas plantas también se infectan con ellos. La infección de Mycoplasma en un campo de papa se establece mediante la migración de los saltahojas desde estas malezas. Generalmente, los insectos inoculan plantas o grupos de plantas esparcidos en el campo. No existen evidencias para indicar que estas plantas infectadas sirvan como fuente de inóculo para la propagación de la enfermedad. También se ha reportado que tanto los adultos como las ninfas son incapaces de adquirir los MLOs a partir de plantas de papa. Es decir, que la transmisión ocurre solamente cuando el saltahojas migratorio ha adquirido el MLO, días o semanas antes, de malezas u otras plantas. Por lo tanto, las crisis en las epidemias de MLOs en cultivos de papa dependen de la actividad del saltahojas migratorio y de la presencia del inóculo en otras plantas cercanas que no sean papa.

2. Grupo de la escoba de bruja

La escoba de bruja también es denominada "stolbur del norte" o "dwarf shrub virosis" y ha

sido reportada en América del Norte, Europa y Asia. Los síntomas consisten en redondeo de las hojas que posteriormente se vuelven cloróticas y en el desarrollo de muchas yemas axilares en la parte basal de la planta. La planta adopta una posición erecta y el enanismo es muy común. Algunas hojas pueden volverse moradas o rojizas. Si se producen flores, éstas serán de color verde (virescencia) o adoptarán la forma de estructuras foliares (filodia).

A diferencia del "Aster yellows", la enfermedad es transmitida a través del tubérculo. En el primer año de infección, los tubérculos infectados parecen normales, pero cuando se siembran producen plantas con síntomas. Los tubérculos del segundo año de infección son pequeños y producen brotes ahilados. Estos tubérculos carecen generalmente del período de dormancia.

Los vectores de la enfermedad son los saltahojas *Ophiola* (*Scleroracus*) *flavopictus*, *S. dasidus* y *S. balli*. En muchas partes del mundo el vector de esta enfermedad es aún desconocido. Los vectores son incapaces de adquirir los MLOs a partir de plantas de papa para propagar la enfermedad.

Identificación de la enfermedad

Para la aplicación de medidas de control adecuadas en enfermedades causadas por MLOs en plantas de papa, es importante establecer cuáles MLOs están asociados con los síntomas de la enfermedad. Aunque la sintomatología es de muy poca ayuda en el diagnóstico, los síntomas característicos de las enfermedades causadas por MLOs descritos anteriormente pueden ser utilizados como paso preliminar.

Se puede realizar la transmisión del agente causal a partir de plantas sospechosas mediante injertos a otro hospedero. El uso de vectores para transmitir MLOs desde plantas de papa no es posible ya que los vectores son incapaces de adquirir los MLOs a partir de ellas.

Se ha reportado que las especies *Datura stramonium*, *D. metel*, *Lycopersicon esculentum*, *Cyphomandra betacea*, *Nicotiana tabacum*, *Medicago sativa*, *Melilotus alba* y *Trifolium repens* son hospederas alternativas para los MLOs y pueden ser utilizadas como plantas indicadoras. Se debe tener mucho cuidado cuando se intenta transmitir MLOs a partir de plantas de papa que crecen en el campo mediante injertos, ya que estas plantas suelen también estar infectadas con otros patógenos, especialmente virus. Los virus pueden infectar a muchos de estos hospederos y pueden producir síntomas que pueden llevar a un diagnóstico erróneo.

Se ha establecido el uso de técnicas serológicas para identificar la presencia de virus después de realizado el injerto. Si algún virus estuviera presente y efectivamente infecta al hospedero alternativo, entonces es necesario injertar una parte de la planta infectada con MLOs en otro cultivar de papa que sea inmune al virus. También se puede utilizar otras plantas hospederas inmunes al virus pero susceptibles a los MLOs. El objetivo de transmisión por injerto es obtener un aislamiento puro del MLO en invernadero para estudios futuros.

El siguiente paso es probar su sensibilidad a los antibióticos. En este experimento es importante tener muchas plantas infectadas con el MLO y tener controles suficientes para obtener resultados confiables. Se debe inocular un grupo de plantas semanalmente con una solución de tetraciclina, otro grupo con una solución de penicilina y otro con agua destilada como control. Se debe tener en cuenta que las concentraciones altas de antibióticos son tóxicas para las plantas. Por lo tanto, deben utilizarse tres niveles de concentraciones de antibióticos (100, 500 y 1000 ppm) en el experimento. También deben utilizarse plantas sanas inoculadas con las tres concentraciones de antibióticos para detectar el nivel de toxicidad de las mismas. Si en el experimento las concentraciones de antibióticos utilizadas no son tóxicas, entonces se puede utilizar con-

centraciones más altas. Si los MLOs están asociados con la enfermedad, entonces las plantas que recibieron el tratamiento de tetraciclina mostrarán una reducción en la severidad de los síntomas, o los síntomas desaparecerán completamente en el tejido joven que empiece a desarrollarse. Las plantas que recibieron el tratamiento de penicilina no mostrarán ningún cambio en la severidad de los síntomas. Si la aplicación semanal de tetraciclina se detiene, las plantas comenzarán lentamente a mostrar los síntomas de la enfermedad. La sensibilidad del agente causal a la tetraciclina es una buena indicación que un Mycoplasma está asociado con la enfermedad.

Se debe obtener secciones de peciolos y tallo de las plantas enfermas y teñirlas con "Diene's* stain" para su observación bajo el microscopio de luz. La presencia de estructuras granulares azul oscuro en el floema es otra evidencia de la asociación de MLOs. La prueba final para detectar MLOs se logra mediante estudios de microscopía electrónica. Los especímenes se obtienen a partir de las venas principales, peciolos o tallos de una planta infectada. Las muestras se cortan en piezas pequeñas de cerca de 2 a 3 mm de largo y se embeben en una solución fijadora Karnowsky** o en una solución de glutaraldeído al 2% en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,0. La muestra preparada puede enviarse a un

*** Diene's stain:**
25 g de azul de metileno
1,25 g de Azur II
100 g de maltosa
0,25 g de carbonato de sodio

**** Solución fijadora Karnowsky:**
Sol. de Paraformaldeído al 8% (12 ml)
Sol. amortiguadora cacodilato 0,1M (33 ml)
Sol. de Glutaraldeído al 70% (2 ml)
completar a 100 ml con agua destilada

Micrografía electrónica de un corte ultrafino del floema de "olluco" mostrando MLOs.

laboratorio donde existan facilidades para trabajos en microscopía electrónica (por ejemplo: Sección de Virología,Centro Internacional de la Papa - CIP -, Apartado 5969, Lima, Perú).

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

3.O DETECCION

3.2 PLANTAS INDICADORAS

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.2 DETECCION / Plantas Indicadoras

Fascículo 3.2.1 Producción y Mantenimiento de Plantas Indicadoras

Los virus causan enfermedades de papa muy serias que no pueden ser controladas por médios químicos. La erradicación de virus de papa requiere de procedimientos complicados que dependen de métodos de detección confiables. Uno de estos métodos se basa en el uso de plantas indicadoras.

Los virus de papa pueden también producir enfermedades en otras plantas que no sean papa (plantas cultivadas, plantas ornamentales y especies silvestres) e inclusive en plantas de otras familias. Los síntomas pueden ser completamente diferentes de aquellos producidos en papa. La capacidad de estos virus para infectar otras plantas y producir síntomas claros se utiliza en su detección. Este documento describe cómo producir plantas indicadoras bajo condiciones óptimas, libres de insectos, enfermedades y deficiencias de nutrientes.

1. Producción de plantas indicadoras

a) Preparación de suelo para almácigos.

Prepare una mezcla de arena (preferiblemente cuarzo) y musgo (1:1 v/v) de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Pasar el musgo y la arena separadamente a través de una malla de alambre de 100 mesh. Lavar la arena varias veces para eliminar las sales. Mezclar el musgo y la arena. Si estos materiales no estuvieran disponibles, utilizar cualquier otro sustrato que tenga una estructura similar. El suelo para la preparación de almácigos debe ser fino y poroso para facilitar el transplante posterior de las indicadoras.

Esterilizar la mezcla en una de las siguientes formas:

- La esterilización con vapor a 100°C durante 30 minutos es el mejor método, sin embargo, no siempre existen las facilidades para su aplicación.

- En regiones cálidas, se puede utilizar calor solar. Esparcir el sustrato uniformemente sobre una superficie de metal y exponerlo al sol durante 2 semanas. Voltear el sustrato periódicamente y humedecerlo con agua. También se puede sellar el sustrato húmedo dentro de una bolsa de plástico y exponerlo a la luz solar durante 2 semanas. Voltear la bolsa periódicamente.

Cuando la mezcla se enfríe (dos ó tres horas después) añadir 40 g de nitrato de amonio, 200 g de monofosfato y 50 g de una mezcla de sulfato de potasio y de magnesio (22% y 18%, respectivamente) por cada 100 kg de suelo.

b) Siembra de semillas.

Todas las plantas indicadoras provienen de semilla sana. No es aconsejable propagarlas a través de esquejes.

Para mejorar la uniformidad en la germinación, las semillas pueden ser tratadas sumergiéndolas en ácido giberélico (1500 ppm) durante 24 horas. Secar las semillas por lo menos durante 24 horas antes de su siembra.

Llenar bandejas de aproximadamente 40 x 30 x 5 cm (ó cualquier otro recipiente apropiado) con el sustrato. Hacer surcos paralelos de 0,5

cm de profundidad cada 3 ó 4 cm. (fig. 1). Sembrar las semillas de una planta indicadora en un surco (Fig. 2). Se puede sembrar semillas de diferentes plantas indicadoras en una misma bandeja (fig. 3) pero utilizando diferentes surcos debidamente identificados. Cubrir con una capa delgada de suelo y regar suavemente.

La mayoría de las semillas germinan mejor a 22 - 24°C; en regiones frías, puede ser necesario un calentamiento artificial. Sembrar más semillas de la cantidad de plantas necesarias, ya que la germinación puede ser errática. Utilizar las plantas que emerjan primero y descartar el resto.

El CIP tiene una cantidad limitada de semillas disponibles. Si se desea, enviar una solicitud al CIP. Incluir un permiso de importación si su país así lo requiere.

c) transplante.

Transplantar individualmente los almácigos de cierta edad (ver cuadro) en macetas llenas con suelo para transplante esterilizado (arena : suelo: musgo, 1:1:1, respectivamente). Preparar el sustrato tal como se describió anteriormente, pero utilizando una malla de 36 mesh en el tamizado. Utilizar macetas de 5 cm de diámetro. Las macetas de arcilla son mejores que las macetas de plástico.

Limpiar y esterilizar las macetas antes de utilizarlas. Aflojar el suelo de las bandejas con almácigos (Fig. 4) y levantar las plantitas cuidadosamente (fig. 5). Plantar el almácigo en un agujero de 2 a 3 cm de profundidad (fig. 6). Presionar ligeramente el suelo para que el almácigo se sostenga en su lugar. Regar inmediatamente.

2. Manejo de invernaderos

Los invernaderos deben proveer condiciones óptimas para el crecimiento vigoroso de las plantas indicadoras. Se deben tener en cuenta los siguientes factores:

a) Ventilación.

Durante las estaciones cálidas, las mallas a prueba de áfidos pueden producir calor excesivo y es necesario utilizar ventilación adicional. Utilizar un equipo de aire acondicionado con las entradas protegidas contra insectos.

b) Sombra.

Para evitar las temperaturas extremas del verano, cubra los invernaderos durante las horas del día.

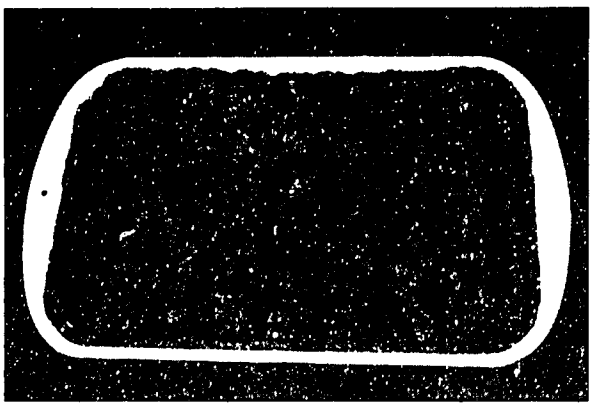
c) Luz.

Durante invierno, puede ser necesaria una iluminación suplementaria para extender el fotoperíodo a 16 horas.

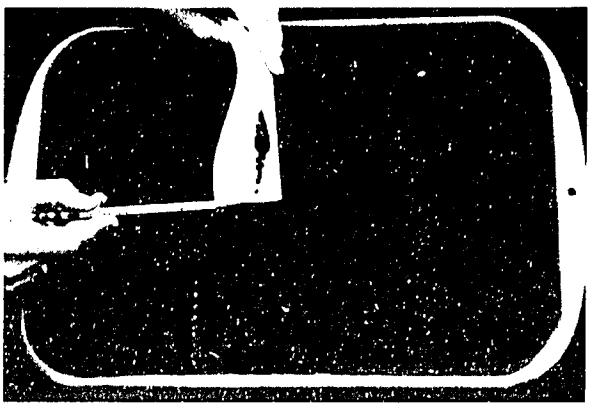
Planta Indicadora	TP	IN
Gomphrena globosa *	28	46
Nicotiana rustica	28	46
Nicotiana glutinosa *	28	46
Nicotiana tabacum "White Burley "*	28	46
Nicotiana clevelandii	28	46
Nicotiana debneyii *	28	46
Nicotiana benthamiana	17	49
Nicotiana occidentalis	23	49
Nicotiana tabacum "samsun"	28	46
Nicandra physaloides *	28	46
Physalis floridana *	17	31
Datura metel *	17	31
Datura stramonium *	17	31
Chenopodium quinoa *	17	31
Chenopodium murale *	17	31
Chenopodium amaranticolor *	28	46
Lycopersicum esculentum "rutgers" *	17	31

* utilizadas en el CIP para trabajo de rutina.

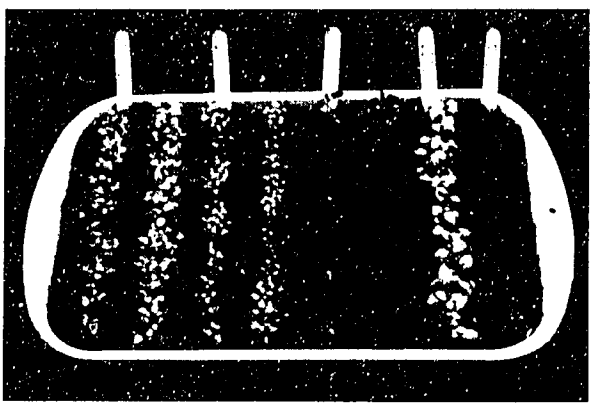
Número de días desde la siembra hasta el transplante y la inoculación (para las condiciones del CIP, Lima). TP: transplante; IN: inoculación.



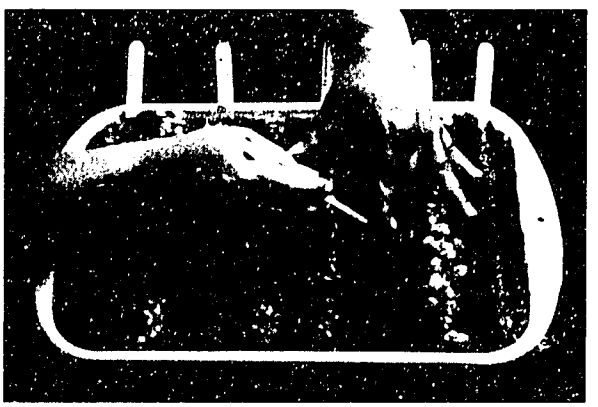
1



2



3



4

5

6

Algunos Tubos fluorescentes de luz diurna y focos incandescentes (de 25 w cada uno) son suficientes para mantener un crecimiento adecuado de las plantas.

d) Higiene.

Aplicar las siguientes medidas de higiene para evitar la contaminación:

-Retirar todos los restos de plantas.

-Retirar las malezas dentro y fuera de los invernaderos.

-No colocar plantas de campo en los invernaderos, a menos que hayan sido tratadas con productos químicos para controlar patógenos y enfermedades. Mantener las plantas separadas de las plantas indicadoras.

-No entrar a los invernaderos inmediatamente después de haber visitado un campo.

-Utilizar un mandil de laboratorio limpio cuando se ingrese a los invernaderos.

-Lavarse las manos antes de ingresar a los invernaderos.

-No tocar las plantas indicadoras. Cuando se trabaje con plantas indicadoras utilizar toallas de papel para sostener las hojas.

Fuente: modificado de "Use of Indicator Plants for Detection of Potato Viruses", CIP research guide 21, Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 1989.

REFERENCIAS

HOOKER, W.J. 1982. Virus diseases of potato. Technical Information Bulletin 19. International Potato Center, Lima, Perú. 17 pp.

RAMAN, K.V. 1985. Transmission of Potato viruses by aphids. Technical Information Bulletin 2. International Potato Center, Lima, Perú. 23 pp.

SALAZAR, L.F. 1982. Virus detection in potato seed production. Technical Information Bulletin 18. International Potato Center, Lima, Perú. 14 pp.

NORDHAM, D. 1973. Identificaction of plant viruses. Methods and experiments. Pudoc, Wageningem, The Netherlands. 204 pp.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU),** constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.2 DETECCION / Plantas Indicadoras

Fascículo 3.2.2 DESINFECCION DEL SUSTRATO DE SIEMBRA

Para producir "semilla básica" de papa y plantas indicadoras de virus en invernaderos, se puede utilizar como sustrato una mezcla de suelo, musgo y arena. Para evitar que los tubérculos y las plantas se contaminen con las plagas y enfermedades existentes en los suelos, la mezcla debe ser desinfectada.

La desinfectación puede efectuarse mediante la utilización de métodos biológicos, químicos o físicos, los cuales, en su mayoría, son eficientes pero costosos y requieren, en algunos casos, de un manejo cuidadoso, especialmente cuando se utilizan químicos que son altamente tóxicos.

En los invernaderos se siembra principalmente plántulas in vitro, semillas, esquejes o tuberculillos libres de virus y de otros fitopatógenos, por lo que su instalación requiere de un sustrato previamente desinfestado para asegurar que los tubérculos y plantas producidos tengan una sanidad excelente certificada y no sean portadores de enfermedades fungosas, bacterianas, viróticas o de nematodos. La desinfección debe también eliminar los insectos y semillas de malezas que afectan la producción de semilla de alta calidad y de plantas vigorosas.

DESINFECCION CON BROMURO DE METILO

Se puede escoger entre diferentes productos comerciales para desinfestar la mezcla de siembra; sin embargo, muchos de ellos toman varios días para su aplicación. Pero hay uno, el gas bromuro de metilo que, aunque es tóxico, puede aplicarse en pocos días, en forma sencilla y con resultados efectivos.

1. Poza de aplicación

Las figuras 1 y 2 muestran los materiales necesarios y sus medidas. Sobre una loza de concreto, construir paredes de ladrillo revestidas con cemento. La capacidad de la poza debe ser de 3 m^3 y debe ofrecer facilidades para cargar y descargar la mezcla o sustrato por desinfestar. Las dimensiones de la poza deben ser 3,60 m de largo por 1,20 m de ancho por 0,70 m de profundidad.

En el borde superior de las paredes de la poza, hacer una canaleta de 5 cm de ancho y 2 cm de profundidad, que recorra todo el perímetro (A).

Utilizar una cubierta de plástico (B) de un material transparente que tenga entre 0,8 y 1 mm de espesor para que pueda ser utilizada varias veces sin que se deteriore.

Construir un batidor (C) de lámina de hierro de 1/4" por 1 3/4", que encaje en la canaleta del borde de la poza, y con asideros para facilitar su colocación. La función del bastidor es sujetar el plástico que servirá para tapar la poza antes del tratamiento y para evitar fugas del producto aplicado.

A 65 cm de altura en un costado de la poza (figura 2), colocar un tubo metálico de aplicación (D) empotrado en la pared, pasante y con rosca. El tubo debe quedar ligeramente sobre el nivel superior del sustrato para que pueda fluir el gas. Conectar a la poza el gas bromuro de metilo que se quiere aplicar. Existen dos sistemas de conexión:

a) Con niple (E) que conecta el balón grande de 92 Kg (200 lb) por medio de una manguera. El gas se dosifica por medio de la llave del balón.

b) Con aplicador específico para envases de 460 g (1 lb) conectado directamente. El aplicador tiene una abrazadera que, al ajustarla, presiona una punta metálica hueca la cual perfora el envase dejando salir el gas.

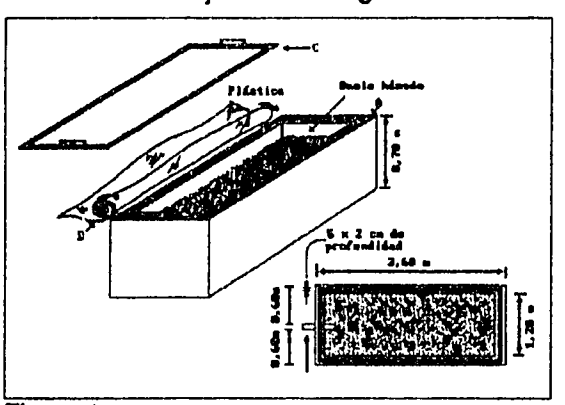


Figura 1.

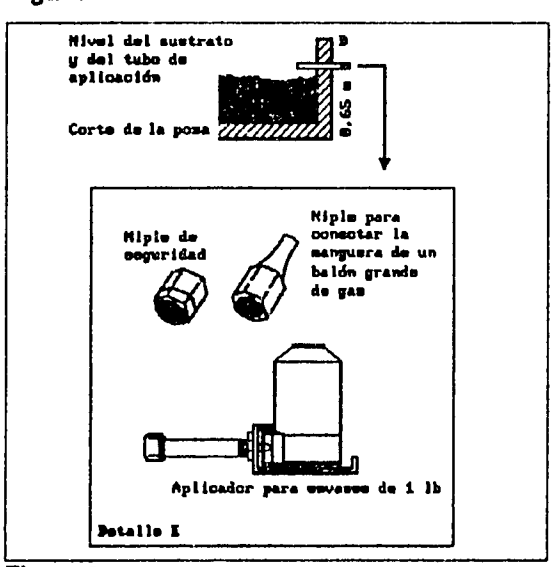


Figura 2.

Practicar orificios (figura 3) en el sustrato húmedo (F) para facilitar el movimiento del gas. Hacer los orificios con un trozo de madera de 2 cm de diámetro, que lleguen hasta el fondo y espaciados 15 a 20 cm entre ellos.

Para cubrir la poza, taparla con la cubierta de plástico grueso. Seguidamente colocar encima el bastidor metálico, haciendo presión para que se introduzca en la canaleta y selle la poza. Para completar esta operación de manera hermética, colocar suelo húmedo o arena encima del bastidor.

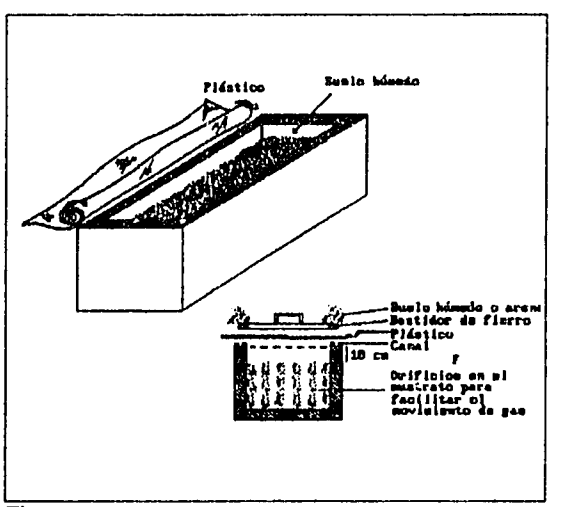


Figura 3.

Nota: Utilizar guantes, respirador de gases, lentes, etc. al aplicar y al destapar la poza. Sellar bien la poza de desinfestación, evitando la posible fuga de gas.

2. Dosis utilizada

Según el tipo de mezcla, las dosis utilizadas pueden variar de 1 a 1,5 ó de 2 a 3 lb/m^3 de sustrato por desinfestar. Los suelos pesados y altamente infestados necesitarán dosis más altas.

Es recomendable que después de la primera aplicación con una dosis dada, se realicen las pruebas necesarias para detectar si todavía hay presencia de hongos, bacterias o nemátodos con esa dosis.

3. Tiempo de aplicación

La aplicación del bromuro de metilo dura 72 horas. Al término de éstas, descubrir la poza y dejar ventilar el sustrato removiéndolo durante 72 horas adicionales. Después de transcurrido este tiempo, el sustrato puede ser utilizado. Como precaución para asegurar que no queden residuos tóxicos, colocar un poco de sustrato en una maceta y transplantar una plántula de lechuga; si ésta no sufre alteraciones, entonces no existen residuos tóxicos.

4. Alternativas para sellar la poza

Como alternativa para sellar la poza, en lugar de hacer la canaleta, colocar 10 pernos repartidos en el borde superior de la poza y hacer el bastidor y la cubierta de la figura 4.

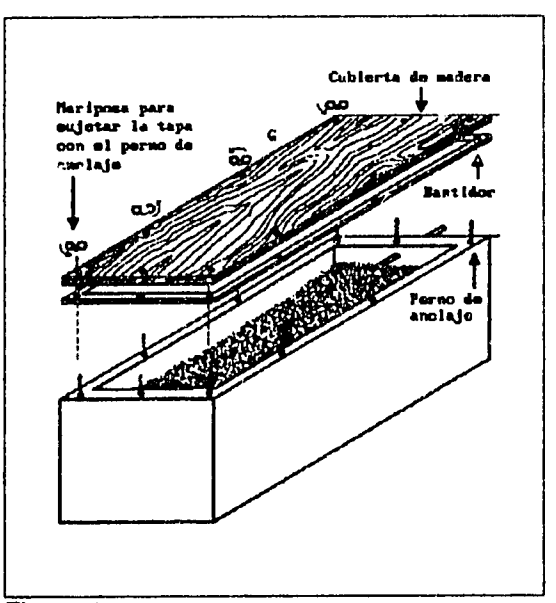


Figura 4.

Esta cubierta es un bastidor de madera, contraplacado con triplay de 4 mm (G). Para el bastidor utilizar listones de 3/4 de pulgada, lo que da un espesor final aproximado de 2 cm (1" en bruto = aproximado 3/4" cepillado).

En la cubierta, perforar orificios cerca del borde que coincidan con las medidas de los 10 pernos de anclaje.

Entre la cubierta de madera y la poza, colocar un empaque de jebe o lona para sellar, el cual tendrá 10 huecos por donde pasan los pernos.

Sellar la poza asegurando dicha cubierta con las respectivas tuercas de mariposa en los pernos.

5. Alternativas para la aplicación

Las alternativas para aplicar el bromuro de metilo se muestran en las figuras 5 y 6.

a) Gas bajo presión

Construir la poza de desinfestación del sustrato (figura 5, H). Colocar el tubo de aplicación en la pared, y conectarlo mediante una manguera al cilindro grande de bromuro de metilo de 92 kg (200 lb). Interiormente, conectar el tubo de aplicación a un tubo de plástico que presenta a lo largo varias perforaciones equidistantes. Colocar este tubo en el fondo de la poza para permitir una distribución uniforme del gas, el cual fluye debido a la presión puesto que se halla comprimido en el balón. Antes de la aplicación, hacer los orificios en el sustrato húmedo, como se explicó anteriormente,

El gas tiende a subir rápidamente para luego descender por los diferentes orificios del sustrato ya que el bromuro de metilo es más pesado que el aire. Notar que la cubierta de la poza puede ser de plástico o madera. Cuando se utilice el balón grande de gas, se puede colocar sobre una báscula para determinar, por diferencia de peso, la cantidad de producto aplicado, referido al volumen de suelo por desinfectar.

b) Gas en envase pequeño

La poza de desinfestación tiene las mismas características anteriores (figura 5, I). Cuando

se utiliza el envase de 460 g (1 lb) aplicar el gas mediante el aplicador conectado al tubo que atraviesa la pared. El gas se descarga directamente sobre la superficie del sustrato y luego desciende por los orificios que se han practicado en el sustrato, esparciéndose por toda la poza.

c) Sin tubos aplicadores

Si no se dispone del tubo aplicador para los envases de 460 g (1 lb) ni de balones grandes de 92 Kg (200 lb), realizar la aplicación en una poza con las mismas características anteriores, y con cubierta de plástico (figura 6, J). Tomar una base de madera con un clavo pasante; colocar ésta encima de la lata pequeña de 460 g (1 lb) de capacidad, luego sellar la poza con el plástico y hacer presión en la base de madera que tiene el clavo; así se perfora la lata, dejando escapar el gas, el cual se movilizará a través de los orificios en el sustrato como en los casos anteriores.

d) Sin poza de aplicación

Si no se dispone de la poza (figura 6, K) ni del aplicador, depositar la mezcla por desinfestar sobre un plástico y colocar encima el envase de bromuro de metilo de 460 g (1 lb). Sobre el envase colocar la base de madera con el clavo pasante. Cubrir todo con otro plástico y sellar

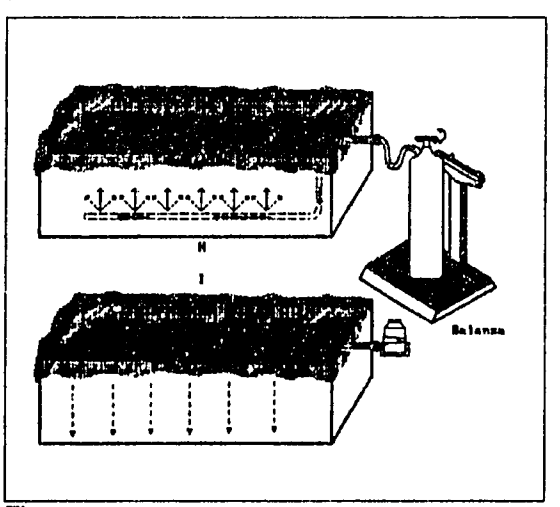


Figura 5.

alrededor con arena o suelo húmedo. Presionar la base de madera con el clavo para agujerear la lata y dejar escapar el gas, el cual se difunde en el sustrato.

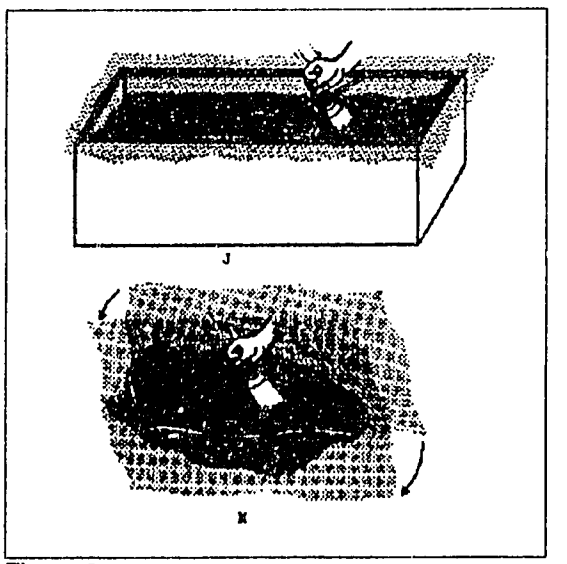


Figura 6.

DESINFECCION POR EL METODO DE LA SOLARIZACION

La erradicación de patógenos del suelo se logra mediante el empleo de medios físicos come el calor seco, vapor, agua caliente, radiación solar y bajas temperaturas. la solarización implica el uso de la radiación solar como un agente letal para el control de plagas y enfermedades mediante el uso de polietileno transparente colocado sobre el sustrato y la exposición a la luz del sol.

Con la solarización es posible eliminar hongos, nematodos y otros patógenos, así como semillas de malezas presentes en el sustrato. Además, este método permite el uso complementario de fungicidas, nematicidas, etc., en dosis que pueden ser mucho menores que las recomendadas.

El sustrato a desinfectar es un a mezcla de musgo, suelo y arena en proporciones 2:1:1,

respectivamente, con un contenido de humedad equivalente a la capacidad de campo.

Esta práctica se realiza fuera de los invernaderos en un patio o terreno, exponiendo el sustrato a los rayos solares. Se utiliza plástico transparente de un espesor comprendido entre 0,05 y 0,50 mm, recomendándose el de mayor grosor por su durabilidad y porque además conserva mejor la temperatura. El plástico transparente deja pasar los rayos solares, eliminando el efecto refractario, captándose de esa manera toda radiación con la consecuente acumulación de mayor temperatura en la horas de mayor insolación.

La desinfección se basa en un proceso físico, alternado altas y bajas temperaturas. la humedad del sustrato juega un papel importante debido a que en las horas de mayor temperatura produce vapor, y en las de menor temperatura (durante la noche), se condensa, produciéndose un proceso de pasteurización continua durante el tiempo que dure el tratamiento. estas fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, rompen fácilmente el ciclo biológico de los fitopatógenos presentes en el sustrato.

1. Secuencia del armado de la cámara

Utilizar plástico de 1,50 m de ancho por la longitud deseada y de acuerdo a la disponibilidad de espacio. Este plástico se coloca sobre la superficie del suelo, patio o terreno, como base. A los lados y a los extremos, colocar maderas de 1" x 8" x 10" como se indica en la figura 7, sostenidas por ladrillos que sirven para formar una especie de cama donde se colocará el sustrato en forma de colchón para someterlo al proceso de solarización. Los lados A y B deben se construidos igual que C y D.

Vaciar el sustrato sobre el plástico hasta cubrir una altura de 20 a 30 cm como se muestra en la figura 8. Luego, con la ayuda de un rastrillo, extenderlo uniformemente en toda la superficie preparada.

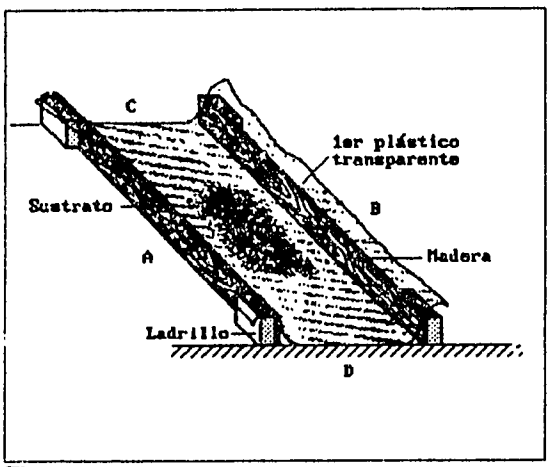


Figura 7.

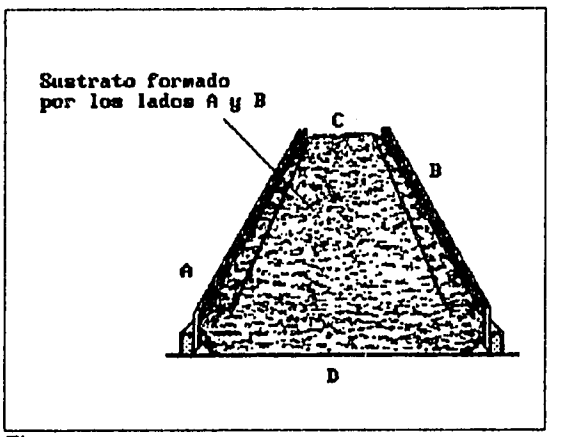


Figura 8.

Agregar agua hasta llegar a la capacidad normal de campo, formar el colchón doblando las partes terminales de los cuatro lados. Finalmente, el colchón debe tener un ancho aproximado de 1 m (figura 9). después de formado el colchón, retirar los ladrillos y maderas que sirvieron para darle forma.

Colocar un segundo plástico, de las mismas dimensiones que el de la base, para cubrir la parte superior. Los extremos deben sobresalir para facilitar el sellado hermético con arena por todo el contorno. Colocar también un termómetro para medir la temperatura que alcanzará el sustrato durante el proceso de solarización (figura 10). Esto permitirá conocer en qué momento se llega a la máxima

temperatura en relación a la incidencia de los rayos solares.

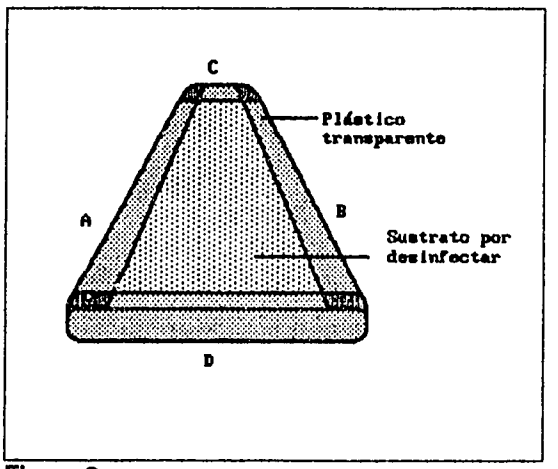


Figura 9.

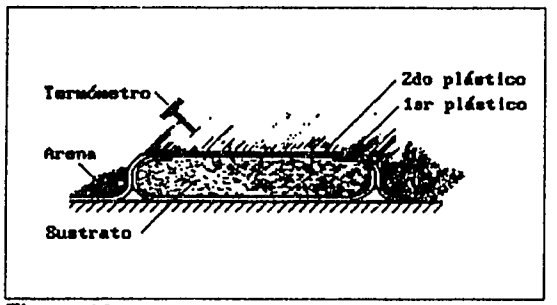


Figura 10.

Inmediatamente después del sellado, colocar los arcos, que pueden ser de madera o plástico fijados al piso a través de estacas de madera o hierro.

El arco (figura 11) puede ser:

- de varillas de plástico o hierro con estaca de madera (A),
- de bambú verde amarrado a una estaca de madera (B),
- de rama verde de un árbol amarrado a una estaca de madera (C),
- de plástico para cables de electricidad colocado sobre una estaca de hierro (D), y,
- de cualquier material amarrado a una estaca de hierro (E).

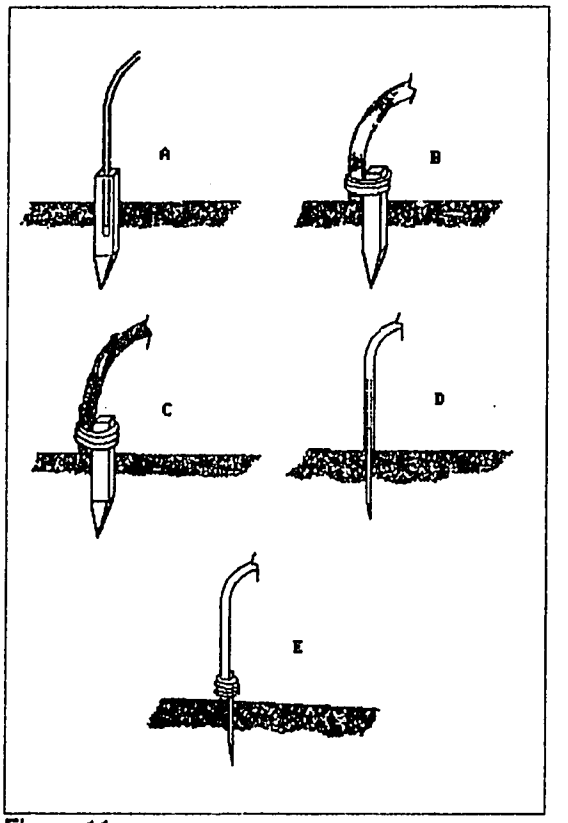


Figura 11.

Los arcos se colocan a lo largo del colchón de sustrato, a 1 m de distancia entre sí. La distancia en la base de los arcos es de aproximadamente 1,40 m, dependiendo del ancho del colchón colocado en el interior. Mantener una distancia de más de 20 cm a ambos lados (figura 12).

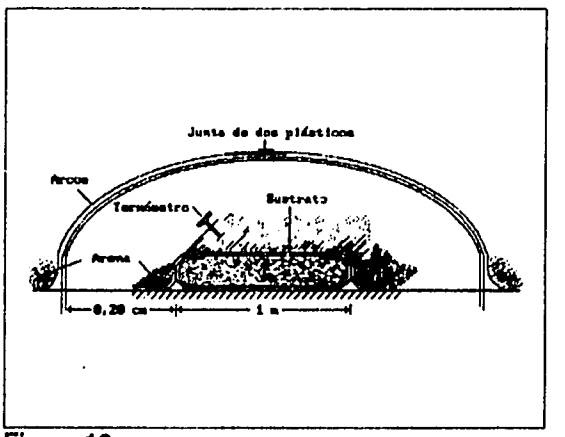


Figura 12.

Colocar sobre los arcos un tercer plástico, que cubra todo el sistema. Si éste no tiene el ancho suficiente, junte dos plásticos por los bordes en toda su longitud. Utilizar varillas de madera de 1 cm por 2 cm por la longitud requerida, colocando una en la parte superior y otra en la parte inferior, y entre ellas los dos bordes por juntar. Asegurar con clavos de 3/4" de longitud. Finalmente, el plástico se coloca sobre los arcos dispuestos transversalmente, quedando la unión en la parte central (figura 13).

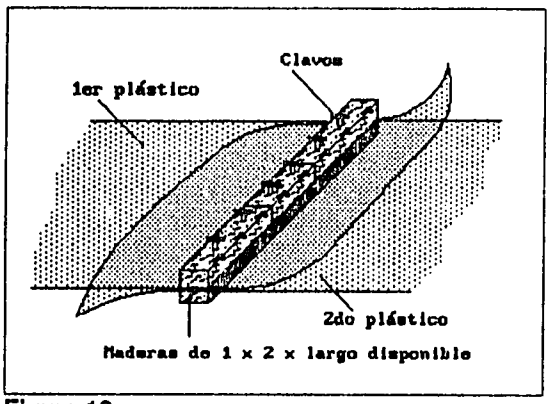


Figura 13.

Cubrir con arena los bordes laterales que se encuentran en contacto con el piso. Quedando así toda la cámara herméticamente sellada (figura 14).

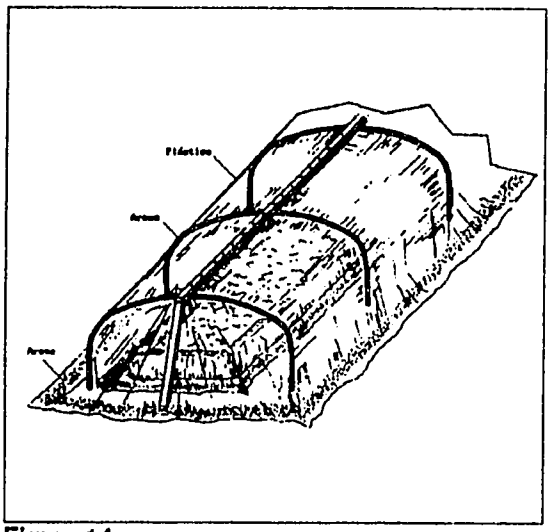


Figura 14.

2. Alternativas para la aplicación del tratamiento de solarización

Para colocar el sustrato, utilizar mangas o tubos transparentes de polietileno. Pueden fabricarse sellando el borde con la ayuda de dos maderitas y clavos o simplemente doblando las entradas del tubo (figura 15).

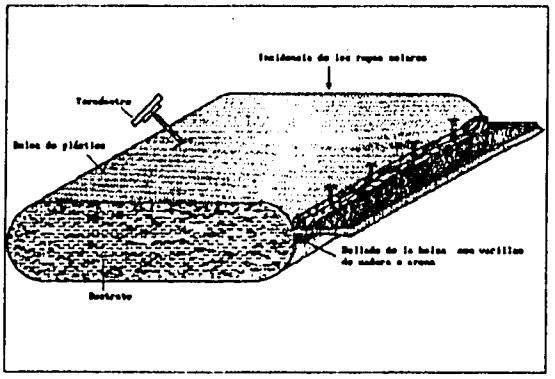


Figura 15

Las bolsas con el sustrato así preparadas se pueden utilizar sin cubrirlas con los arcos ni con un plástico adicional. En este caso, los ensayos demostraron que la temperatura del sustrato alcanzó de 45 a 55oC durante las horas en que los rayos solares incidieron en forma perpendicular (máxima radiación).

Sin embargo, colocándolas debajo de los arcos y con una capa más de plástico (figura 16), la temperatura alcanzada fue de 60 a 70oC, registrándose una temperatura máxima de 74°C para las condiciones de La Molina, Lima.

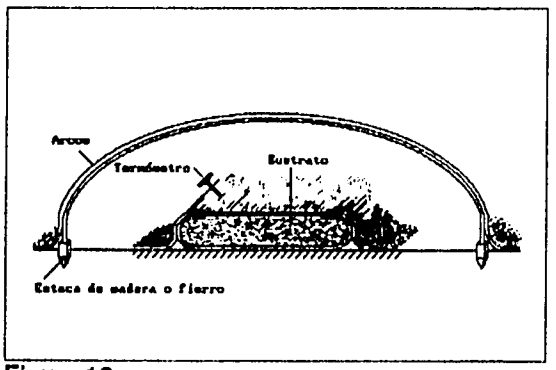


Figura 16.

3. Duración del tratamiento

La solarización debe tener una duración comprendida entre 4 y 6 semanas. Se recomienda ensayar la técnica para determinar la duración del tratamiento en las diferentes zonas donde se vaya a utilizar.

Dependiendo de las horas de insolación y de la intensidad de la radiación solar, puede obtenerse, en un menor número de días, un sustrato altamente desinfestado.

4. Rango de eliminación de plagas y enfermedades agrícolas presentes en el sustrato.

El sustrato contiene un amplio rango de microorganismos patógenos, nematodos e insectos que afectan generalmente a las raíces y al cuello de las plantas produciéndose dentro de los invernaderos pérdidas considerables en las camas de producción.

a) Hongos

La solarización logra reducir las poblaciones de varias especies de hongos que se encuentran presentes en el sustrato de siembra, como *Verticillium dahliae, Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Thielaviopsis basicola*.

b) Bacterias

Con este método se eliminan también gran parte de bacterias que afectan el crecimiento de las plantas de papa. Algunos investigadores han encontrado que los suelos tratados con solarización presentaron en un medio de PDA (papa-agar-dextrosa), un menor número de colonias bacterianas y fungosas, confirmando así la efectividad de este tratamiento.

c) Nematodos

La solarización elimina los nematodos contenidos en los sustratos tratados. *Meloidogyne incognita* es eliminado eficazmente. Las poblaciones de *Globodera* spp., *Pratylenchus*, *Paratrichodorus*, *Criconemella*, *Xiphinema* y *Pratylenchus* spp. se reducen entre un 42 y 100%.

d) Insectos

Ciertas larvas y pupas de algunos insectos que atacan la papa y que se encuentran en el sustrato pueden ser eliminadas.

5. Otros efectos de la solarización

a) Disponibilidad de nutrientes

Los sustratos tratados con solarización muestran cierto incremento en el contenido de materia orgánica y minerales. El radical NO_3^- se incrementa, así como otros iones como $NH4^+$, K^+, Ca^{++}, Mg^{++} y Cl^-.

El sustrato es preparado normalmente en base a una mezcla de musgo, arena y suelo, esto es, tiene un alto contenido de materia orgánica. Sometido a un proceso de variaciones de temperatura y humedad, se acelera el proceso de mineralización de la materia orgánica.

Sin embargo, en cierta etapa de desarrollo de la planta se pueden presentar síntomas de deficiencia de elementos menores, posiblemente por efecto de la destrucción de la flora benéfica del suelo. Estas deficiencias se corrigen con la aplicación de abonos foliares quelatizados.

b) Semillas de malezas

Las semillas y las partes vegetativas de propagación, como los rizomas y bulbos de las malezas que se encuentran en los sustratos de siembra, son eliminados hasta en un 100%.

Se ha comprobado la eficacia que tienen las altas temperaturas logradas con la solarización

para destruir estas formas de propagación en los sustratos para la producción de semilla básica de papa en los invernaderos y para la producción de plantas indicadoras de virus.

Modificado de:

AGUILAR, J. y C. VITORELLI. 1987. Desinfeste el substrato de siembra con bromuro de metilo para producir "semilla básica" de papa en invernaderos. INIPA/COTESU, Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

AGUILAR, J. et al. 1989. Desinfeste el substrato de siembra por el método de la solarización. INIAA/COTESU/CIP, Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

Las Unidades Técnicas de Capacitación (TTU), constituyen materiales impresos de estudio para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.2 DETECCION/ Plantas Indicadoras

Fascículo 3.2.3 Inoculación de Plantas Indicadoras para la Detección de Virus de Plantas

1. Inoculación mecánica

Con excepción de algunos virus, como el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) y "Solanum apical leafcurl virus" (SALCV), la mayoría de los virus de papa pueden ser transmitidos por inoculación mecánica.

a) Materiales:

- mortero y pilón estériles
- plantas indicadoras
- polvo de carborundum (600 mesh)
- hisopos de algodón estériles
- 2 a 3 g aproximadamente del material vegetal que va a ser probado (hojas jóvenes, pétalos, tubérculos, raíces)
- solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 8,0
- atomizador con agua destilada

Preparar las siguientes soluciones en agua destilada:

Solución A:		
	$NaH_2PO_4.H_2O$	27,6 g/l
Solución B:		
	$Na_2HPO_4.7H_2O$	53,65 g/l
ó	$Na_2HPO_4.12H_2O$	71,64 g/l

Mezclar 2,65 ml de la solución A y 47,35 ml de la solución B y llevar a un volumen final de 100 ml con agua destilada.

b) Procedimiento:

Lavarse las manos con jabón. Identificar cada planta indicadora indicando fecha, origen de la muestra y cualquier otra información pertinente. Espolvorear las hojas de las plantas indicadoras con Carborundum (figs. 1 y 2). Macerar en el mortero el tejido vegetal que va a ser probado con 2 ml de solución amortiguadora (fig. 3).

Humedecer un hisopo de algodón ó la punta de un dedo con la savia e inocular todas las hojas de la planta indicadora (figs. 4 y 5). Realizar cada pasada del hisopo o dedo comenzando en el peciolo y hasta la punta de hoja. Sostener la hoja utilizando una toalla de papel. Evitar una presión excesiva.

Inocular un "grupo control" de plantas indicadoras con solución amortiguadora pura.

Inmediatamente después de la inoculación, lavar suavemente la savia de las hojas inoculadas utilizando el atomizador con agua destilada (fig. 6). Colocar las plantas en el invernadero.

Es recomendable cubrir las plantas con papel periódico una vez que hayan sido tras-

ladadas al invernadero hasta el día siguiente. Esto ayuda a mantener la humedad sobre las hojas durante un tiempo más prolongado. Probablemente la oscuridad también tenga un efecto beneficioso.

Retirar todo el material utilizado, limpiar la mesa, y lavarse las manos antes de proceder con la siguiente prueba.

2. Injertos

Todos los virus de papa, incluyendo los que no pueden ser transmitidos por inoculación mecánica, pueden ser fácilmente inoculados a plantas indicadoras utilizando injertos. Sin embargo, la planta donante y la hospedera recipiente tienen que ser compatibles y el virus debe infectar sistémicamente a la planta indicadora.

a) Materiales:

- cuchilla delgada, hoja de afeitar o bisturí
- rafia flexibilizada en agua o tiras de parafilm de 1 x 3 cm
- estacas de madera para sostener a las plantas
- bolsas de plástico (ligeramente más grandes que las plantas que van a ser injertadas)
- plantas indicadoras "porta-injerto" (las plantas indicadoras utilizadas para el injerto deben ser más maduras que las plantas utilizadas en la inoculación mecánica; los tallos de las indicadoras deben ser fuertes y suficientemente gruesos para sostener el injerto)
- material vegetal que va a ser probado ("púa")
-

Existen varios procedimientos para realizar injertos. Para la detección de virus de papa, los más comúnmente utilizados son: injerto de lado e injerto de aproximación.

b) Injerto de lado:

El injerto de lado requiere que la planta donante y la planta recipiente sean muy compatibles.

De la planta indicadora (porta-injerto) retirar la mayoría de las hojas madura. Si es necesario, sostener la planta con una estaca. Realizar una incisión oblicua de 0,5 a 1 cm de profundidad hacia abajo en el tallo (figs. 7 y 8).

Del hospedero donante (púa) seleccionar un ápice jóven con una o dos hojas. Tallar la base de la púa en forma de cuña de 0,5 a 1 cm largo (fig. 9).

Insertar la púa en la incisión del porta-injerto y asegurarla con rafia o parafilm (figs. 10 y 11). Cubrir la planta injertada con una bolsa de plástico húmeda (fig. 12). Colocar la planta en un lugar sombreado y fresco.

Revisar la planta diariamente para asegurar que la bolsa de plástico esté húmeda. Después de 3 a 4 días, retirar la bolsa y transferir la planta al invernadero.

En este tipo de injerto se puede utilizar ápices de tallos y hojas, o piezas de tubérculo como púa.

c) Injerto de aproximación

Tanto los porta-injertos como las púas se mantienen por sí mismos mediante su propio sistema de raíces. Este tipo de injerto es muy útil cuando las plantas no son compatibles por injerto de lado.

En la planta donante, realizar un corte oblicuo de 1 cm de profundidad hacia abajo en el tallo, aproximadamente a 4 ó 5 cm sobre el nivel del suelo.

En la planta recipiente, y a la misma altura, realizar un corte hacia arriba en el tallo. El tallo debe tener un espesor similar al de la planta donante (fig. 13).

Fig. 1

Fig. 2

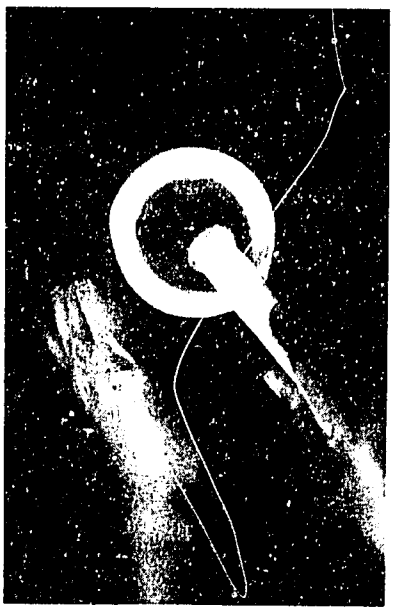


Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

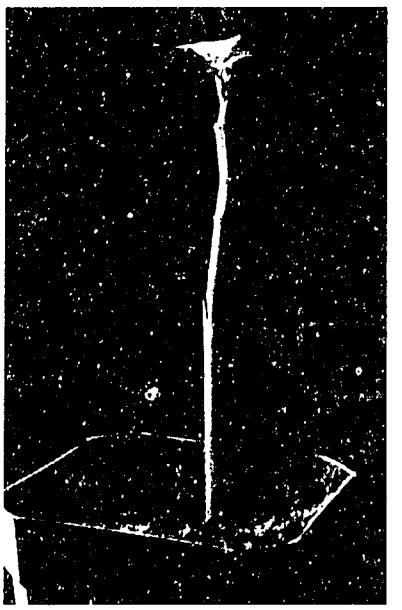


Fig. 8

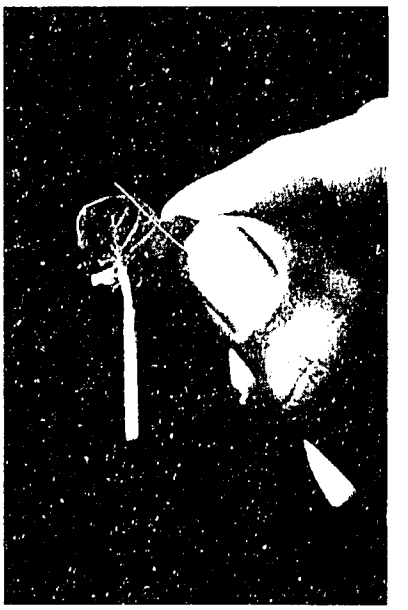


Fig. 9

Fig, 10

Fig. 11

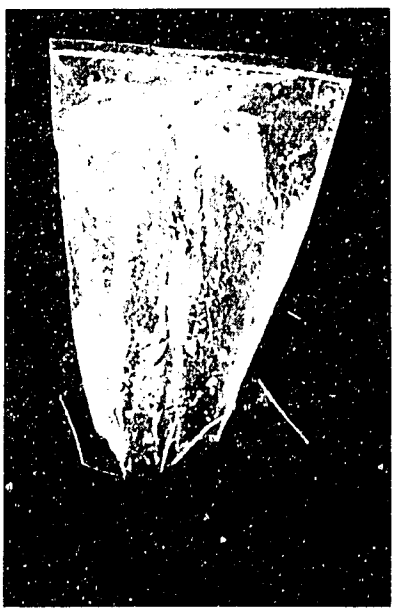


Fig. 12

Insertar la púa en el porta-injerto y asegurarla con rafia o parafilm (figs. 14 y 15). Sostener las plantas con una estaca.

3. Transmisión por vectores

Los afidos son los vectores más importantes de virus de papa. Los virus transmitidos por áfidos pueden ser divididos en dos grupos: no persistentes y persistentes.

Los virus no persistentes son adquiridos por el áfido después de algunos segundos de alimentación en una planta infectada. Pueden ser transmitidos a una planta sana en pocos segundos (por ejemplo, PVY).

Los virus persistentes son adquiridos por el áfido después de 20 a 30 minutos de alimentación. Generalmente, tienen un período de latencia que varía de horas a días en el áfido antes de que puedan ser transmitidos a una planta sana. Su transmisión requiere de un período de alimentación igualmente largo (por ejemplo, PLRV).

Si se necesitan áfidos vectores regularmente, se deben mantener colonias puras de los mismos. Para el mantenimiento de los áfidos se necesitan jaulas entomológicas de 40 x 40 x 60 cm que consisten en marcos de madera cubiertos con una malla a prueba de áfidos (0,3 mm; fig. 16). Las jaulas pueden también ser de acrílico transparente (40 x 25 x 25 cm; fig. 17). Las planchas de acrílico que forman los lados de la jaula deben tener agujeros grandes cubiertos con malla de nylon. Este tipo de jaula generalmente no tiene base ya que se coloca sobre bandejas de plástico o aluminio llenas de arena de cuarzo. Las plantas deben ser regadas en las jaulas humedeciendo la arena.

El áfido vector más importante de virus de papa es *Myzus persicae*. Se utiliza una lupa 10x para identificarlo.

Myzus persicae generalmente coloniza las hojas inferiores maduras de la planta de papa. El color de los áfidos varía de verde a melocotón y, algunas veces, son translúcidos. El abdomen es ovalado (con forma de huevo) y su ancho es casi igual a la distancia que existe entre el tórax y la base de los sifones. La cabeza tiene tubérculos antenales prominentes dirigidos hacia adentro. Las formas aladas tienen una mancha negra distintiva en el abdomen.

a) Mantenimiento de colonias de áfidos libres de virus:

Debido a que los adultos viruíferos no transmiten virus de papa a su progenie, se pueden establecer fácilmente colonias libres de virus.

Tomar una hoja pequeña de una planta de col china joven y sana (*Brassica pekinensis*) y cubrir el extremo del peciolo con algodón humedecido. Asegurar el algodón con parafilm.

Colocar la hoja en una placa petri de plástico (14 cm de diámetro). Abrir un agujero, preferiblemente en la tapa, y cubrirlo con una malla a prueba de áfidos. Revisar la hoja diariamente y humedecer el algodón con agua destilada utilizando una jeringa.

Colectar una hoja de papa en el campo que tenga áfidos alados. Si no hay adultos alados, utilizar adultos ápteros.

Perturbar a los áfidos tocando el abdomen con un pincel de pelo de camello húmedo N° 0. Cuando los áfidos retiren su estilete y comiencen a moverse, transferirlos a la hoja de col china. Cerrar la placa petri.

Observar la hoja diariamente con la ayuda de una lupa para detectar la aparición de nuevos áfidos. Transferir las ninfas a una planta de col china sana y colocar la planta en una jaula.

Después de 3 ó 4 semanas, dependiendo de la temperatura, la planta de col china se encontrará llena de áfidos no viruíferos (sanos).

La iluminación continua no sólo evita la producción de áfidos alados, sino que también inhibe el buen crecimiento de la planta. Una

iluminación de 16 horas favorece el crecimiento de las plantas y reduce la aparición de áfidos alados.

b) Problemas frecuentes:

Los insectos parásitos de áfidos pueden ser controlados mediante insecticidas específicos; sin embargo, los insecticidas afectan el vigor de los áfidos. En este caso, la prevención es lo mejor. Revisar las colonias regularmente para detectar la aparición de parásitos. Si es posible, utilizar una red doble en las jaulas y mantener dos colonias al mismo tiempo, de esta forma, si en una de las colonias aparecen parásitos, todavía es posible utilizar la otra (fig. 18).

Los hongos parásitos pueden producir problemas cuando la humedad dentro de la jaula es alta. Regar las plantas cuidadosamente (fig. 19).

La excreción azucarada ("honeydew") producida por los áfidos promueve el crecimiento de hongos saprófitos. El ennegrecimiento de la superficie de las hojas es una indicación de que la colonia debe ser renovada.

Los ácaros son más difíciles de controlar. Aunque los ácaros no atacan a los áfidos, la población tiende a declinar. Comenzar una nueva colonia después de haber desinfectado las jaulas y mesas con un acaricida apropiado (fig. 20).

c) Inoculación de plantas indicadoras:

Los mismos materiales y procedimientos, con variaciones mínimas, pueden ser utilizados para transmitir virus no persistentes y persistentes.

Los materiales necesarios son los siguientes:

- áfidos no virulíferos ápteros (una hoja de la colonia de áfidos)
- placa petri de 14 cm de diámetro
- plantas indicadoras jóvenes
- Pincel de pelo de camello N°0 ó cualquier otro pincel de pelo fino
- recipiente con agua destilada
- piezas pequeñas de papel filtro
- hoja o planta hospedera que va a ser probada
- jaulas de plástico (250 - 500 cm3 de capacidad) con un agujero cubierto con una malla a prueba de áfidos

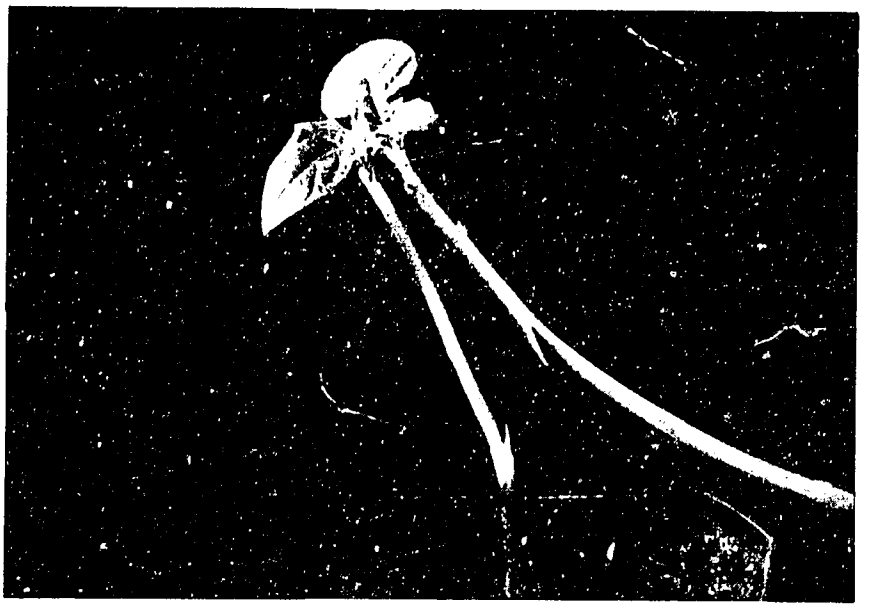
Perturbar a los áfidos en la hoja de col china con el pincel de pelo de camello humedecido o respirando sobre ellos. Transferir los áfidos a un papel filtro húmedo dentro de una placa petri. Cerrar la placa petri y la mantenerla durante 1 hora en un lugar sombreado y fresco (ayuno).

Colocar una hoja de la planta que va a ser probada en otra placa petri y transferir los áfidos a ella. Asegurar que los áfidos se alimenten en la hoja. En el caso de los virus no persistentes, permitir la alimentación de los áfidos durante 20 minutos y en el caso de los persistentes durante 24 a 48 horas. Para prevenir el desecamiento de la hoja (que ocurre en 24 horas), utilizar algodón húmedo en la base del peciolo.

Transferir por lo menos cinco áfidos a cada planta indicadora. Cubrir la planta con una jaula de plástico. En el caso de los virus no persistentes, permitir su alimentación durante 15 minutos y en el caso de los virus persistentes durante 24 a 48 horas.

Matar a los áfidos con un insecticida y colocar las plantas indicadoras inoculadas en el invernadero para el desarrollo y la observación de los síntomas.

En todo experimento de transmisión de áfidos, utilizar el control apropiado para distinguir los síntomas virales de los síntomas provocados por otros factores. Alimentar un grupo de afidos en plantas sanas y transferirlos a plantas indicadoras.



13

Fig. 14

Fig. 15

Fig. 16

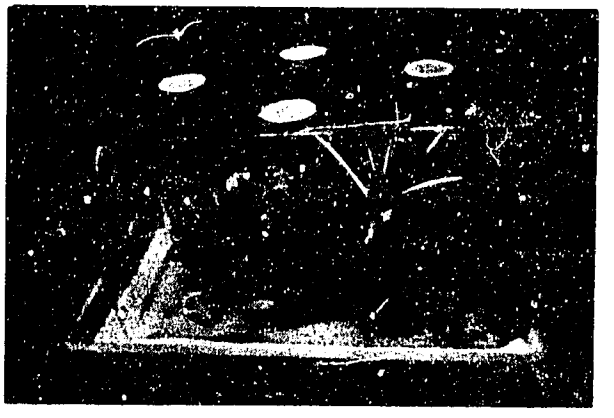


Fig. 17

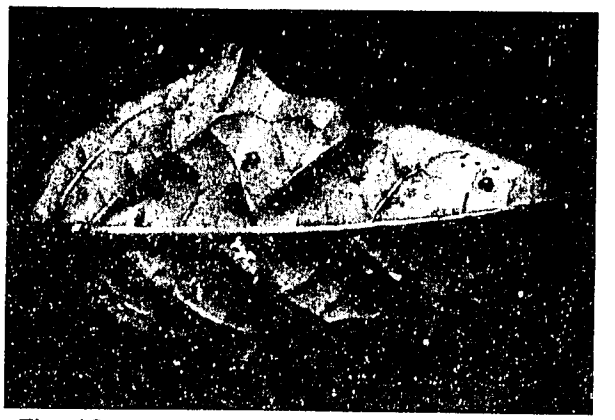


Fig. 18

Fig. 19

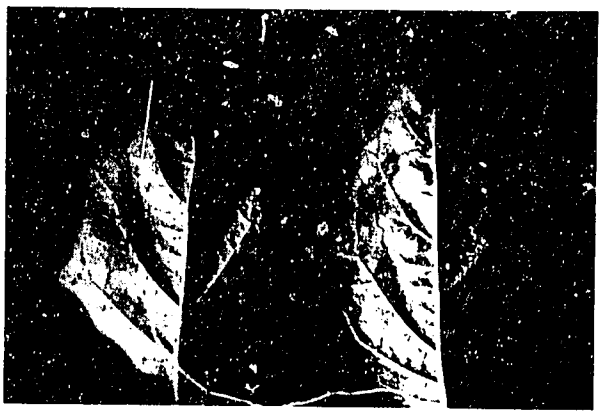


Fig. 20

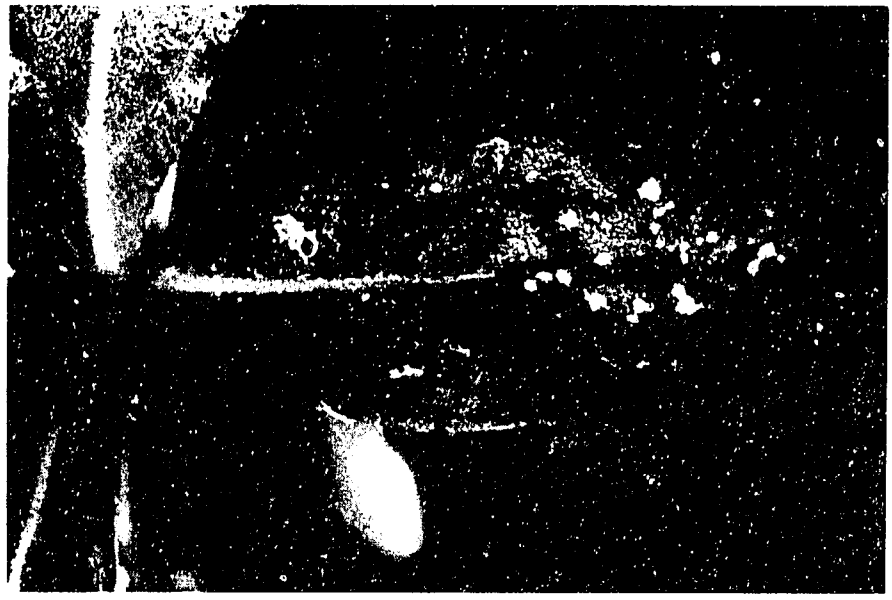


Fig. 21

Fig. 22

4. Desarrollo de los síntomas

Las plantas inoculadas deben ser observadas diariamente para observar el desarrollo de los síntomas. La mayoría de los virus de papa producen síntomas claros con temperaturas frías.

La velocidad de la aparición de los síntomas depende de la temperatura, la luz y el virus involucrado.

Los síntomas pueden ser divididos en dos grupos:

- Síntomas locales. Se restringen al sitio de inoculación (fig. 21).
- Síntomas sistémicos. Aparecen en hojas no inoculadas (fig. 22).

Ciertos virus de papa producen solamente síntomas locales en algunas indicadoras, mientras que otros pueden producir tanto síntomas locales como sistémicos (ver cuadro).

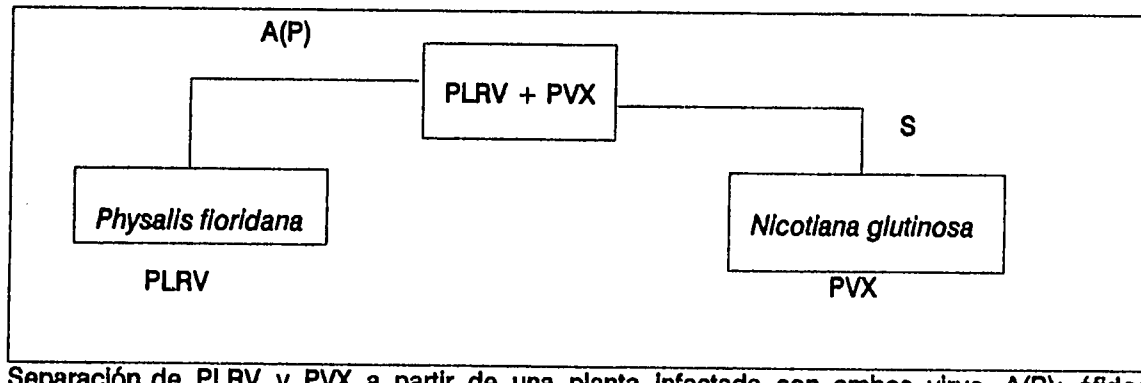
Se recomienda mantener un aislamiento del virus puro para estudios futuros y como control positivo para las pruebas serológicas.

Las plantas de campo normalmente se encuentran infectadas con más de un virus. Seguir las indicaciones dadas en la última página para separar los virus y obtener aislamientos puros.

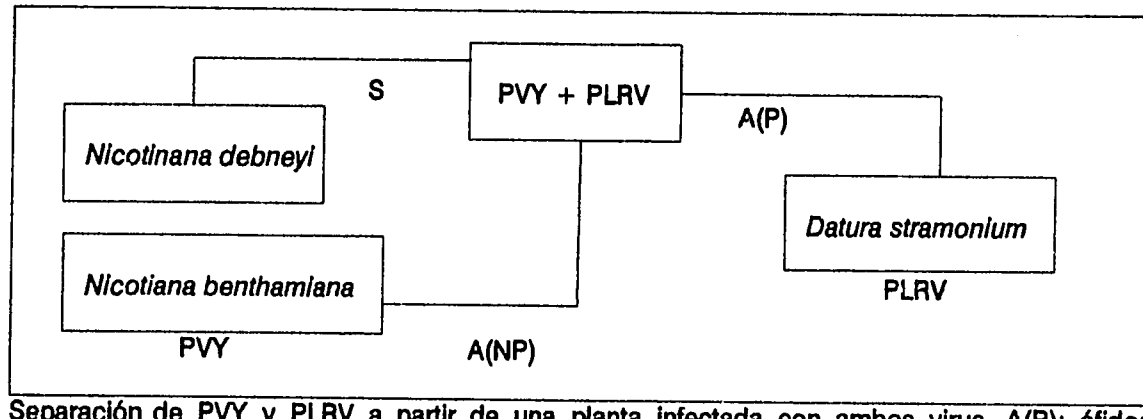
Fuente: modificado de"Use of Indicator Plants for Detection of Potato Viruses" CIP research guide 21, Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 1989.

Planta indicadora	PVYo	APMV	PVS	APLV	PVXc	PVXhb	PLRV
Nicotiana tabacum "White Burley"	-/mos	-/-	-/-	-/-	crs/vn,mos	crs/mos,vn	/-
N. tabacum "Samsun"	cs/mos	-/-	-/-	-/-	cs/mos	crs/crs,vn	-/-
N. glutinosa	-/mos,ld	-/mos	-/-	-/mos	cr,ns/vn,ld	cs/ld,mos	-/-
N. debneyi	cs/mos,ld	-/-	-/mos	-/mos	nrs/vn,mos	nrs/vn	-/-
N. occidentalis	ns/vn,ld	cs/vy,ld	-/-	cs/mos	cs,ns/vn,ld	ns/vn,ld	-/-
N. benthamiana	cs/mos,ld	cs/mos,ld	-/mos	-/mos	nrs/mos,ld	crs/mos,ld	-/-
N. bigelovii	-/mos	-/mos,ld	-/-	-/mos,vn	cs,ns/vn	cs/mos,vn	-/-
N. xanthi	cs/nip,mot	-/-	-/-	-/-	crs/vn	crs/crs,mos	-/-
Chenopodium quinoa	cs/-	-/-	cs/ld	cs/-	cs,ns/-	cs,ns/ld	-/-
C. amaranticolor	cs/-	-/-	cs/ld	cs/-	cs,ns/-	cs,ns/ld	-/-
C. murale	cs/-	-/-	ns/l	-/mos	cs,ns/-	cs,ns/-	-/-
Datura metel	-/mos	-/-	-/-	-/-	ns/mos	ns/mos,ld	-/-
D. stramonium	-/-	-/-	-/-	-/-	cs,ns/vn,ld	cs/mos,vn,ld	-/ivc
Gomphrena globosa	-/-	-/-	-/-	-/-	ns/-	ns/-	mot/ld
Lycopersicon esculentum "Rutgers"	-/mos	-/-	-/-	-/-	cs/vn,ld	cs/vb,mos,vn	l

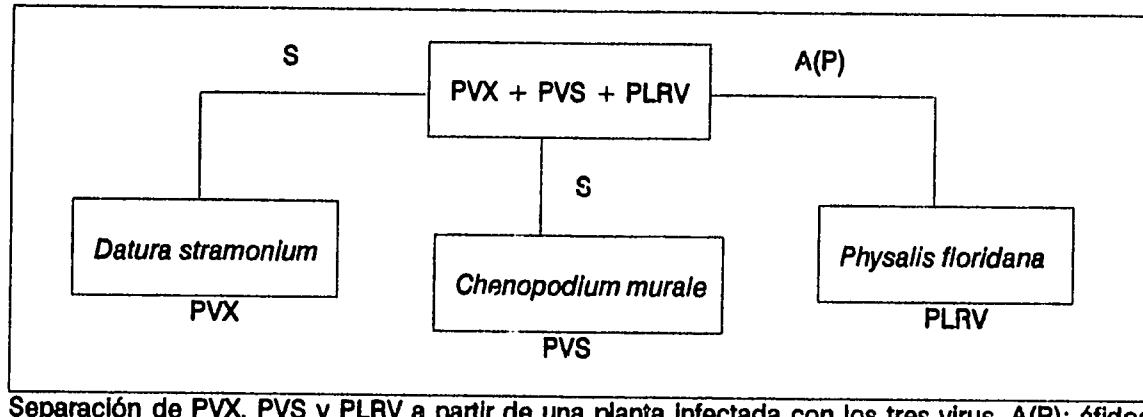
Síntomas locales y sistémicos causados por virus de papa en algunas plantas indicadoras seleccionadas. mot: moteado; nip: patrón de líneas necróticas; vy: amarillamiento de venas; crs: anillos cloróticos; vb: bandeamiento de venas; l: infección latente; mos: mosaico; cs: manchas cloróticas; ns: manchas necróticas; vn: necrosis de venas; ld: deformación de hojas; ivc: clorosis intervenal.



Separación de PLRV y PVX a partir de una planta infectada con ambos virus. A(P): áfidos (persistente); S: inoculación mecánica.



Separación de PVY y PLRV a partir de una planta infectada con ambos virus. A(P): áfidos (persistente); S: inoculación mecánica; A(NP): áfidos (no persistente).



Separación de PVX, PVS y PLRV a partir de una planta infectada con los tres virus. A(P): áfidos (persistente); S: inoculación mecánica.

REFERENCIAS

HOOKER, W.J. 1982. Virus diseases of potato. Technical Information Bulletin 19. International Potato Center, Lima, Perú. 17 pp.

RAMAN, K.V. 1985. Transmission of Potato viruses by aphids. Technical Information Bulletin 2. International Potato Center, Lima, Perú. 23 pp.

SALAZAR, L.F. 1982. Virus detection in potato seed production. Technical Information Bulletin 18. International Potato Center, Lima, Perú. 14 pp.

NORDHAM, D. 1973. Identificaction of plant viruses. Methods and experiments. Pudoc, Wageningem, The Netherlands. 204 pp.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU),** constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

3.O DETECCION

3.3 SEROLOGIA

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3 DETECCION /Serología

Fascículo 3.3.1 Introducción a la Serologia

INTRODUCCION

Las características morfológicas de especies de plantas y animales son factores que las ciencias naturales descriptivas utilizan como criterio para una clasificación. Pero desde que la serología desarrolló como disciplina ha sido posible esclarecer las diferencias entre los seres vivientes en base a consideraciones químicas que determinan variaciones en sus estructuras. Se llegaron a estas consideraciones de manera indirecta y no como resultado de estudios hechos en base a la simple observación.

La idea de especificidad se origina en el conocimiento que después de la recuperación de una enfermedad infecciosa existe una cierta resistencia a esta enfermedad en particular (inmunidad), hecho del cual se basó Jenner para la aplicación práctica de su primera vacuna.

La búsqueda de una explicación para este fenómeno permitió el descubrimiento de un grupo peculiar de sustancias en el suero sanguíneo que fueron llamadas anticuerpos. Algunos anticuerpos protegían al organismo de agentes infecciosos (bacterias y virus) o neutralizaban toxinas.

Estas sustancias, ahora definitivamente reconocidas como globulinas modificadas, se forman no solamente como resultado de una infección, sino también como consecuencia de la administración de ciertas sustancias peligrosas de gran peso molecular (toxinas de bacterias, animales y plantas superiores) o de bacterias muertas.

Una de las líneas de investigación en serología y que determina una separación de la pregunta original acerca de la resistencia (inmunidad) a enfermedades, comienza con el descubrimiento de que la inmunización causada por bacterias y toxinas es sólo parte del principio general y que el mismo mecanismo entra en juego cuando materiales inócuos, tales como células o proteínas derivadas de especies ajenas, son inoculadas en animales. En este caso ocurre la aparición de anticuerpos en el suero que causan la aglomeración, destrucción de células o precipitación de estas proteínas.

Todos los inmuno-anticuerpos tienen en común la propiedad de ser específicos, esto significa, literalmente, que reaccionan sólo con un antígeno (el que fue utilizado para la inmunización). Los antígenos pueden ser proteínas, células sanguíneas de una especie diferente , bacterias o virus.

El desarrollo de las ciencias biológicas ha permitido que en la actualidad se utilicen técnicas bioquímicas e inmunológicas en el diagnóstico de diversos males que afectan al mundo contemporáneo, que por ser de mayor

especificidad, precisión y eficiencia han logrado desplazar a los métodos convencionales.

HISTORIA

Edward Jenner (1749-1823) está considerado como el pionero en el uso de vacunas para prevenir enfermedades infecciosas.

Louis Pasteur (1822-1895) estudió diversos métodos para atenuar la virulencia de los patógenos, en base a los cuales se desarrollaron las vacunas.

H. Bence-Jones (1847) descubrió en la orina de pacientes con mieloma múltiple una proteína anormal. La proteína, producida en exceso, era un dímero de cadenas ligeras L.

Paul Ehrlich (1854-1915) descubrió que los anticuerpos se sintetizan en respuesta a la presencia de antígenos y que la inmunidad puede ser transferida de madres a hijos.

George Nuttall (1888) descubrió la propiedad bactericida de la sangre.

Gruber y Durham (1896) demostraron la primera reacción serológica de aglutinación del vibrión del cólera con su respectivo antisuero.

Albert Coons (1942) desarrolló métodos histoquímicos para la detección de patógenos utilizando anticuerpos fluorescentes.

O.Ouchterlony, J.Ondin y S.Elek (1946-1948) describieron las pruebas de difusión en gel para la detección y estudio del virus.

P.Grabar y C.Williams (1953) desarrollaron la técnica de la inmuno-electroforesis.

Alick Isaacs (1957) producción del interferón.

Solomon Berson y Rosalyn Yallw (1959-1960) desarrollaron la radioinmunología.

Rodney Porter (1962) propuso un modelo básico de cuatro cadenas para la estructura de las moléculas de inmunoglobulina.

G. Edelman et al. (1968) pudieron establecer la secuencia aminoacídica completa de un anticuerpo IgG partiendo de la sangre de un paciente con mieloma múltiple.

A. Voller et al. (1976) reportaron la primera detección de tres virus de plantas por la prueba de conjugados enzimáticos (ELISA).

George Kohler y Cesar Miltstein (1981) desarrollaron la técnica de producción de anticuerpos monoclonales.

INMUNOQUIMICA

Los leucocitos o glóbulos blancos son células sanguíneas que tienen como función la defensa del organismo. Existen diferentes tipos de leucocitos, entre los más representativos se encuentran los siguientes:

Monocitos: miden de 15 a 18 um y representan del 0 al 8% del total de leucocitos. Son los llamados macrófagos y se encargan de fagocitar grandes moléculas.

Linfocitos: miden de 8 a 9 um y representan entre el 30 y el 35 %. Intervienen en las reaciones de antígeno-anticuerpo.

Eosinófilos: miden de 12 a 13 um y representan del 0 al 8 % de los componentes sanguíneos. Intervienen en reacciones antígeno-anticuerpo (sobre todo en alergias).

El sistema inmunológico comprende dos tipos de manifestaciones: inmunidad celular e inmunidad humoral. El linfocito es la célula primaria involucrada en este tipo de respuesta. Se ha podido identificar dos poblaciones distintas de linfocitos: células T (Linfocitos T) y células B (Linfocitos B).

Linfocitos T: son responsables de la inmunidad celular; esto es, reactividad cutánea retardada, rechazo a injertos, inmunidad antitumoral y defensa celular contra hongos y agentes patógenos intracelulares.

Linfocitos B: se desarrollan en la bolsa de Fabricio en las aves, pero se cree que derivan de la médula ósea en los mamíferos. Son responsables de la inmunidad humoral que se expresa en la producción de proteínas plasmáticas específicas circulantes llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas.

ANTIGENOS

Las sustancias que pueden inducir una respuesta inmunológica (humoral, celular o mixta de células T y B) cuando son inoculados en un animal se denominan antígenos o inmunógenos. La mayor parte de antígenos son proteínas macromoleculares, pero también pueden ser inmunogénicos, polisacáridos, polipéptidos sintéticos, así como otros polímeros sintéticos.

Para que una molécula sea inmunogénica debe cumplir con ciertos requisitos:

a) Las moléculas deben ser extrañas al hospedero.

b) Las moléculas de peso molecular mayor a 10,000 son débilmente inmunogénicas; proteínas de peso molecular superior a 100,000 son inmunógenos más potentes.

c) La molécula debe poseer un cierto grado de complejidad para ser antigénica. La inmunogenicidad crece con la complejidad estructural. Además, los aminoácidos aromáticos contribuyen más a la inmunogenicidad que los residuos de aminoácidos no aromáticos.

d) La capacidad de responder a un antígeno varía con la especie e incluso con la constitución genética del animal.

DETERMINANTES ANTIGENICOS

La producción de inmunoglobulinas requiere de la unión del antígeno a la superficie del linfocito. Los sitios de combinación sobre la superficie del linfocito consisten en moléculas semejantes a los anticuerpos llamadas receptores de los antígenos. Sólo porciones restringidas de moléculas antigénicas están relacionadas con los sitios de combinación para los anticuerpos. Estas áreas se denominan determinantes antigénicos y ellas determinan la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo. Un determinante antigénico puede comprender sólo 6 ó 7 aminoácidos del total de una proteína, dicho en otras palabras, un virus por ejemplo, induce la producción de una mezcla de anticuerpos que reaccionan con varios de los determinantes antigénicos de las partículas; es así como podemos definir a los antisueros que contienen una mezcla de anticuerpos como "antisueros policlonales". El número de determinantes antigénicos en una sola molécula varía con su tamaño y complejidad.

HAPTENO

Es una molécula pequeña químicamente definida, la cual no puede inducir la producción de anticuerpos específicos contra ella. Sin embargo, cuando se encuentra unida covalentemente a una molécula mayor puede actuar como determinante antigénico e inducir la síntesis de anticuerpos.

ADJUVANTES

Para incrementar la respuesta inmunológica se hace uso de sustancias denominadas adyuvantes. Estas sustancias no sólo estimulan la formación de los anticuerpos, sino que los conservan en forma de depósitos en el lugar de la inyección para su lenta liberación durante el período de síntesis de los anticuerpos, ya sea por adsorción a partículas sólidas, como por incorporación a una emulsión oleosa. Las sustancias más utilizadas son: fosfato de calcio, geles inorgánicos, hidróxido de aluminio, bentonita, albúmina de suero metiolado y adyuvante incompleto de Freund. Este último es el más utilizado con antígenos virales. Consiste en

una emulsión de 9 partes de aceite mineral (lanolina) con una parte de detergente. Esto permite la formación de un emulsificado estable. Si la mezcla además contiene células muertas de *Mycobacterium* sp., se denomina adyuvante completo de Freund.

ANTICUERPOS

Los anticuerpos son inmunoglobulinas producidas por un organismo en respuesta a la invasión de compuestos foráneos tales como proteínas, glúcidos y polímeros de ácidos nucleicos. La molécula de anticuerpo se asocia de forma no covalente con la sustancia foránea iniciando un proceso mediante el cual se elimina la sustancia extraña del organismo.

La molécula del anticuerpo está formada básicamente por cuatro cadenas polipeptídicas que conforman la unidad básica: dos cadenas pesadas (H) idénticas (PM 53 000 a 75 000) y dos cadenas ligeras (L) (PM 23 000) que se encuentran unidas por puentes disulfuro. Existen dos regiones en la molécula del anticuerpo: la fracción común (Fc) y la fracción variable (Fab):

a) Fc: está constituida por una porción de cadenas pesadas (PM 50 000).

b) Fab: esta fracción determina la especificidad de los anticuerpos y está constituida por la otra porción de las cadenas pesadas y por las cadenas ligeras (PM 100 000).

Las inmunoglobulinas compuestas de más de una unidad monomérica básica son llamados polímeros. En base a estudios electroforéticos y de ultracentrifugación se ha podido dividir a las inmunoglobulinas en 5 grupos:

a) IgG : La fracción principal de anticuerpos, comprende al 80% de las inmunoglobulinas. Su peso molecular fluctúa entre 150 000 - 160 000, contiene de 2 a 4 % de carbohidratos y tiene la movilidad electroforética más baja de la inmunoglobulinas. Es la única que es capaz de atravesar placenta.

b) IgA : Tiene un peso molecular de 180,000 a 400 000. Difiere de la IgG en que tiene un contenido superior de carbohidratos (5-10%). La IgA se encuentra en altas concentraciones en la sangre, en las secreciones como el calostro, en la saliva, las lágrimas y en las secreciones de los bronquios y del tubo digestivo. La IgA no atraviesa la placenta.

c) IgM : Es la proteína más grande y aún no ha sido posible determinar su secuencia de aminoácidos. Contiene 576 aminoácidos y tiene un peso molecular de 950 000. Es el primer anticuerpo en ser sintetizado en un animal o ser

Propiedades de la inmunoglobulinas humanas (Harper H. 1980).

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Peso Molecular	150 000	160 000	900 000	180 000	190 000
Coeficiente de sedimentación	6-7	7	19	7-8	8
Concentración en el suero (mg %)	1 000	200	120	3	0,05
Transferencia Placentaria	si	no	no	no	no
Actividad reagínica	?	no	no	no	si
Lisis bacteriana	+	+	+ + +	?	?
Actividad antiviral	+	+ + +	+	?	?

humano recién nacido. Las células que producen IgM se dividen en dos células hijas que producen IgG. Las IgM pueden promover la fagocitosis de microorganismos por los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. No atraviesan placenta.

d) IgD: Ninguna actividad de anticuerpo es atribuida a la IgD; su papel dentro del esquema general de las inmunoglobulinas es aún desconocido.

e) IgE: Está presente en el suero en concentraciones muy bajas. Su peso molecular es de 190 000. Cerca de la mitad de los pacientes con enfermedades alérgicas presentan concentraciones elevadas de IgE.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos específicos a un sólo determinante antigénico del antígeno. Los anticuerpos monoclonales son producidos por células clonadas (hibridomas), resultantes de la unión de un linfocito B, con una célula de mieloma cancerígena. El linfocito le confiere la capacidad de producir anticuerpos y la célula del mieloma la de multiplicarse indefinidamente. Como todas las células clonadas a partir de un hibridoma provienen de sólo un linfocito B, éstas producirán anticuerpos específicos a sólo un determinante antigénico.

REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO

La unión antígeno-anticuerpo es no covalente e irreversible, e incluye puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas y coulombicas. La complementariedad química que se produce semeja a lo que ocurre con una llave y su cerradura.

El área de unión del antígeno con el anticuerpo es de sólo el 1% de la superficie total de la globulina y su especificidad depende de la secuencia de los aminoácidos presentes en esa región. El grado de asociación del antígeno con el anticuerpo depende de las características de cada molécula y es determinado por la suma de los efectos de las interacciones entre ellas. Si la afinidad y la avidez son altos, las moléculas se unirán más rápidamente y la disociación será muy lenta. El antisuero que da reacciones de precipitación más fuertes tiene mayor avidez que otro que reacciona hasta la misma dilución mostrando reacciones pobres.

La afinidad del antisuero depende de:

a) La temperatura a la que se realiza la reacción. A mayor temperatura se produce mayor reacción; sin embargo temperaturas mayores a 40°C producen la desnaturalización de la proteína.

b) La concentración de sales. El bajo contenido de sales favorece la unión de reactantes.

c) El pH. Puede producir cambios en la afinidad antígeno-anticuerpo.

d) La concentración de los reactantes para la formación de precipitados.

PREPARACION DE ANTIGENOS VIRALES

1. Virus que infectan animales

pueden ser propagados en animales de laboratorio, huevos embrionados o en cultivos *in vitro*. La especie animal utilizada para la producción de antisueros debe ser filogenéticamente lo más alejada posible de la especie que normalmente infecta el patógeno. La preparación viral debe contener una alta concentración de virus y éstos deben estar libres de contaminantes del hospedero. Por ejemplo, en el caso de la rabia es necesario usar en las primeras inmunizaciones al virus inactivado.

2. Virus que infectan plantas

pueden ser propagados *in vivo* en las plantas hospederas, que permiten la propagación del virus en sus tejidos, obteniéndose de esta manera una concentración alta de partículas. La dificultad de purificación varía en función al virus y a las plantas usadas como hospederas. En el caso de los virus cuya multiplicación está circunscrita al floema, la concentración que

alcanzan en los tejidos es baja y por lo tanto su purificación es dificultosa.

INMUNIZACION Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS

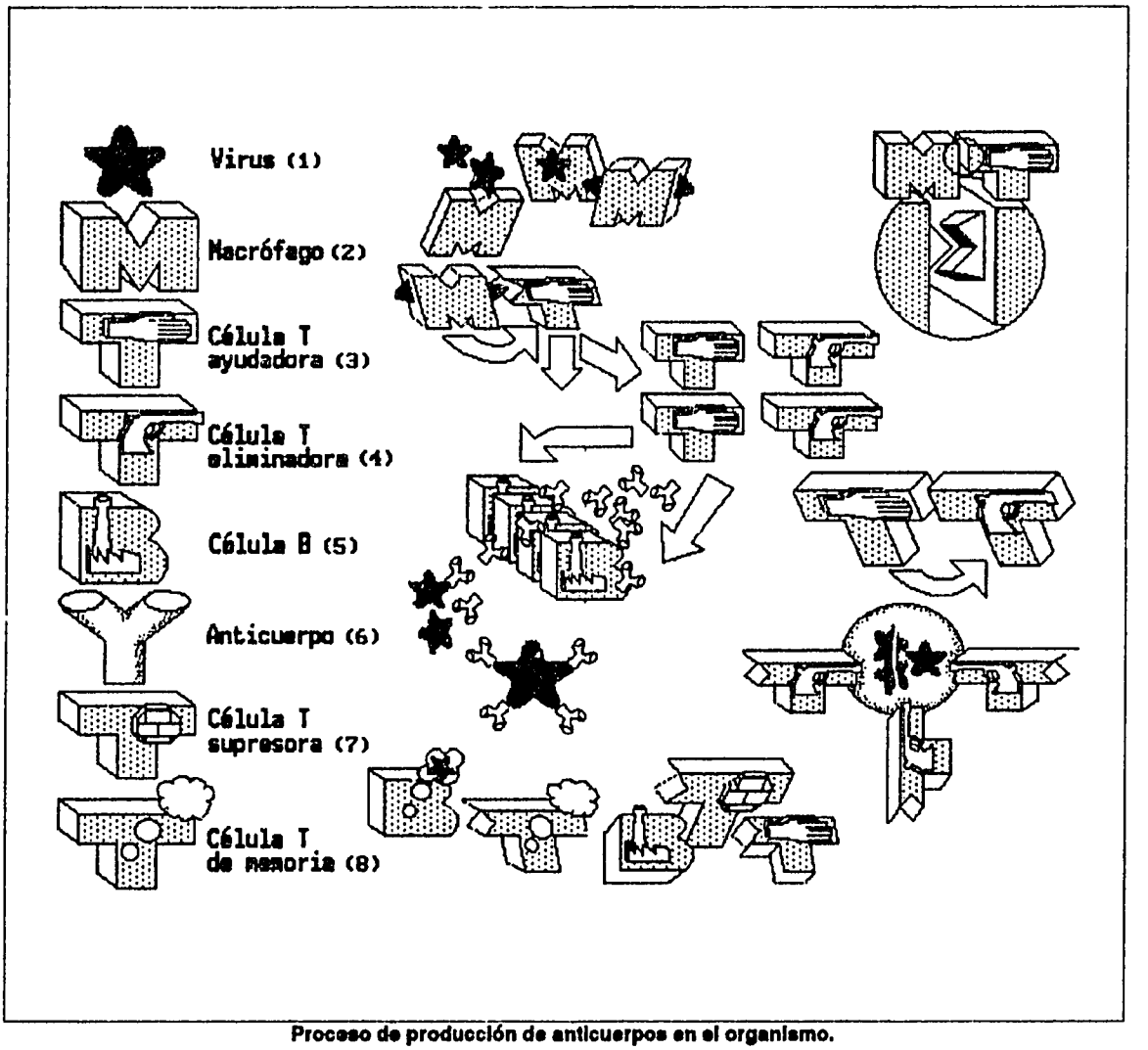
A. Inmunización

Los animales comúnmente utilizados para la producción de antisueros para fines de investigación son conejos, cobayos, ratones, cabras, ovejas, monos, caballos y gallinas. La elección de la especie se hace en base a lo que está disponible y al volumen requerido de antisuero. El mecanismo que regula la síntesis de los anticuerpos y de las reacciones que se producen en las células del sistema inmunológico en presencia de partículas virales es muy complejo y algunos aspectos de este proceso son todavía desconocidos.

Podemos esquematizar el proceso de inmunización de la siguiente manera:

1. Cuando los virus (1) ingresan al organismo, algunos de ellos son consumidos por las células macrófagas (2).

2. Algunos de los millones de linfocitos T de ayuda (3), que se encuentran normalmente cir-



Proceso de producción de anticuerpos en el organismo.

culando por el sistema sanguíneo, son activados para identificar al nuevo enemigo, en este caso una partícula viral. Esta célula se activa uniéndose al macrófago que ha atrapado a la partícula. La unión se produce cuando el linfocito T reconoce en el macrófago un marcador propio y uno correspondiente al antígeno.

3. El linfocito T de ayuda así activado se multiplica, y éste a su vez estimula la multiplicación de los linfocitos T eliminadores (4) y de los linfocitos B (5).

4. Cuando los linfocitos B se han multiplicado (alrededor de un millón de líneas diferentes), el linfocito T de ayuda le indica que inicie la producción de una gran cantidad de anticuerpos (6) que circulan por el torrente sanguíneo.

5. En el caso de los virus que causan infección en ese organismo, algunas partículas ingresan a las células para iniciar su propia multiplicación. Los linfocitos T eliminadores producen daño químico en la membrana de las células infectadas; interrumpiendo la replicación viral.

6. Algunos anticuerpos que se han sintetizado neutralizan a las partículas virales restantes.

7. Cuando la infección se detiene, el linfocito T supresor (7) suspende todas las actividades del sistema inmunológico, evitando de esta manera que se produzcan reacciones descontroladas.

8. Los linfocitos T y B de memoria (8), almacenan la información sobre las partículas virales y permanecen en el sistema sanguíneo y linfático. De esta manera quedan listos para movilizarse e iniciar la reacción inmunológica si las mismas partículas virales invaden el organismo.

B. Vías de inmunización

Puede ser intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradermal, intra-articular e intranodular, pudiendo considerarse ésta como una serie en orden creciente de efecto estimulatorio de la respuesta inmunológica.

C. Producción de antisueros

La producción de anticuerpos se incrementa durante los días subsiguientes a la fecha de la primera inmunización hasta alcanzar una concentración máxima, que puede mantenerse por algunos días. Si se inyecta una nueva dosis del antígeno, la síntesis de anticuerpos se incrementa rápidamente, alcanzando una concentración superior a la producida con la primera dosis del antígeno.

Los anticuerpos se encuentran en el suero sanguíneo de los animales inmunizados y este suero se denomina antisuero.

Después de la colección de la sangre, ésta se deja en reposo para separar el suero de los otros componentes de la sangre. El suero se centrifuga (7840 g x 15 min) para remover los residuos que no se han separado y se almacena congelado (-20°C a -70°C), liofilizado, o en forma líquida a 4°C mezclado con un antiséptico.

Los sueros almacenados adecuadamente pueden permanecer activos por muchos años. El antisuero está compuesto por una mezcla de anticuerpos denominados inmunoglobulinas (Ig).

TECNICAS DE INMUNODIAGNOSIS

A. Pruebas de precipitación

La precipitación de los antígenos y de los anticuerpos se produce cuando estas dos sustancias reaccionan entre sí formando una estructura en forma de enrejado. Esta estructura excluye a las moléculas de agua (reacción hidrofóbica), precipitándose. Para que la estructura de enrejado se forme es necesario

que la concentración de los reactantes sea proporcional. Es decir por cada molécula de antígeno se requiere un número determinado de anticuerpos.

En general los anticuerpos actúan como moléculas bivalentes y los antígenos como moléculas multivalentes. Cuando hay un exceso de anticuerpos, éstos se comportan como moléculas monovalentes que reaccionan sólo con una partícula del antígeno y no es posible la formación de la estructura de enrejado. Cuando hay un exceso de antígenos, tampoco se forma la estructura de enrejado porque éstos actúan sólo como moléculas monovalentes. En ambos casos, la reacción antígeno-anticuerpo no puede ser observada.

1. Prueba del anillo de interfase (Ascoli, 1902).

Se utilizan antígenos y anticuerpos en solución. Sobre un volumen determinado de anticuer-pos se coloca una cantidad proporcional de la muestra que contiene el antígeno. La preci-pitación se produce en la interfase y el plano de precipitación da la ilusión de un anillo.

2. Prueba de precipitación líquida en tubos.

Utilizado principalmente para determinar el título de los antisueros y la concentración del antígeno. Es una prueba cuantitativa. En esta prueba varias diluciones (dobles) del antisuero y del antígeno se mezclan e incuban en dos pequeños tubos de prueba para la formación de precipitados. Los diversos grados de precipitación permiten determinar la concentración de los reactantes.

3. Prueba de microprecipitación.

En esta prueba, gotas individuales de cada uno de los reactantes se colocan en la base interna de una placa Petri. La placa se coloca en agitación para permitir la mezcla del anticuerpo con los antígenos. Se le da un período de incubación para la formación del precipitado. La reacción puede ser observada con ayuda de un microscopio estereoscópico.

B. Pruebas de difusión en gel

Son pruebas de precipitación que se realizan utilizando generalmente geles de agar o agarosa.

La ventaja de este tipo de pruebas es que la mezcla del antígeno con su correspondiente anticuerpo puede ser físicamente separada debido a los diferentes coeficientes de difusión en el gel de sus componentes. De esta manera, estas pruebas pueden proporcionar información sobre la homogeneidad y la pureza de los reactantes, así como del tamaño y de la relación entre los antígenos.

1. Inmunodifusión simple (Oudin, 1946).

Se basa en el uso de anticuerpos inmovilizados en una matriz de agar o agarosa fundida en un baño de agua a 50°C y preenfriada para su uso y dispuesta en tubos de 10 x 75 mm o más pequeños. El antígeno puede difundir a través del agar, apareciendo entonces una zona o banda que migra a través del tubo hasta que concentración de ambos reactantes se encuentra en estado óptimo. En este punto se produce la precipitación.

Algunos de los factores que afectan la migración de las bandas son la concentración del antígeno y el coeficiente de difusión, que depende del peso molecular y del tamaño de la molécula de antígeno. Podemos observar que a menor tamaño y peso molecular, el coeficiente de difusión es mayor. La distancia de migración de la banda de difusión también depende del tiempo, tipo, calidad y concentración del anticuerpo.

2. Inmunodifusión doble (Ouchterlny, 1948).

a) Sistema de dimensión simple. En esta prueba entre la soluciones de antígeno y de anticuerpo se coloca una zona neutral de agar. Se aplican los mismos principios de la técnica

de difusión simple de Oudin, con la única diferencia de que ambos reactantes son difundibles. Cuando ambos reactantes se encuentran se forma una línea de precipitación. La posición y el grosor de la banda permite calcular la concentración de cualquiera de los reactantes.

b) Sistema de doble dimensión. Se preparan placas o láminas porta objetos recubiertas con agar neutro solidificado, en una concentración de 0,7 a 1,5%. Se desarrollan moldes o patrones de hoyos, dependiendo de los objetivos de la prueba y se colocan el antígeno y el anticuerpo en hoyos separados.

Reacción de identidad: La fusión de las líneas de precipitación se produce cuando los dos antígenos son idénticos. Se forma una barrera compacta: la barrera inmunoespecífica.

Reacción de no identidad: En este caso la difusión varía y los arcos de precipitación no actúan como barreras para los antígenos que no están relacionados y se entrecruzan.

Reacción de doble identidad parcial: En este caso se produce una doble identidad parcial entre antígenos (los dos antígenos son casi iguales con diferencias en sólo algún determinante antigénico).

Reacción de identidad parcial: Es cuando observamos la formación de una "espuela" que indica identidad parcial entre los antígenos (por ejemplo cuando se trata de "strains" del mismo virus.

3. Inmunoelectroforesis (Grabar & Williams, 1953).

Esta técnica es una de las herramientas analíticas más importantes para resolver mezclas complejas de antígenos. Se basa en la movilidad electroforética y la especificidad antigénica. La mezcla de antígenos es primero separada en sus componentes por electroforesis en un gel de agar. Luego en un canal paralelo, o vía de migración electroforética, se coloca el antisuero, lo que permite el desarrollo de líneas de precipitación. Se utilizan generalmente buffers alcalinos de pH entre 7,5 y 8,6, pues bajo estas condiciones las proteínas se cargan negativamente y se mueven hacia el ánodo. Una de las aplicaciones incluye la caracterización de los virus y la diferenciación de "strains".

C. Pruebas de aglutinación

La principal diferencia entre las pruebas de precipitación y de aglutinación es que en este último caso, el antígeno es muchas veces más grande que el anticuerpo, y es por esta razón, que muy pocas moléculas de anticuerpo son necesarias para formar una agrupación visible de las partículas. Los fundamentos de la reacción son similares a los de las pruebas de precipitación.

1. Aglutinación pasiva (indirecta o reversa).

Se basa en el uso de sustancias que actúan como transportadoras inertes de antígenos o anticuerpos. El tamaño de estas sustancias (esferas de látex, bentonita) es varias veces superior al de los reactantes. De esta manera es posible usar antígenos solubles (partículas virales) en pruebas de aglutinación.

2. Prueba de látex.

Se basa en el uso de esferas de poliestireno (1,1 um) recubiertas de moléculas de inmunoglobulinas. La sensibilidad de esta técnica es 10 a 100 veces mayor que la de las pruebas clásicas de microprecipitación para la detección de los virus de plantas. La reacción puede ser observada a simple vista.

3. Pruebas de neutralización.

La interacción de antígenos biológicamente activos con anticuerpos homólogos produce en algunos casos la pérdida de la actividad biológica del antígeno. Esta reacción se denomina en general "neutralización". Su sen-

sibilidad depende fundamentalmente de la actividad del antisuero y es necesario que el antígeno tenga actividad biológicamente detectable.

D. Pruebas inmunológicas con marcadores

Estas pruebas hacen uso de anticuerpos y antígenos marcados con sustancias que tienen actividad propia y amplifican el poder de la prueba, incrementando su sensibilidad.

Generalmente a mayor actividad del marcador, más rápidamente puede ser detectada la reacción antígeno-anticuerpo.

1. Inmunofluorescencia (IFA).

Se basa en el uso de sustancias que transforman la luz de rango ultravioleta (200 a 400 nm) en radiaciones de mayor longitud de onda y que con la ayuda de un microscopio modificado (microscopio de fluorescencia) es posible ver la luz emitida por la sustancia fluorescente (Fluoresceína Isocianato (FITC)).

2. Radioinmunología.

Se basa en el uso de sustancias radioactivas (^{32}P, ^{128}I) como marcadores de las inmunoglobulinas. Su presencia se determina al reaccionar frente al material fotográfico.

3. Ensayos inmunológicos con conjugados enzimáticos (ELISA, "Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay").

Se basa en la propiedad de algunos antígenos y anticuerpos de ser adsorbidos a un medio sólido que les permita construir una secuencia ordenada de material biológico (anticuerpo, antígeno , anticuerpo conjugado con enzima) y que puede ser visualizada por la reacción de color que se produce al agregar el sustrato específico para la enzima que se encuentra conjugada al anticuerpo, permitiendo así una adecuada cuantificación del antígeno.

Las tres variantes más comunes de estos ensayos, que pueden ser utilizadas según las necesidades del investigador, son:

- DAS-ELISA ("Double Antibody Sanwich"),
- NCM-ELISA ("Nitrocellulose Membranes") y
- PNC-ELISA ("Penicillinase").

E. Inmunomicroscopía electrónica (IEM)

Es utilizado para la detección del antígeno en suspensión o en secciones ultrafinas de tejido infectado con virus.

Cuando el virus está en la suspensión, la reacción positiva puede ser reconocida con ayuda del microscopio electrónico:

1. Agregación de partículas virales.

Se prepara una mezcla de antisuero específico en dilución adecuada para la detección del virus supuestamente presente en la suspensión del tejido. Como resultado de la agregación de partículas, se forman complejos que pueden ser visualizados en el microscopio electrónico.

Esta técnica es especialmente útil si la concentración de virus es muy baja para ser observada directamente. Si existiese un exceso de anticuerpos, se producirá inhibición de la reacción, como ocurre en las pruebas de precipitación.

2. Recubrimiento con anticuerpos.

Se basa en la inmovilización de las partículas virales en el grid y su posterior recubrimiento con anticuerpos específicos.

3. Captura de antígenos.

Se realiza de manera inversa al método anterior, es decir, el grid se encuentra previamente recubierto con anticuerpos específicos.

REFERENCIAS

BALL, Ellen M. 1974. Serological Test for the identification of plant viruses. Published by The American Phytopathological Society Inc., Plant Virology Committee, USA.

DEVLIN,T.M. 1985. Textbook of Biochemistry with Clinical correlations. John Wiley & Sons Inc. New York.

HARPER, H.A. 1980. Manual de Química Fisiológica. Séptima Edición, Editorial El Manual Moderno S.A. México.

LANDSTEINER, Karl. 1969. The specificity of serological reactions. Dover Publications, Inc. New York, USA.

LEHNINGHER, A. 1978. Biochemistry. Second edition, Worth Publishers, Inc. New York, USA.

NAKASHIMA, J. 1988. Separata de Virología: Virología e Inmunodiagnosis. Curso de Virología 1988. Centro Internacional de la Papa, CIP. Lima, Perú.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3 DETECCION/Serología

Fascículo 3.3.2 Producción de Antisueros

La elección de los animales para las inmunizaciones es determinada por cuatro consideraciones básicas:

a) la especie de la cual el antígeno es aislado,
b) la necesidad de anticuerpos policlonales o monoclonales,
c) la cantidad de antígeno disponible, y,
d) la cantidad de antisuero necesario.

Comúnmente se utilizan conejos, ratones, ratas, hamsters o "Guinea pigs", según las necesidades del investigador (ver cuadro 1).

En el proceso de producción de antisueros policlonales en el CIP se utiliza como animal de experimentación al conejo. El procedimiento consta de las siguientes etapas:

Animal	Volumen máximo de antisuero (ml) obtenido	Posibilidad de producción de anticuerpos monoclonales	Observaciones
Conejo	500	No	Es la mejor elección para la producción de anticuerpos policlonales, aun cuando el antígeno sea un factor limitante.
Ratón	2	Sí	Ofrece la mejor producción de anticuerpos monoclonales.
Rata	20	Sí	Es una buena elección para la producción de anticuerpos monoclonales.
Hamster	20	No	Buena elección para la producción de anticuerpos policlonales cuando el antígeno es un factor limitante.
"Guinea pig"	30	No	Difícil de sangrar.

Cuadro 1. Elección del animal.

a) Primera inmunización: intradermal múltiple (esperar 4 semanas).

b) Sangrado: para probar la efectividad del antisuero y obtener su título.

c) Segunda inmunización: intramuscular (aplicar los refuerzos necesarios).

PROCEDIMIENTO

1. Preparación del inmunógeno

solución amortiguadora fosfato 10 mM	0,5 ml
virus purificado	20-200 ug
adyuvante de Freund*	0,5 ml

*completo o incompleto

Mezclar el virus en solución amortiguadora fosfato 10 mM y adicionar el adyuvante de Freund. Agitar vigorozamente durante 5 minutos utilizando un agitador de tubos (vórtex) hasta obtener una suspensión densa y uniforme. Es conveniente mantenerlo sobre hielo para evitar su degradación.

2. Inoculación

Rasurar un área en el dorso de un conejo lo suficiente extensa para 30 a 40 sitios de inoculación de aproximadamente 10 ul de inmunógeno cada uno.

Utilizando una jeringa de 1 ml y una aguja 26. 3/8", inocular intradermalmente ambos lados del dorso, tomando como referencia a la columna vertebral. Tomar las precauciones necesarios para evitar una posible infección en la zona inoculada.

3. sangrado

A partir de la cuarta semana después de la primera inoculación, se procede a realizar un primer sangrado para comprobar el título (especificidad) del antisuero producido. El título se determina utilizando la prueba de microprecipitación descrita más adelante.

Vía	Abreviatura	Volumen máximo	Adyuvante	Requerimiento del inmunógeno	Observaciones
Subcutánea	sc	800 ul por sitio	si/no	soluble o insoluble	Fácil de inocular.
Intramuscular	im	0,5 ml	si/no	soluble o insoluble	Liberación lenta.
Intradermal	id	100 ul por sitio	si/no	soluble o insoluble	Inoculación difícil, liberación lenta.
Intravenosa	iv	1 ml	no	soluble, detergentes iónicos y no iónicos*	No es efectiva para inmunizaciones primarias
Intraperitoneal	ip	*No es recomendable en conejos.*			

* < 0,2%, sales < 0,3M úrea < 1M.

Cuadro 2. Principales vías de inmunización en conejos.

Colocar al conejo en una caja apropiada para inmovilizarlo durante el sangrado. Tomar una oreja y localizar la vena marginal (si ésta no fuera visible, acercar una lámpara de luz para calentar la oreja).

Razurar la oreja con la ayuda de un bisturí de tal manera que quede limpia y libre. Practicar un corte en un ángulo de 45° (nunca transversalmente) y asegurarse que el corte sea profundo. Colectar la sangre en un tubo limpio. El máximo de sangre colectado por vez debe ser de 30 ml.

El flujo de sangre puede ser detenido realizando una leve presión en el corte con la ayuda de un pedazo de gasa estéril. Aplicar la presión durante 10 a 20 segundos y verificar que el flujo se haya detenido.

Nota: Una vez obtenido un buen título del antisuero, conviene aplicar refuerzos ("boosts") regularmente y colectar la máxima cantidad de antisuero. Los refuerzos deben realizarse cada 6 semanas y la colección de sangre 10 días después de cada refuerzo.

4. Prueba de microprecipitación

La prueba de microprecipitación se utiliza para conocer el título y la especificidad del antisuero crudo.

a) Materiales:

-placas petri
-recipiente plástico con tapa
-lápiz de cera y regla
-tubos de prueba de tamaño adecuado
-pipetas de 1 ml
-jeringa hipodérmica
-antisuero
-hojas de plantas sanas e infectadas
-centrífuga de baja velocidad
-agitador rotatorio
-solución salina (NaCl al 0,85%)

b) Preparación de las muestras:

Pesar las muestras (es preferible un poco más de 1 g), hacer una dilución 1/1 (p/v) con solución salina y macerar con ayuda de un rodillo o un tubo de ensayo.

Colectar el macerado en un tubo y centrifugar a 5 000 rpm durante 5 minutos. Separar el sobrenadante en tubo de ensayo.

Preparar una serie de 12 tubos de ensayo que contengan 1 ml de solución salina cada uno y rotularlos con las diluciones correspondientes (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64,1/128, 1/256, 1/512, 1/1 024, 1/2 048, 1/4 096).

Agregar 1 ml de sobrenadante al primer tubo y mezclar bien. Transferir 1 ml de este tubo al segundo y así sucesivamente hasta terminar con los 12 tubos.

c) Preparación del antisuero:

Preparar una serie de 12 tubos con 1 ml de solución salina y rotularlos como en el caso anterior.

Agregar 1 ml de antisuero al primer tubo, mezclar bien y transferir 1 ml de este tubo al segundo tubo, y así sucesivamente hasta terminar con todas las diluciones

d) Prueba de microprecipitación:

Con ayuda de un lápiz de cera trazar líneas perpendiculares formando una cuadrícula en una placa petri. Identificar la orientación de la placa y hacer el esquema que se muestra en la página siguiente.

Agregar con la jeringa hipodérmica una pequeña gota de cada una de las diluciones del antisuero y del antígeno en el centro de cada recuadro, de tal manera que cada dilución de

antisuero sea chequeada con cada dilución de la muestra sana e infectada.

Colocar las placas en agitación rotativa a 100 rpm durante 15 minutos.

Incubar las placas en una cámara húmeda o en un recipiente grande con tapa que contenga papel humedecido con agua.

Realizar la primera lectura a las 2 horas. Observar las reacciones en el cuarto oscuro con ayuda de un estereoscópio de iluminación lateral. La formación de precipitado indicará reacción positiva.

Registrar las lecturas y realizar una segunda lectura a las 24 horas.

REFERENCIAS

MATTHEWS R.E.F. 1957. Plant Virus Serology, Cambridge University Press, Church Army Press. Cowley, Oxford.

NOWOTNY, A. Basic Exercises in Inmunochemistry. A Laboratory Manual. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

HARLOW, E. y D. LANE. 1988. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Ag \ Ab	1	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/1	1/2	1/512	1/10	1/20	1/4096
1/2												
1/4												
1/8												
1/16												
1/32												
1/64												
1/128												
1/256												
1/512												
1/1 024												
1/2 048												

Esquema para la la colocación de las diluciones de antisuero crudo y muestras en la prueba de microprecipitación. Ag: antígeno (muestras); Ab: antisuero.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3 DETECCION/ Serología

Fascículo 3.3.3 Purificación y Conjugación de Antisueros

La sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas de detección de virus, tales como DAS y NCM ELISA, látex, microprecipitación, etc., requieren de anticuerpos y anticuerpos conjugados específicos, es por ellos, que los métodos de purificación de antisueros deben ser adecuados para cada virus en particular. Este capítulo pretende mostrar algunas alternativas para el procesamineto de antisueros.

PURIFICACION DE IgG

1. Tomar 1 ml de antisuero crudo y añadir 9 ml de agua destilada en tubo de centrífuga con capacidad para 30 ml.
2. Agregar gota a gota y bajo agitación 10 ml de sulfato de amonio saturado; dejar en reposo por espacio de 45 minutos a temperatura ambiente.
3. Precipitar las proteínas centrifugando durante 15 minutos a 13 249,6 g y a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado "pellet" en 1 ml de solución amortiguadora de dializado.
5. Colocar la muestra resuspendida en tubos de diálisis y hacer la identificación de cada muestra.
6. Dializar a 4°C contra solución amortiguadora de dializado haciendo 3 cambios de 500 ml cada uno.
7. Tomar viales previamente tratados con silicona y rotularlos con la siguiente información: IgG (virus), código del animal de experimentación usado, volumen, fecha de sangrado y concentración.
8. Hacer una dilución apropiada de la globulina y leer su absorbancia a 280 nm a fin determinar la concentración exacta por fotometría (1mg/ml corresponde a A_{280} = 1,4).
9. Hacer los cálculos correspondientes y almacenarlo a 4°C.

Alternativa de purificación

7* Preparar una columna de DEAE Sephacel de 3,5 ml de volumen total, equilibrado con solución amortiguadora de dializado .

8* Lavar la columna varias veces con buffer de dializado que es utilizado también como solución amortiguadora de elución.

9* Aplicar la fracción dializada y colectar fracciones de 0,5 ml, medir la concentración de las fracciones a 280 nm.

Preparación de Columnas cromatográficas.

DEAE Sephacel es una columna que se utiliza para la purificación de IgG (se requiere una columna de 3,5 ml de volumen). El modo de empleo de la columna cromatográfica Sephacryl S-300 se encuentra descrito en el método de conjugación CIP-Gugerli (25 mm x 200 mm).

En cada caso podemos encontrar que el gel contiene un preservante (etanol o timerosal).

Este preservante debe ser removido para lo cual se debe "lavar" el gel con el doble del volumen solución amortiguadora de elución correspondiente varias veces. Esto permite que el gel adopte las características requeridas para su uso (pH, fuerza iónica, etc.; estos requerimientos pueden variar según el caso).

Después de estabilizar el gel a las condiciones de uso, el gas debe ser eliminado tanto en la solución amortiguadora de elución como en el gel equilibrado para evitar la presencia de burbujas de aire. Esto se consigue con agitación lenta y mediante la ayuda de una bomba de vacío.

El montaje de la columna es sencillo: tomar el volumen requerido y verificar la altura que esta columna alcanzará de acuerdo a lo requerido para cada caso, hacer las marcas necesarias, tener cuidado de que la columna esté perfectamente perpendicular a la superficie de la mesa de modo que el desplazamiento de la muestra sea uniforme. Llenar la columna cerrando el drenaje inferior y verter suavemente el gel que está previamente equilibrado y degasificado para evitar la formación de burbujas.

Al empacar la columna no permitir que en ningún momento ésta se seque, pues se producirían grietas internas que pueden interferir con el flujo normal.

El flujo está especificado para cada caso. Por lo general un flujo lento evita que la columna se empaque en demasía y pierda sus características óptimas. Por lo general, un flujo de 10 a 20 ml por hora es suficiente. Una vez empacada, la columna se lava varias veces con solución amortiguadora de elución para asegurar que el preservante ha sido removido completamente .

Para colocar la muestra es necesario utilizar como volumen de muestra máximo el 5% del volumen total de la columna y detener momentáneamente el flujo.

Antes de colectar las muestras se debe seleccionar el volumen de las fracciones. Los tubos deben ser numerados y su absorbancia debe ser leída a 280 nm para determinar la concentración de proteínas (indicada por la presencia de "picos").

PREPARACION DE IgG CONJUGADO A LA ENZIMA

1. Método CIP

1. Mezclar 1 ml de IgG (1mg/ml) con 2 500 unidades de fosfatasa alcalina (contenidos en un volumen adecuado).

2. Adicionar 20 ul de la solución de glutaraldehído por cada mililitro de IgG. Mezclar bien evitando la formación de espuma.

3. Dejar en reposo a temperatura ambiente por 2 horas.

4. Dializar a 4°C en 1 litro de solución amortiguadora fosfato salina (PBS) con 0,1 % de glycine. Realizar 4 cambios de solución amortiguadora.

5. Hacer un último dializado con solución amortiguadora fosfato salina (PBS) con $MgCl_2$ 1 mM y $ZnCl_2$ 1 mM.

6. Verter el contenido de las bolsas de diálisis en un vial previamente siliconizado (enjuagado con agua destilada).

7. Añadir 5 mg de BSA (albúmina de suero bovino) por cada mililitro de dializado y unos granos de azida de sodio como preservante.

8. Almacenar a 4°C

2. Método CIP-Gugerli

Este método difiere del procedimiento original en que:

a) Al purificar IgG se obvia el paso a través de la columna de DEAE-Sephacel después de dializar, como propone Gugerli, y previo a la conjugación.

b) A diferencia del método empleado por el CIP para la conjugación enzimática, Gugerli no dializa, de esta manera el proceso se hace más breve (3 horas).

1. Diluir 3 000 unidades de fosfatasa alcalina en 0,6 ml. desolución amortiguadora de conjugado.

2. Añadir 5 ul de glutaraldehído al 25% (sin diluir) y mezclar fuertemente.

3. Incubar a 25°C por 50 minutos.

4. Añadir 0,75 ml de IgG de una concentración de 1 a 2 mg/ml y mezclar fuertemente.

5. Incubar a 25°C por 70 minutos.

6. En un recipiente con hielo añadirle sucrosa 50 g/l mezclarlo bien y colocarlo en una columna de cromatografía en gel Sephacryl S-300 (25 mm x 200 mm previamente equilibrada) con solución amortiguadora Tris/HCl pH 8,0.

7. Eluir con la misma solución Tris/HCl, colectar fracciones de 2 ml y medir la concentración de proteínas a 280 nm. El anticuerpo conjugado con la enzima eluirá como primera fracción; luego se observará la posterior elución de anticuerpo y enzima sin reaccionar.

8. Separar las fracciones del conjugado eluido en alícuotas de 15 ml y añadir a cada una 5 mg/ml de BSA.

9. Almacenar a 4°C.

TITULACION DE INMUNOGLOBULINAS

El propósito de la titulación de anticuerpos y de anticuerpos conjugados con enzimas es determinar la dilución apropiada para su uso en los ensayos inmunológicos.

Deben prepararse las siguientes diluciones:

a) IgG (1 mg/ml) en solución amortiguadora de cobertura; 1/100, 1/1 000 y 1/10 000.

b) IgG-conjugado en solución amortiguadora de conjugado; 1/200, 1/800 y 1/3 200.

c) Savia de plantas infectadas en solución amortiguadora de maceración; 1/10, 1/100 y 1/1 000.

d) Savia de plantas sanas en solución amortiguadora de maceración; 1/10 y 1/100.

Para la distribución de las diluciones en la placa de ELISA se utiliza el esquema descrito en esta página.

Nota: Los hoyos de los bordes que no se utilizan (por el riesgo de que se produzcan reacciones inespecíficas) se llenan con la solución amortiguadora correspondiente a cada etapa de la prueba .

APENDICE

1. Preparación de soluciones

1. Solución amortiguadora fosfato salina (PBS) 10 mM pH 7,4

0,2 g KH_2PO_4
2,9 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$
8,0 g NaCl (137 mM)
2,0 g KCl (2,7 mM)
0,2 g NaN_3 (3 mM)

2. Solución amortiguadora de dializado 5 mM pH 7,4 (PBS 1/2):

0,1 g KH_2PO_4 1,45 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ 4,0 g NaCl (69 mM) 1,0 g KCl (1,4mM) 0,1 g NaN_3 (1,5mM)

3. Sulfato de amonio saturado:

En 1 litro de agua destilada caliente disolver poco a poco 750 g $(NH_4)2SO_4$. Una vez que esté todo disuelto colocarlo en un frasco de plástico y dejar enfriar a temperatura ambiente

4. Solución de Glutaraldehido:

Se hace una dilución 1/10 del Glutaraldehído al 25% con solución amortiguadora fosfato salina (PBS). Mantener a menos de 0°C.

5. Solución amortiguadora TRIS/HCl pH 8.0:

6,6 g Tris (55 mM) 0,2 g $MgCl_2$ (1 mM) 5,8 g NaCl (0,1 M) 1,0 g NaN_3 (15 mM) Llevar a pH 8,0 con HCl 37%

Nota importante:

La presentación de la enzima se puede dar en:

1. Solución de sulfato de amonio. En tal caso es necesario hacer un paso previo de diálisis con 2 cambios de solución amortiguadora de dializado antes de utilizarla para la conjugación

2. Solución salina de NaCl. En este caso puede ser utilizada de manera directa sin el paso previo.

En la etiqueta de la enzima se encuentra ordinariamente la siguiente información, que puede variar según el lote y el proveedor:

(a) Número aproximado de unidades de enzima contenidas en el frasco: 5 000 units (Glycine, pH 10,4).

(b) Volumen contenido en el frasco: 0,47 ml.

(c) Concentración de proteínas contenidas en el frasco y expresada en mg prot./ml: 9,3 mg prot./ml (Biuret).

(d) Unidades de enzima por mg de proteína para el sistema Glycine, pH 10,4: 1 360 units/mg prot.

(e) Unidades de enzima por mg de proteína, para el sistema Diethanolamine, pH 9,8: 2 870 units/mg prot. Con estos datos podemos obtener:

1. Unidades totales contenidos en el frasco.

Para el sistema Glycine pH 10,4:

1 360 unidades = 1 mg prot. X = 9,3 mg prot.

En el frasco sólo tenemos 0.47 ml. por lo tanto:

1,0 ml = 12 648 unidades 0,47 ml = Y

Para el sistema Diethanolamine pH 9,8

2 870 unidades = 1 mg prot. X = 9,3 mg prot.

En el frasco sólo tenemos 0,47 ml por lo tanto:

1,0 ml = 26 691 unidades 0,47 ml = Y

2. Determinación de volumen a utilizar para el método de conjugación

En el sistema DAS-ELISA se utiliza solución amortiguadora dietanolamina pH 9,8. Por lo tanto requerimos:

- 1 mg/ml de IgG y
- 2 500 unidades de enzima para la conjugación.

12 544,77 unidades = 470 ul 2 500 unidades = X

2. Reactivos

1. Phosphatase alkaline from calf intestine for enzime inmunoassay. Cat.567 752. Boehringer Manheim GmbH. or Phosphatase, alkaline from bovine intestinal mucose, Type VII-NT Cat.P-0405. Sigma Chemical Company.

2. Glutaraldehyde 25% aqueous solution. Grade 1. Specially purified. Cat. G-5882. Sigma Chemical Company.

3. Glycine. Essentially ammonia free. Cat. G-7126. Sigma Chemical Company.

4. Albumin Bovine. 98-99% albumin. Essentially fatty acid-free. Cat.A-7030. Sigma Chemical Company.

5. Sodium Azide. Cat. S-2002. Sigma Chemical Company.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3 DETECCION /Serología

Fascículo 3.3.4 Prueba de Doble Difusión en Gel (OUCHTERLONY)

En la prueba de doble difusión en gel (Ouchterlony) se utilizan geles de agar en los que se colocan preparaciones de antígenos virales y de anticuerpos específicos en hoyos adyacentes. Las relaciones serológicas entre virus se pueden determinar con mayor exactitud que con cualquier otro método, a excepción de la inmuno-electroforesis, debido a que el número de bandas de precipitación producidas entre hoyos opuestos de reactantes corresponde al número de componentes antigénicos de un sistema antígeno-anticuerpo dado. Sin embargo, esta prueba es una de las menos sensibles entre los métodos serológicos ya que la formación de bandas de precipitado requiere de concentraciones altas y equivalentes de antígenos y anticuerpos específicos.

Procedimiento

Los materiales que se requieren para llevar a cabo la prueba de doble difusión en gel (Ouchterlony) son los siguientes:

- Agarosa
- Azida de sodio (NaN_3)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Agua destilada
- Placas petri de plástico de 100 x 15 mm
- Sacabocado de 5 mm de diámetro
- Tubos de prueba
- Bulbo de goma
- Pipetas pasteur y bulbo
- Cuadrados de gasa (2,5 cm^2)
- Plumón o lápiz de cera
- Erlenmeyer de 125 ml y 250 ml
- Probeta de 100 ml
- Mechero
- Bomba de vacío
- Kitasato de 125 ml

1. Preparación del gel

0,8 g de agarosa 0,2 g de NaN_3* 100 ml de agua destilada * Manipular con cuidado porque es altamente tóxico.

Colocar la agarosa y el agua en un erlenmeyer y cubrirlo con algodón. Calentar en baño maría hasta que la agarosa se disuelva. Enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 40°C.

Agregar con cuidado el azida de sodio y mezclar bien evitando la formación de burbujas. Verter 15 ml de la preparación en cada placa petri y cubrirlas parcialmente hasta que se enfríen. Limpiar el agua que se condense en las tapas.

2. Preparación de las muestras

Macerar las hojas en un mortero y reunir el macerado a un lado. Colocar encima un trozo cuadrado de gasa humedecida con agua.

Presionar fuertemente con el pilón inclinando el mortero y retirar el jugo con una pipeta pasteur. Transferirlo a un tubo de prueba previamente codificado.

3. Preparación del antisuero

Preparar una dilución apropiada del antisuero en solución salina. Si no se conoce la dilución óptima es preciso hacer una titulación previa (utilizar diluciones 1/2, 1/4, 1/16, 1/32, etc.).

Solución salina:

0,85 g de NaCl
100 ml de agua destilada
Mezclar bien

4. Preparación de la placa de prueba

a) Con el sacabocado se practican hoyos en el gel siguiendo el patrón deseado. Normalmente se utiliza un sacabocados de 5 mm de diámetro y una distancia de 3 mm entre hoyo y hoyo. Los discos de agarosa se retiran mediante un sistema de vacío (una pipeta pasteur conectada a un erlenmeyer kitasato y a una bomba de vacío mediante una manguera). Si no se dispone de este equipo, se puede utilizar una aguja de disección.

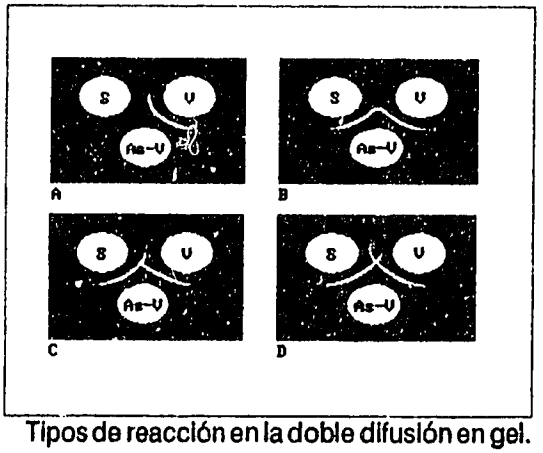
b) Las muestras se colocan en los hoyos periféricos en primer lugar y después el antisuero en el hoyo central, utilizando en ambos casos pipetas pasteur.

5. Incubación de la placa de prueba

La placa se coloca en una cámara húmeda, la cual consiste en un recipiente de plástico con sello hermético en cuyo interior se coloca papel húmedo y un punto de apoyo para evitar que la placa de prueba se moje.

6. Lectura

La primera lectura se hace a las dos horas y la segunda a las 18 horas. Es preferible utilizar una caja oscura que facilite las lecturas. La caja debe consistir en un soporte de madera con una abertura en la parte superior de diámetro suficiente para sostener firmemente la placa. En su interior debe ubicarse un fluorescente circular.



Tipos de reacción en la doble difusión en gel. M: muestra en estudio; V: control positivo; As-V: antisuero contra el virus. A: Reacción del antisuero y su control, pero no con la muestra. B: Reacción de identidad entre la muestra y el control. C: Reacción de identidad parcial. D: Reacción de no identidad.

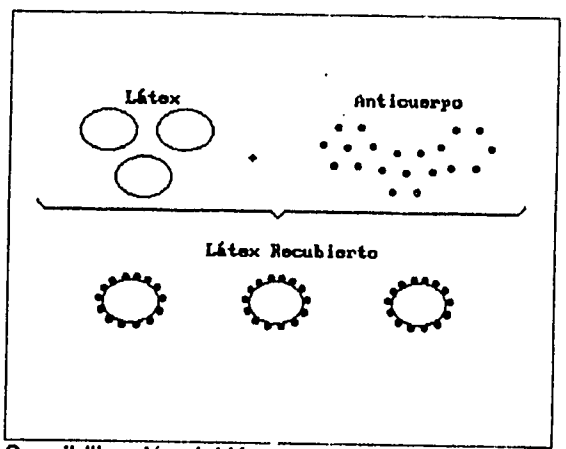
Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU),** constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3. DETECCION / Serología

Fascículo 3.3.5 Prueba de Latex

La prueba de látex es una modificación de la técnica serológica de microprecipitación y se basa en la formación de un precipitado visible entre un antígeno (virus) y su anticuerpo específico adsorbido a las esferas de poliestireno que conforman el látex.

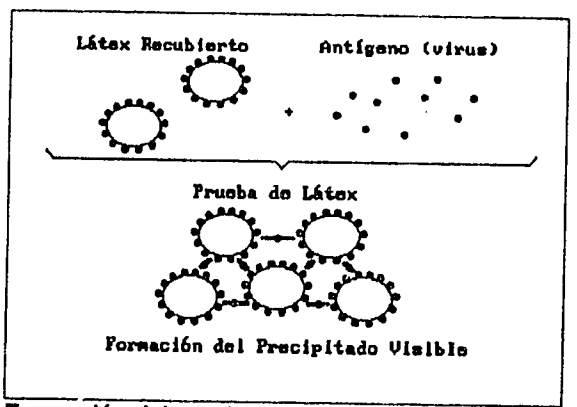


Sensibilización del látex.

El látex está constituido por esferas de poliestireno de 810 nanómetros de diámetro (1 nanómetro = 10^{-9} m). Las esferas de poliestireno son recubiertas con anticuerpos mediante un proceso denominado **sensibilización del látex.**

Una vez sensibilizado, el látex es mezclado con savia de hojas o virus purificado. La agregación, al igual que en la microprecipitación, tiene lugar si el antígeno se encuentra presente en las muestras.

En este caso, como las esferas de látex son mucho más grandes que los anticuerpos, la reacción se puede observar a simple vista, cuando la placa petri es colocada sobre un fondo negro.



Formación del precipitado en la prueba de látex.

Materiales

Los materiales requeridos para la prueba de Látex son:

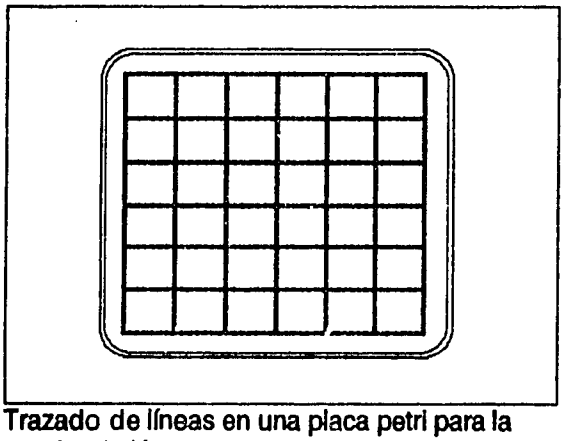
- Bolsas plásticas (10 x 15 cm)
- Tubos de ensayo (10 x 75 mm)
- Placas petri de plástico u hojas de plástico
- Jeringas hipodérmicas de 1 cm^3 (= 1 ml)
- Látex sensibilizado para cada virus
- Agua destilada

- Solución amortiguadora Tris HCl 0,05 M (pH 8) que contenga 0,01M de bisulfito de sodio y 0,05% de Tween-20
- Agitador mecánico con acción rotativa (opcional)
- Extractor automático de jugo (opcional)

Procedimiento

En el CIP se han introducido algunas modificaciones que han mejorado el método original de látex. A continuación se describe el método de siete pasos usado en forma rutinaria para analizar hojas.

Con una regla y un lápiz de cera, trace Líneas paralelas a 0,8 cm en la parte interior de la base de una placa petri. Luego trace líneas perpendiculares para formar cuadrados. Si utiliza hojas de plástico (micas), córtelas de modo que quepan dentro de la placa petri.



Trazado de líneas en una placa petri para la prueba de látex.

Colecte hojas a diferentes alturas de la planta que va a ser examinada cubriéndolas con una bolsa plástica para evitar contacto con las manos. Para detectar PVS es esencial incluir hojas del tercio medio o inferior de la planta.

Es necesario tener siempre dos testigos: uno negativo (planta sana) y uno positivo (planta artificialmente infectada). Para estos testigos utilice hojas de una planta de papa sana y de una planta de papa infectada con el virus que está en prueba. Si no dispone de testigos de papa, también puede utilizar hojas sanas e infectadas, respectivamente, de otro hospedero o planta indicadora.

Extraiga el jugo de la muestra. Esto se puede hacer con un extractor automático de jugo. Si este equipo de extracción no está disponible, deje la muestra de hoja en la bolsa plástica y agréguele 0,3 cm^3 de solución amortiguadora Tris HCl. Con un rodillo u otro objeto cilíndrico, presione fuertemente la bolsa de plástico varias veces sobre una mesa, de modo que exprima la hoja.

Colecte el jugo en un tubo de ensayo (tubo de colección) y déjelo en reposo por dos horas, de preferencia a 4°C.

Ponga 0,45 cm^3 de la solución amortiguadora Tris-HCl en dos tubos de prueba (A) para preparar las siguientes diluciones:
- Dilución de 1/10 (primer tubo)
- Dilución de 1/100 (segundo tubo)

Proceda como sigue: transfiera con una jeringa hipodémica 0,05 cm^3 de jugo del nivel superior del tubo de colección, evitando el sedimento (B).

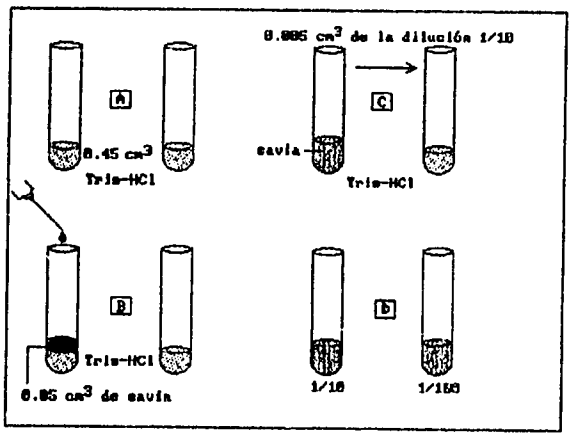
Preparación de las diluciones de savia

Mezcle bien, extrayendo el jugo con la jeringa y expeliéndolo de nuevo en el tubo de ensayo. Esta es la dilución 1/10, que también se puede preparar mezclando nueve gotas de solución amortiguadora Tris-HCl con una gota de jugo.

Del tubo con la dilución 1/10, transferir 0,05 cm^3 al segundo tubo (C) y mezcle como en el caso anterior. Esta es la dilución 1/100. También puede prepararla mezclando nueve gotas de solución amortiguadora Tris-HCl con una gota de la dilución 1/10.

Es necesario hacer dos diluciones porque las reacciones no son visibles cuando el virus está muy concentrado (D). Debido a que la concentración del virus andino latente de la papa (APLV) es generalmente alta en la planta,

se recomienda una dilución adicional de 1/1000 para su detección.



Sostenga la jeringa en posición vertical y deje caer una gota de látex sensibilizado en cada cuadrado de la placa petri. Llene dos veces más cuadrados que el número de muestras (en el caso de APLV, llene 3 cuadrados). Prepare cuatro cuadrados adicionales para los testigos (negativo y positivo).

Coloque las muestras en la placa petri siguiendo un plan, de modo que se puedan distinguir fácilmente las muestras y los testigos.

Utilizando otra jeringa colocar una gota de la dilución 1/100 sobre una gota de látex. Luego, con la misma jeringa, coloque una gota de dilución 1/10 encima de la gota de látex que sigue.

Enjuague la jeringa tres o cuatro veces con agua destilada, para que la pueda utilizar con la muestra siguiente.

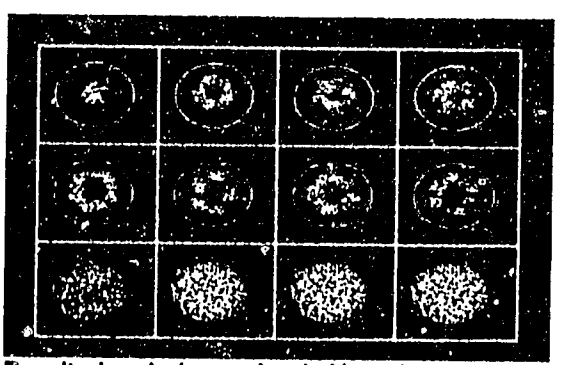
Aplique el mismo procedimiento para cada muestra y lleve un registro del plan que ha seguido.

Cuando termine con todas las muestras, cubra la placa petri con su tapa y colóquela en el agitador durante una hora a 110 rotaciones por minuto. Es esencial que el agitador sea rotativo para que se formen las reacciones positivas. Si no dispone de un agitador, coloque las placas petri sobre un cartón y rótelas manualmente sobre una mesa.

Abra la placa petri y observe las reacciones sobre un fondo oscuro. En reacciones positivas, se nota una agregación fácilmente visible de partículas de látex. En reacciones negativas la suspensión de látex conserva un aspecto lechoso.

Para detectar virus de papa en los tubérculos, rompa el estado de reposo mediante la aplicación de Rindite, y almacene los tubérculos a 20°C durante dos semanas. Para extraer jugo de los tubérculos, corte rebanadas delgadas del extremo apical con un bisturí estéril. Muela las rebanadas en un extractor de jugo que tenga rodillos acanalados, o empleando una bolsa de plástico.

Recolecte en tubos de ensayo el jugo extraído y sométalo a centrifugación a 5 000 g durante 15 minutos, o déjelo en los tubos hasta que los gránulos de almidón sedimenten. Retire el sobrenadante y úselo para hacer diluciones de 1:10 y de 1:30.



Resultados de la prueba de látex. Las dos primeras filas muestran reacciones positivas con formación de precipitado; la última fila muestra gotas de látex sin reaccionar.

Las Unidades Técnicas de Capacitación (TTU), constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3 DETECCION / Serología

Fascículo 3.3.6 Ensayos Inmunologicos con Conjugados Enzimáticos: Doble Anticuerpo" Sandwich" (DAS-ELISA)

INTRODUCCION

DAS-ELISA es una técnica serológica de gran sensibilidad para identificar virus de plantas. Las ventajas de esta técnica son las siguientes:

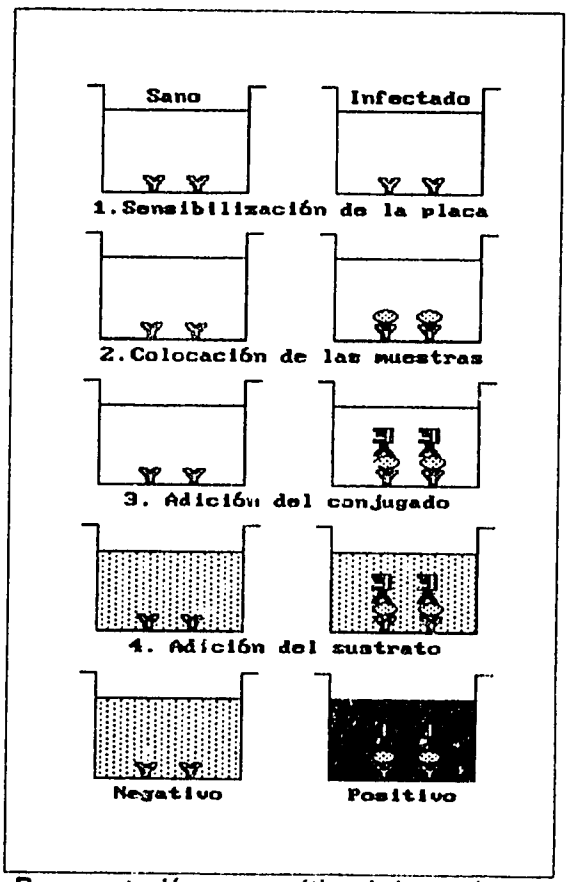
a) Mayor sensibilidad que otros métodos serológicos para detectar la mayoría de los virus, incluyendo PLRV y PVA que se encuentran en baja concentración en plantas infectadas.

b) Requiere menos antisuero que otros métodos serológicos.

La desventaja principal es el gran número de etapas necesarias para completar la prueba. Sin embargo, esta técnica puede ser fácilmente adaptada en un programa de mejoramiento de semilla para producir resultados rápidos y confiables con la mayoría de virus. Es el único método que sirve para detectar PLRV en los tubérculos o en el follaje.

PROCEDIMIENTO

El principio de la variante de la técnica ELISA de doble anticuerpo (Clark, M. F. y A. N. Adams. 1977. J. Gen. Virol. 34:475) se describe a continuación.



Representación esquemática de la prueba DAS-ELISA

1. Sensibilización de la placa. Los anticuerpos (gammaglobulina) específicos para cada virus son adsorbidos a la superficie de cada hoyo de la placa de microtitulación. Se lava el exceso de gammaglobulina no adsorbida. Se necesita un anticuerpo específico (gammaglobulina) para cada virus que se someta a prueba.

2. Colocación de muestras. La muestra por probar se agrega a la placa. Si la muestra contiene partículas del virus específico (antígeno) para los anticuerpos aplicados en el paso anterior, éstas quedarán adheridas a los anticuerpos y no serán eliminadas en el proceso de lavado.

3. Adición del conjugado enzima-gammaglobulina. Estos anticuerpos quedan adheridos solamente a las partículas de virus. El exceso del conjugado es eliminado en el proceso de lavado.

4. Adición del sustrato. Finalmente, el sustrato es agregado a la placa. La intensidad del color amarillo indica la cantidad de virus presente en la muestra.

1. Sensibilización de la placa.

La primera etapa en esta variante de la técnica ELISA consiste en cubrir los hoyos de la placa de microtitulación con un anticuerpo (gammaglobulina purificada) específico para cada virus. Para lograrlo, es necesaro efectuar los siguientes pasos.

a) Preparar la solución amortiguadora de adsorción:

1,59 g Na_2C0_3
2,93 g $NaHC0_3$
Agregar agua destilada hasta completar 1 litro
0,2 g NaN_3

Esta solución puede ser almacenada hasta por 1 mes a 4oC.

b) Diluir la gammaglobulina purificada (anticuerpo) en el tampón de adsorción en la dilución adecuada.

c) Agregar 200 ul de la gammaglobulina purificada y diluida a cada hoyo de la placa de microtitulación.

d) Incubar la placa por 2 a 4 horas a 37°C (Normalmente, pueden utilizarse todos los hoyos de la placa, pero la experiencia en el CIP ha demostrado que los hoyos de los bordes frecuentemente producen reacciones no específicas y por eso no se utilizan. Para evitar reacciones no específicas, se llenan con solución tampón). Este proceso permite a las moléculas de gammaglobulina adherirse a la superficie de los hoyos en la placa.

e) Vaciar la placa. Al término del período de incubación, la placa se vacía y se lava con PBS-Tween. La composición del PBS-Tween es la siguiente:

8,0 g NaCl
0,2 g KH_2PO_4
2,9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$
0,2 g KCl
0,2 G NaN_3
0.5 ml Tween 20
Agregar agua destilada hasta completar 1 litro

f) Lavar la placa de la siguiente manera. Llenar los hoyos con PBS-Tween. Dejar reposar durante tres minutos. Vaciar la placa. Este proceso se repite tres veces. El lavado elimina de la placa la gamma-globulina no adherida a ella. Cuando se aplica la técnica rutinariamente, las placas con gammaglobulina pueden ser conservadas perfectamente a -20°C por períodos largos. Estas placas pueden ser preparadas con anticipación.

2. Colocación de muestras (antígeno).

Las muestras por analizar pueden ser extraídas de diferentes maneras, las cuales incluyen la maceración de tejido vegetal y el empleo de una solución tampón para obtener una dilución de 1/10 a 1/20.

Cuando los virus se encuentran en una concentración baja en el tejido infectado, se puede utilizar menos tampón para tener una dilución más concentrada. La manera más práctica es macerar el tejido vegetal en bolsas pequeñas de plástico.

a) Para facilitar la maceración de la muestra, se agrega en la bolsa PBS-Tween + 2% PVP-40 recientemente preparado. La composición de PBS-Tween-PVP es solución amortiguadora PBS-Tween y 2% de Polivinil pirrolidona PM 40 000.

b) Se maceran las muestras haciendo rodar un tubo de ensayo o algo semejante sobre la bolsa de plástico. Se deben utilizar muestras sanas e infectadas, procesadas de la misma manera, como testigos. El jugo de las muestras se puede extraer también con una máquina extractora de jugo. El jugo se recoge en un tubo de ensayo y se le agrega la solución amortiguadora para darle la dilución requerida.

c) Llenar los hoyos de la placa con 200 ul (0,2 ml) de muestras diluidas. Utilizar una pipeta limpia para cada muestra. Normalmente, un hoyo es suficiente para cada muestra. (En algunas placas, los hoyos cercanos a los bordes pueden desarrollar reacciones no específicas. Por ello, no deben ser utilizados en las pruebas.) Las muestras se disponen en la placa según un plan. De ese modo, las muestras y los testigos pueden ser fácilmente identificados.

d) Incubar la placa a 4°C durante 18 horas (durante la noche) o a 37°C durante 4 a 6 horas.

e) Lavar la placa como se describió anteriomente. Repetir el lavado tres veces o hasta que la placa quede completamente transparente sin jugo o tejido de planta.

3. Adición del conjugado (enzima - gammaglobulina).

Aunque otras enzimas pueden ser conjugadas con las moléculas del anticuerpo, la fosfatasa alcalina es la que ha dado los mejores resultados. La adición del conjugado se realiza en los siguientes pasos.

a) Diluir el conjugado enzimático en PBS-Tween con 2% de PVP-40 y 0,2% de albúmina de huevo o leche en polvo (para determinar la dilución más adecuada, referirse al capítulo de purificación y conjugación de antisueros).

b) Agregar a cada hoyo de la placa 200 ul (0,2 ml) del conjugado enzima-gammaglobulina diluido (llenar con solución amortiguadora los hoyos de los bordes).

c) Incubar a 37°C por 3 a 6 horas.

d) Lavar la placa como se describió anteriormente. Repetir el lavado tres veces. El exceso del conjugado enzimático que no esté adherido a las partículas de virus será eliminado.

4. Adición del sustrato enzimático.

En esta etapa solamente reaccionarán los hoyos de la placa que contienen la enzima.

a) Preparar la solución amortiguadora de sustrato.

97 ml de dietanolamina 800 ml de H_2O Regular el pH a 9,8 con HCl (37%) 0,2 g de NaN_3 Agregar agua destilada hasta tener un volumen total de un litro

Esta solución amortiguadora debe ser preparada justo antes de cada aplicación. No puede ser almacenada.

b) Disolver el sustrato enzimático en la solución amortiguadora para llegar a la concentración de 0,6 ó 0,8 mg/ml. El sustrato enzimático puede conseguirse en polvo o "Peletizado" (en pastillas de concentración conocida). Esta última forma es la más conveniente ya que evita tener que pesar el sustrato cada vez que se necesite.

c) Agregar 200 ul (0,2 ml) de esta solución de sustrato a cada hoyo de la placa (pero no a los cercanos al borde).

d) Incubar la placa a temperatura ambiental por el tiempo necesario para observar la reacción (normalmente de 30 a 60 minutos). En los hoyos que fueron llenados con muestras infectadas, la solución de sustrato se vuelve amarilla.

La intensidad del color amarillo es una indicación de la cantidad de virus en la muestra. Cuanto más intenso es el color, mayor es la cantidad de virus. Los hoyos transparentes corresponden a las muestras de plantas sanas, a los testigos sanos y al testigo de solución amortiguadora.

Los resultados son registrados y anotados en la lista de muestras.

Las lecturas pueden realizarse por el método visual (cualitativo) o con la ayuda de un fotómetro o colorímetro a una longitud de onda de 405 nm (cuantitativo).

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3 DETECCION/ Serología

Fascículo 3.3.7 Ensayos Inmunológicos con Conjugados Enzimáticos: en Membranas de Nitrocelulosa (NCM-ELISA)

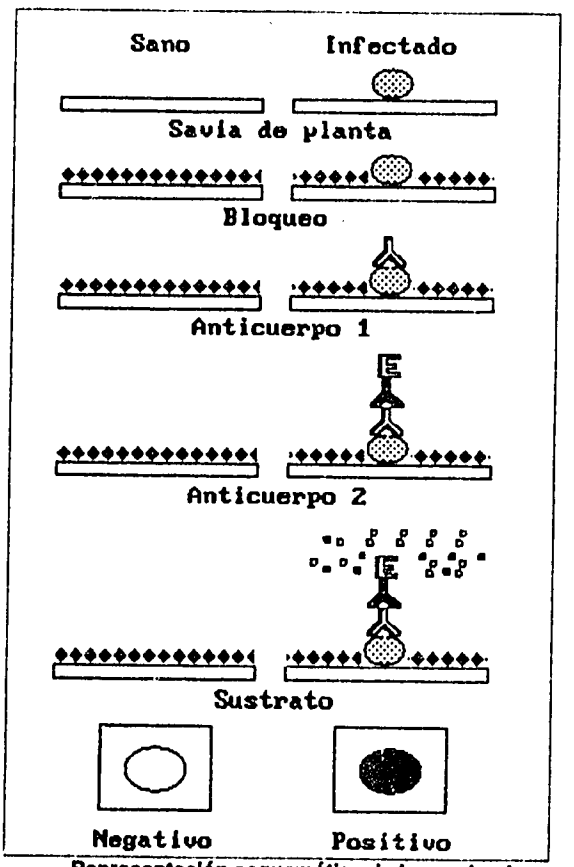
INTRODUCCION

NCM-ELISA es una prueba inmuno-enzimática en la que se utilizan membranas de nitrocelulosa como soporte para los reactivos.

Esta prueba es tan sensitiva como la prueba DAS- ELISA, más fácil de ejecutar y tiene la ventaja de que las muestras pueden ser colocadas en la membrana de nitrocelulosa, la cual puede almacenarse durante varias semanas antes de continuar con la prueba, o enviarse por correo a otro laboratorio para su procesamiento.

Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente. La prueba consiste en aplicar una pequeña cantidad de muestra (2 a 30 ul.) en la membrana, bloqueando aquellas áreas donde no se coloca muestra. Las partículas virales reaccionan con anticuerpos específicos (IgG) para cada virus y éstos son detectados a su vez por anti-anticuerpos conjugados a una enzima. Esta enzima reacciona con su sustrato , dando una coloración púrpura, siendo la intensidad de la coloración proporcional a la concentración de virus presente en la muestra. La coloración es estable por mucho tiempo y las membranas pueden ser fácilmente almacenadas.

Al igual que en la prueba de DAS-ELISA, varios virus pueden ser detectados al mismo tiempo en la membrana utilizando una mezcla de anticuerpos específicos a los virus que se van a probar.



Representación esquemática de la prueba de NCM-ELISA

Esto es de especial utilidad en programas de producción de semillas, en los cuales es necesario procesar una gran cantidad de muestras.

PROCEDIMIENTO

1. Preparación de las soluciones amortiguadoras

a) TBS pH 7,5 (2 000 ml)

4,84 g TRIS (0,02 M) 58,44 g NaCl (0,5 M) 0,40 g NaN_3 (0,01 %)*

Disolver en 1 990 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7,5 con HCl (aproximadamente 5N). LLevar a un volumen total de 2 000 ml con agua destilada.

* Opcional: usar sólo si la solución amortiguadora va a ser almacenada por varios días. El azida de sodio es una sustancia tóxica que debe manejarse con cuidado.

b) Solución amortiguadora de extracción

Para muestras de papa:

DIECA 0,01 M (sólo si se sospecha PLRV) EDTA 0,01 M (demora en disolverse) completar a 100 ml de TBS

Para muestras de camote:

Na_2SO_3 0,2 g (0,2%) TBS 100 ml

c) Solución amortiguadora de bloqueo (25 ml)

0,5 g Leche en polvo 0,5 ml Tritón X-100 25 ml TBS

Disolver la leche en polvo en un pequeño volumen de TBS y luego completar a 25 ml con TBS. Agregar Tritón X-100 y mezclar bien. Preparar la solución amortiguadora fresca para cada prueba.

d) Solución amortiguadora de anticuerpos (50 ml)

1 g Leche en polvo 50 ml TBS aproximadamente

Disolver la leche en polvo en una pequeña cantidad de TBS. Completar a 50 ml con TBS.

e) Solución amortiguadora de lavado T-TBS (2 000 ml)

2 000 ml TBS 1 ml Tween-20

f) Solución amortiguadora de sustrato pH 9,5 (500 ml)

6,05 g (0,1 M) TRIS base 2,92 g (0,1 M) NaCl 0,51 g (5 mM) $MgCl_2.6H_2O$ 0,05 g (0,01%) NaN_3

Disolver TRIS, NaCl y $MgCl_2.6H_2O$ en agua destilada. Ajustar el pH a 9,5 con HCl concentrado (5N). Completar a 500 ml con agua destilada.

g) Solución stock de NBT* y BCIP*

Solución stock NBT: 40 mg NBT* 2 ml N-N dimetil formamide (DMF) 70%

Solución stock BCIP: 20 mg BCIP* 2 ml N-N dimetil formamide (DMA) 70%

Mezclar bien cada una de las soluciones stock. Estas deben ser almacenadas a 4°C protegidas de la luz.

* El NBT y el BCIP son compuestos altamente tóxicos que deben manejarse con sumo cuidado. El uso de guantes es indispensable.

h) Solución de revelado (se preprara al momento de usar)

20 ml solución amortiguadora de sustrato 100 ul NBT solución stock 100 ul BCIP solución stock

Disolver la solución stock de NBT en 20 ml de la solución amortiguadora de sustrato. Una vez disuelto, agregar gota a gota la solución stock de BCIP, agitando constantemente con la ayuda de un agitador de tubos (vórtex).

2. Preparación de las muestras.

a) Colectar e identificar las muestras en bolsas de plástico. Estas deberán ser colectadas el mismo día de la prueba.

b) Utilizar una hoja guía para identificar la posición de las muestras en la membrana de nitrocelulosa.

c) Extracción

- Preparar el solución amortiguadora de extracción apropiado para muestras de papa o camote.
- De cada hoja, cortar 5 discos de 1 cm de diámetro. Para muestras de camote es suficiente 1 disco.
- Poner los discos en una bolsa de plástico y agregar 1 ml de solución amortiguadora de extracción.
- Macerar el tejido completamente utilizando un tubo de ensayo o una pieza redonda de madera.
- Dejar reposar la bolsa de 30 a 45 minutos a 4°C.

3. Aplicación de las muestras en la membrana de nitrocelulosa.

Para manipular la membrana de nitrocelulosa es necesario utilizar guantes y pinzas. Las huellas digitales pueden interferir con las reacciones.

a) Cortar las membranas de nitrocelulosa al tamaño deseado y marcarlas formando cuadrados de 1 cm de lado. Con el propósito de identificación, numerar la membrana en la esquina inferior derecha.

b) Pre-humedecer la membrana introduciéndola lentamente en TBS y evitando la formación de burbujas. Al mismo tiempo, poner dos papeles de filtro Whatman N°1 o N°4 de un tamaño mayor al de la membrana. Remojar de 5 a 10 minutos.

c) Colocar dos hojas de papel de filtro seco sobre la mesa y poner sobre éstos los dos papeles filtro húmedos y luego la membrana. Evitar la formación de burbujas. Esperar hasta que el líquido de la superficie de la membrana se haya absorbido (1-2 minutos)

Nota: para muestras de camote, obviar los pasos b y c. La membrana seca se coloca sobre una hoja de papel filtro y se procede a la colocación de muestras (paso d).

d) Utilizando una pipeta pasteur limpia, poner cuidadosamente una gota del sobrenadante (sin tejido vegetal) de la bolsa en el centro del cuadrado en la membrana de nitrocelulosa. (No tocar la membrana con la punta de la pipeta mientras se aplica la muestra.) Utilizando una

pipeta limpia para cada muestra, repetir el proceso hasta que todas las muestras hayan sido colocadas.

e) Transferir la membrana a un papel filtro seco y dejarla secar por 30 minutos a temperatura ambiente o durante 15 minutos a 37°C.

f) Cuado la membrana esté seca se puede poner entre dos papeles filtro secos y protegerla con cartón para que se pueda enviar por correo o para almacenarla hasta que se desee continuar la prueba.

4. Desarrollo de la prueba serológica.

Todas las incubaciones y lavados se realizan a temperatura ambiental. Si se dispone de un agitador, las incubaciones se realizan con agitación suave a 50 rpm y los lavados a 100 rpm.

a) Agregar 25 ml de la solución amortiguadora de bloqueo a una placa petri e introducir la membrana lentamente evitando la formación de burbujas. Incubar por 60 minutos.

Mientras tanto, preparar la solución de anticuerpos específicos al virus (o la mezcla de anticuerpos, según sea el caso). Agregar la dilución adecuada de IgG a 25 ml de solución amortiguadora de anticuerpos (**solución de anticuerpo 1**).

b) Descartar la solución bloqueadora y agregar la solución de anticuerpo 1. Cubrir las placas y sellarlas con parafilm o cinta adhesiva para evitar la evaporación. Incubar toda la noche.

c) Descartar la solución de anticuerpo 1 y lavar la membrana en 30 ml de T-TBS y en agitación. Repetir 3 veces durante 3 minutos cada vez.

Mientras tanto, preparar la **solución de anticuerpo 2**. Agregar la dilución adecuada de conjugado enzimático anti-IgG (anticuerpo 2) a 25 ml de solución amortiguadora de anticuerpo. Poner en una placa petri limpia.

d) Remover la membrana después del último lavado y colocarla en la placa petri con la solución de anticuerpo 2. Incubar una hora.

e) Descartar la solución de anticuerpo 2 y lavar tres veces en T-TBS y una vez con buffer de sustrato por tres minutos cada vez.

Durante el último lavado, preparar la solución de revelado en un frasco protegido de la luz. Utilizando guantes, agregar 100 ul de la solución stock de NBT a 25 ml de solución amortiguadora de sustrato. Mezclar bien. Agregar gota a gota 100 ul de la solución stock de BCIP. Mezclar bien y colocarla en una placa petri limpia.

f) Remover la membrana del último lavado y colocarla en la placa petri con la solución de revelado, teniendo cuidado de que la membrana se encuentre completamente inmersa en ella. Esperar de 15 a 30 minutos para visualizar la reacción. Transcurrido ese tiempo, paralizar la reacción descartando la solución de revelado y lavando la membrana con agua destilada dos veces durante 10 minutos.

g) Secar la membrana sobre papel filtro y almacenarla entre dos papeles filtro secos.

Nota: Algunas veces, la clorofila, pigmentos u otras sustancias colorantes en las muestras pueden obscurecerse o enmascarar las reacciones positivas. Por eso, para poder observar estas reacciones la eliminación de estos compuestos es necesaria. Para ello, la membrana debe ser sumergida en una solución de lejía (2 a 5 %) o de hipoclorito de calcio (2%) durante 10 minutos. Enjuagar con agua destilada y secar.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.3 DETECCION/SEROLOGIA

Fascículo 3.3.8 Ensayos Serológicos con Conjugados Enzimáticos: Conjugado Enzimático de Penicilinasa (PNC-DAS-ELISA)

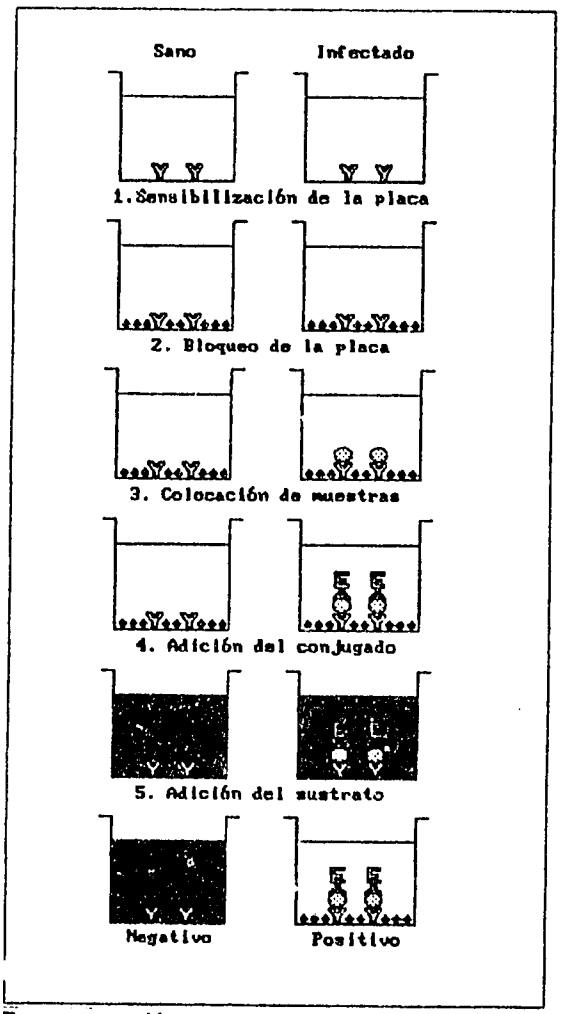
INTRODUCCION

La prueba ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en su modalidad DAS (Double Antibody Sandwich) ha alcanzado gran difusión como método rutinaro para la detección de virus de papa.

Esta prueba serológica emplea complejos enzima-anticuerpo a los que se les denomina conjugados enzimáticos. Las enzimas empleadas en DAS-ELISA tienen que producir algún tipo de reacción coloreada que permita una evaluación sencilla. En la actualidad la enzima más empleada es la fosfatasa alcalina, que se obtiene del intestino de ternera y de *Escherichia coli.*

A pesar de ser un método rápido y eficiente, muchos países del Tercer Mundo no pueden hacer uso riguroso del DAS-ELISA en sus programas de semilla debido al alto costo por muestra. Gran parte de este costo se debe principalmente a la enzima y al sustrato enzimático empleado: el p-nitrofenil fosfato.

En el CIP se ha ensayado la prueba DAS-ELISA para la detección de virus de papa empleando otra enzima, la penicilinasa (ß-lactamasa), de costo comparable al de la fosfatasa alcalina pero que presenta la ventaja de emplear un sustrato mucho más económico, el complejo iodo-almidón-penicilina.



Representación esquemática de la prueba PNC-DAS-ELISA.

En sí, la prueba DAS-ELISA con penicilinasa (PNC-DAS-ELISA) se basa en el método iodométrico, el cual se vale del complejo yodo-almidón como indicador de pH. Este complejo se forma por el arreglo de los átomos de iodo entre las vueltas que forma la molécula de almidón al estar en solución. Este complejo es bastante estable y es de color azul.

Cuando la penicilinasa actúa sobre la penicilina se produce el ácido penicilóico, que actúa como reductor del yodo del complejo y lo torna totalmente incoloro.

La prueba con penicilinasa, empleando el mencionado sustrato, tiene una sensibilidad igual y, en muchos casos, superior a la obtenida con fosfatasa alcalina al probarse con purificaciones virales diluídas en savia de plantas de papa sanas.

Aunque esta prueba sólo sirva para evaluaciones visuales, se presenta como una alternativa muy económica para ser empleada como técnica de rutina.

PROCEDIMIENTO

1. Sensibilización de la placa.

a) Preparar la solución amortiguadora de cobertura (solución amortiguadora carbonato 0,05M). Ajustar el pH a 9,6 con HCl 0,1M o con NaOH 0,1M.

1,59 g Na_2CO_3 2,93 g $NaHCO_3$ 0,2 g NaN_3* Agregar agua destilada hasta completar 1 litro * Opcional; utilizar sólo si la solución va a ser almacenada

b) Diluir la IgG de cobertura en la solución amortiguadora y mezclar bien (la IgG se puede diluir hasta 1/1000).

c) Llenar cada hoyo de la placa con 150 ul de la dilución de IgG. Cubrir la placa con cinta adhesiva o colocarla dentro de una bolsa plástica, sellándola con cinta adhesiva.

d) Incubar durante 3 horas a 37°C o a temperatura de ambiente durante 5 horas.

e) Eliminar la solución de IgG de la placa, sacudiéndola vigorosamente y secándola sobre toallas de papel.

2. Bloqueo de la placa.

a) Preparar la solución de bloqueo disolviendo 2% de leche en polvo o albúmina de huevo en solución amortiguadora fosfato salina (pH 7,4).

Solución amortiguadora fosfato salino (PBS): 8,0 g NaCl 0,2 g KH_2PO_4 2,9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ 0,2 g KCl 0,2 g NaN_3* Agregar agua destilada hasta completar 1 litro PBS-Tween: agregar 0,05% de Tween 20 * Opcional; utilizar sólo si la solución va a ser almacenada

b) Llenar cada hoyo con 200 ul de solución de bloqueo. Sellar la placa de la forma mencionada anteriormente

c) Incubar la placa durante 1 hora a 37°C.

d) Lavar los hoyos de la placa con solución amortiguadora de lavado (PBS-Tween) 3 veces durante 3 minutos cada vez.

3. Colocación de las muestras.

a) Colectar e identificar las muestras en bolsas de plástico (esto puede hacerse uno o dos días antes si es que éstas pueden ser al-

macenadas a 4°C). Utilizar controles positivos y controles sanos.

b) Preparar la solución amortiguadora de maceración: PBS-Tween con 2% de polivinilpirrolidona (PVP-40) y 1% leche en polvo o albúmina de huevo.

c) Agregar la solución amortiguadora a las muestras. Pueden diluirse en una proporción de 1:5 (peso de muestra : volumen de buffer).

d) Macerar las muestras con la ayuda de un tubo de ensayo o un rodillo.

e) Llenar cada hoyo con 150 ul de muestra (no olvidar los controles positivos y sanos) siguiendo un patrón pre-establecido.

f) Cubrir la placa e incubarla a 4°C o a temperatura de ambiente durante toda la noche.

g) Lavar la placa con PBS-Tween hasta eliminar todo rastro de savia de los hoyos. Luego, lavar 3 veces más durante 3 minutos cada vez.

4. Colocación del conjugado enzimático.

a) Preparar la solución amortiguadora de conjugado: PBS-Tween 20 con 1% de leche en polvo o albúmina de huevo.

b) Diluir el conjugado enzimático en la solución amortiguadora.

c) Llenar cada hoyo con 150 ul de la dilución del conjugado enzimático.

d) Cubrir la placa e incubarla a 37°C durante 3 horas.

e) Lavar las placas 3 veces durante 3 minutos cada vez.

5. Revelado de la placa.

Nota: la preparación del sustrato debe empezarse 1 hora antes del término del período de incubación de la placa con el conjugado enzimático.

a) Preparar una solución de almidón al 2% en solución amortiguadora fosfato 0,2M ajustado a pH 7,2 con HCl 0,5M o NaOH 0,5M.

b) Disolver el almidón calentándolo a fuego directo. Dejar enfriar agitando constantemente para evitar la formación de grumos.

c) Tomar 5 ml de la solución de almidón y agregar 25 ml de solución amortiguadora fosfato 0,2M pH 7,2 y 100 ul de la solución stock de "Iodine" (200 mg de yodo, 5,32 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua destilada). Ajustar el pH a 7,2. Esta solución es de color azul púrpura.

d) Agregar penicilina G a la solución amortiguadora de sustrato (*esto debe hacerse durante el último lavado del conjugado enzimático de la placa*). Asegurarse que la solución esté completamente fría.

e) Llenar cada hoyo con 150 ul de la solución de sustrato y esperar la reacción.

La reacción es positiva cuando la solución en el hoyo se torna incolora, total o parcialmente, en comparación con el control sano que debe permanecer de color azul oscuro a púrpura.

Nota: La reacción comienza normalmente 10 minutos después de colocar el sustrato.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

3.O DETECCION

3.4 PSTVd

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.4 DETECCION / PSTVd

Fascículo 3.4.1 El Viroide del Tubérculo Ahusado de la Papa (PSTVd)

La enfermedad del ahusamiento del tubérculo de la papa fue reportada por primera vez por Martin en 1922. La designación "tubérculo ahusado" fue utilizada por los agricultores de South Jersey (U.S.A) para describir la forma de los tubérculos afectados. Esta enfermedad es causada por el viroide del ahusamiento del tubérculo de la papa (PSTVd, por sus siglas en inglés: "Potato Spindle Tuber Viroid"). Este viroide consiste en una pequeña molécula de RNA sin cápside proteica. A diferencia de los virus que infectan papa, que prefieren climas templados a fríos, PSTVd requiere climas cálidos para su multiplicación. Las pérdidas en rendimiento que causa este viroide varían con el cultivar y el strain; con el strain más severo las pérdidas pueden llegar a ser de hasta 65%.

Los síntomas de la enfermedad en papa varían en gran medida de acuerdo al cultivar de papa infectado y a las condiciones ambientales. En muchos casos, los síntomas foliares son muy difíciles de detectar. Se ha reportado que plantas de papa infectadas muestran hábito de crecimiento erecto, enanismo, coloración grisácea de las hojas, reducción del área foliar y rugosidad.

Los tubérculos infectados son elongados y en algunos cultivares se observa el desarrollo de extremos puntiagudos, cuya presencia es una característica típica de la enfermedad. Otros síntomas que se pueden observar en los tubérculos son: hundimiento de ojos, desarrollo de puntos necróticos alrededor de las lenticelas, grietas superficiales y necrosis de la pulpa. No todos los tubérculos de plantas infectadas muestran todos o algunos de estos síntomas.

PSTVd se transmite muy fácilmente en forma mecánica a otro hospedero susceptible. En condiciones de campo, una planta enferma puede infectar a otra cercana por simple contacto. El viroide también puede ser transmitido a otras plantas durante la realización de prácticas culturales y mediante el uso de herramientas contaminadas. También se transmite por semilla botánica.

METODOS DE DETECCION

La detección serológica de este viroide no es posible debido a que carece de cubierta proteica. Los síntomas foliares son difíciles de detectar y en muchas variedades el tubérculo no adopta la forma ahusada caracerística. Es por ello que la detección de PSTVd requiere de técnicas más sensibles. Los métodos disponibles para la detección de PSTVd son los siguientes.

1. Prueba del tomate.
    a. Prueba normal
    b. Prueba de Yang y Hooker

c. Prueba de confrontación

2. Prueba en *Scopolia sinensis*

3. Electroforesis en gel de acrilamida (PAGE).

4. Hibridación de ácidos nucleicos (NASH, "Nucleic acid spot hybridization").

1. PRUEBA DEL TOMATE

a) Prueba normal. Esta prueba es muy simple. El tejido de la planta que va a ser sometida a la prueba se macera con agua destilada y luego se inocula mecánicamente en plantas jóvenes de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers). Las plantas inoculadas se colocan en una cámara de crecimiento a 30°C hasta la aparición de los síntomas. Los tomates infectados muestran inicialmente epinastia, rugosidad de las hojas (que posteriormente se enrollan), enanismo y aparición de necrosis de venas. Con el tiempo, la necrosis de las venas se extiende a toda la hoja y ésta adquiere una coloración marrón. El strain severo de PSTVd provoca síntomas muy claros; sin embargo, el strain suave es difícil de detectar, ya que los síntomas son leves y las plantas infectadas no se diferencian claramente de los controles sanos.

b) Prueba de Yang y Hooker. Esta prueba se lleva a cabo en forma similar que la anterior, excepto que las plantas inoculadas se mantienen a 24 - 30 °C bajo iluminación flourescente continua (100 ft-c). Las plantas de tomate infectadas con PSTVd, ya sea con el strain severo o suave, muestran albinismo. En el caso del strain severo, las plantas también muestran necrosis de venas. Este método es más sensible que el anterior ya que detecta ambos strains de viroide.

c) Prueba de confrontación. Esta prueba es una variación de la prueba normal para detectar el strain suave de PSTVd. Se utilizan tres plantas de tomate (A, B, y C) en cada prueba. Primero se inoculan las plantas de tomate A y B con la savia de la planta que va a ser sometida a la prueba. Si estas plantas muestran síntomas severos de PSTVd, entonces la planta de papa original esta infectada con el strain severo del viroide. Si las plantas A y B no muestran ningún síntoma, se inoculan las plantas B y C con el strain severo de PSTVd y se mantienen a 30 °C. Después de 2 a 3 semanas, se observan los síntomas de las tres plantas (A, B, y C). La planta C mostrará síntomas severos de PSTVd. Si la planta B también muestra estos síntomas, entonces la planta original no estaba infectada con el viroide. Si la planta B no muestra síntomas, entonces la planta original estaba infectada con el strain suave de PSTVd, que evitó que la planta B se infecte con el strain severo del viroide debido a una protección cruzada.

2. PRUEBA EN *Scopolia sinensis*

Scopolia sinensis es una planta que pertenece a la familia Solanaceae. Cuando esta planta se inocula con PSTVd, se pueden observar lesiones locales necróticas después de la infección. Las plantas utilizadas en esta prueba deben encontrarse en un período de crecimiento vigoroso y deben ser mantenidas con luz leve (300 - 400 ft-c) a 18 - 23 °C. El desarrollo de los síntomas toma de 8 a 14 días. Esta prueba es de poco valor debido a los requerimientos estrictos de temperatura y luz para mantener a las plantas y a la dificultad para producir sus semillas.

3. ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA (PAGE)

La separación electroforética de RNA de bajo peso molecular aislado de plantas en gel de poliacrilamida es un método muy utilizado hasta hace poco para la detección de PSTVd. El protocolo de esta prueba se describe en hoja aparte. La electroforesis es menos sensible que la prueba del tomate por lo que se recomienda una combinación tomate-PAGE en detecciones

de rutina para aumentar su sensibilidad. Este método fue utilizado en el CIP hasta hace poco. La savia de las plantas que van a ser sometidas a la prueba se inocula en almácigos de tomate sanos y luego de 2 a 3 semanas se extrae el RNA de bajo peso molecular de estos últimos para realizar la prueba PAGE. La ventaja de este método es que aun cuando la concentración del viroide sea baja en las plantas originales, en los tomates inoculados la concentración se incrementa, y el viroide es fácilmente detectado por los síntomas producidos o mediante la prueba PAGE.

Luego de teñir el gel, el RNA de PSTVd se puede localizar cerca del centro del gel, ya que éste migra más lentamente que el RNA 9S. En algunos casos, la banda del RNA 9S no es muy visible, por lo que se recomienda utilizar controles positivos y sanos en la corrida. La muestra positiva se puede identificar comparándola con los controles.

4. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS (NASH)

Desde 1983, el CIP ha adoptado esta técnica para trabajos de rutina debido a su alta sensibilidad y por la facilidad de poder analizar un gran número de muestras al mismo tiempo. Antes de poder aplicar esta técnica es necesario cumplir con una serie de requisitos:

a) Producir un cDNA de hebra simple complementario a la secuencia de PSTVd (PSTVd-cDNA).

b) Disponer de una gran cantidad de PSTVd-cDNA. Esto se logra mediante su clonamiento en un vector (por ejemplo un plásmido) y su introducción en una bacteria *E. coli* donde el plásmido se multiplicará. El bacteriófago M-13 también ha sido utilizado como vector.

c) Aislar el PSTVd-cDNA de la bacteria y marcarlo con un isótopo radiactivo. Recientemente dos compañías comerciales han desarrollado un marcador no radiactivo que puede ser utilizado en su lugar.

El principio básico de la prueba depende de la habilidad del PSTVd-cDNA de formar un híbrido con la molécula de PSTVd inmobilizada en una membrana, ya sea líquida o sólida. Debido a la presencia del marcador radiactivo en el cDNA, este híbrido puede ser detectado mediante una autoradiografía en una placa fotográfica. La presencia del híbrido radiactivo indica que la muestra original se encontraba infectada con el viroide.

Los experimentos realizados en el CIP indican que este método es diez veces más sensible que la prueba PAGE y que puede detectar al viroide en una semilla infectada de un lote de clen. El desarrollo de esta prueba fue posible gracias a la colaboración en la investigación del Dr. R. A. Owens.

En este momento, el uso de marcadores radiactivos en la prueba es una limitación. En el CIP se estan probando los marcadores no radiactivos que expenden las compañías comerciales para evaluar su eficiencia y adaptabilidad en la detección de PSTVd. Hasta que el método no radiactivo esté disponible, el CIP se ha ofrecido a analizar las muestras provenientes de programas nacionales. Sin embargo, esto sólo es posible si las muestras son colocadas en una membrana y enviadas por correo al CIP. El CIP dispone de equipos que incluyen membranas de nitrocelulosa y soluciones tampón requeridas para la extracción de las muestras. Los que estén interesados pueden hacer sus pedidos al Dr. Luis F. Salazar en el CIP, Lima, Perú. Para mayor información, referirse al capítulo de Hibridación de Acidos Nucleicos.

REFERENCIAS

DIENER, T.O. y W.B. RAYMER. 1967. Potato spindle tuber virus: plant virus with properties of a free nucleic. Science 158: 387.

DIENER, T.O. 1979. Viroids and viroids diseases. John Wiley & Sons. New York.

SANGER, H.L. 1982. Biology, structure, functions and possible origin of viroids. en Nucleic acids and proteins in plants. Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin. 368 pp.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.4 DETECCION / PSTVd

Fascículo 3.4.2 Detección de PSTVd por Electroforesis en Gel de Acrilamida

La separación electroforética en geles de poliacrilamida de RNAs de bajo peso molecular aislado de plantas, es un método que hasta hace poco fue muy utilizado para la detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa. Este método, junto con la prueba del tomate, puede ser utilizado en trabajo de rutina para detectar PSTVd.

1. Preparación de soluciones stock.

a) EDTA 0,1M

Disolver 33,62 g de EDTA en 1 litro de agua destilada (su disolución es lenta).

b) Hidróxido de amonio 4M

Tomar 140 ml de NH_4OH y completar hasta 1 litro con agua destilada. Homogeneizar bien.

c) Cloruro de litio 10M

Disolver 423,9 g LiCl en 1 litro de agua destilada (volumen final).

2. Preparación de las muestras.

Todo el trabajo debe realizarse a baja temperatura (sobre hielo). Preparar la solución amortiguadora de extracción:

60 ml de LiCl (10 M)
20 ml de EDTA (0.1 M)
20 ml de NH4OH (4 M)
50 ml de agua destilada

Utilizar 1,5 ml de solución amortiguadora de extracción por cada 0,5 g de muestra. Macerar y extraer la savia, colocándola en un tubo ependorf. Agregar igual cantidad de fenol saturado y agitar bien con la ayuda de un agitador de tubos (vórtex).

Centrifugar a 9 000 rpm durante 10 minutos. Recuperar la fase acuosa (parte superior) y agregar 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto. Guardar a -20°C en la congeladora durante toda la noche.

Al día siguiente, centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos y resuspenser el sedimento en 2 gotas de solución amortiguadora fosfato.

3. Preparación del gel de acrilamida.

Para la preparación del gel de acrilamida es necesario tener las siguientes soluciones:

a) Solución amortiguadora de electroforesis (5X):

TRIS base 0,18M	10,9 g	21,8 g
Fosfato de sodio monobásico ($NaH_2PO_4.H_2O$)	10,35 g	20,7 g
EDTA 0,005M	0,73 g	1 46 g
H2O destilada hasta un volumen final de	500 ml	1 000 ml

b) Solución de acrilamida:

15% de acrilamida (especialmente purificada)	15 g	150 g
0,75% N N Methylene-bisacrylamida (purificada)	0,75 g	7,5 g
H_2O destilada hasta volumen final de	100 ml	1 000 ml

c) Solución fresca de persulfato de amonio al 10%. Disolver 1,25 g de persulfato de amonio en agua destilada a un volumen final de 12,5 ml.

Preparar el gel en un Erlenmeyer de 250 ml. La concentración utilizada para la detección de PSTVd es de 5%, eso quiere decir que a cada 50 ml de acrilamida se debe agregar 30 ml de solución amortiguadora de electroforesis 5 veces concentrado (5X) y 67 ml de H_2O destilada.

A esta solución se le agrega 0,25 ml de TEMED (catalizador) y 2,5 ml de una solución fresca de persulfato de amonio al 10%. Agitar suavemente toda la mezcla durante un minuto.

Verter toda la mezcla en el tanque de electroforesis y colocar el peine. Esperar de 5 a 10 minutos para que el gel se polimerice.

Una vez polimerizado, retirar el peine cuidadosamente e inmediatamente colocar el tanque en posición horizontal. Agregar solución amortiguadora de electroforesis 1X en ambos tanques (arriba y abajo). Realizar una pre-corrida por media hora a 100 v.

4. Colocación de las muestras.

Agregar a cada muestra 1 gota de glicerol (ó 2 gotas de sucrosa a 50% en solución amortiguadora de electroforesis) y 1 gota de "bromofenol blue" al 1% (en solución amortiguadora de electroforesis). Mezclar bien.

Con la ayuda de una pipeta pasteur o un micropipetor, colocar cuidadosamente cada una de las muestras en los hoyos dejados por el peine.

Correr el gel a 100 v hasta que el frente de bromofenol blue esté a 0,5 cm del final del gel.

5. Tinción del gel.

a) Tinción con azul.

Disolver 0,03 g de Toluidine BLUE en 300 ml de H_2O destilada. Verter el tinte en el depósito que contiene el gel y agitar durante toda la noche. Al día siguiente, hacer varios lavados con agua hasta poder visualizar las bandas. Leer el resultado sobre un fondo de luz.

b) Tinción con bromuro de etidio.

Utilizar guantes. Preparar una solución stock de 10 mg/ml de bromuro de etidio. En una placa petri de vidrio con suficiente capacidad para contener al gel, mezclar 300 ml de agua destilada y 60 ul de la solución stock. Colocar el gel con mucho cuidado dentro de la solución del tinte. Teñir durante 10 a 15 minutos y leer el resultado bajo luz ultravioleta.

Eliminar el tinte de la siguiente forma: adicionar 100 mg de carbón activado en polvo

por cada 100 ml de solución de bromuro de etidio. Almacenar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora, agitando de vez en cuando. Filtrar a través de papel filtro Whatman N° 1 y eliminar el líquido. Colocar el papel filtro con el carbón activado en una bolsa de plástico sellada y eliminarla en un recipiente adecuado.

c) Tinción con nitrato de plata.

Utilizar guantes en todo momento. Preparar las siguentes soluciones:

-Nitrato de plata (340 mg en 200 ml de agua destilada)

-Etanol al 10% (50 ml de etanol absoluto en 450 ml de agua destilada).

-Acido acético al 0,5% (2,5 ml de ácido acético en un volumen final de 500 ml de agua destilada).

-Revelador:

3 g de hidróxido de sodio (NaOH) 17 mg de borohidruro ($NaBH_4$) 0,8 ml de formaldehído 37% (HCHO) Completar a 200 ml con agua destilada

-Solución de carbonato de sodio (1,48 g de CO_3Na_2 en un volumen final de 200 ml de agua destilada estéril).

Para el revelado, lavar el gel dos veces durante 5 minutos cada vez con etanol al 10% y después con nitrato de plata durante 15 minuntos. Enjuagar con agua destilada de 4 a 5 veces durante 15 segundos.

Revelar durante 1 a 5 minutos (como máximo) con solución de revelado. Parar reacción durante 5 minutos introduciendo el gel en agua destilada.

NOTA: Usar esta metodología únicamente con geles delgados (2 mm o menos de grosor).

6. Preparación de fenol saturado.

a) A partir de fenol líquido.

Agregar 0,1% de 8-hidroxiquinolina y 10% de m-cresol al fenol líquido y agitar durante 1 hora.

Para estabilizar el pH, realizar de 3 a 4 lavados (agregar solución amortiguadora, mezclar, esperar separación de fases y eliminar la solución) con solución amortiguadora Tris (1M) pH 8, y luego con 0,1 M de Tris pH 8 hasta que el pH de la solución de fenol sea mayor que 7,6.

Almacenar a 4°C. En estas condiciones es estable durante 1 ó 2 meses. La solución se mantiene estable por 1 mes a 4°C.

b) A partir de fenol cristalizado (para 500 g).

Agregar directamente a la botella que contiene el fenol 140 ml de agua destilada. Una vez disuelto, agregar 10 % de M-Cresol y agitar durante 1 hora. Agregar 0,68 g de 8-hidroxiquinolina y agitar nuevamente por 1 hora.

Dejar a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente estabilizar el pH como para el fenol líquido.

NOTA:Todo este trabajo debe realizarse bajo una campana extractora. Usar guantes gruesos y una mascarilla. El fenol puede causar quemaduras y es tóxico. Usar lentes especiales cuando se realiza la mezcla.

REFERENCIAS

MARTINEZ, E. 1984. La tinción de geles en electroforesis con nitrato de plata y su aplicación para identificar viroides. Tesis Biol. Univ. Nac. Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. 39 pp.

MORRIS, T.J. y N.S. WRIGHT. 1975. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. Am. Potato J. 52: 57.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

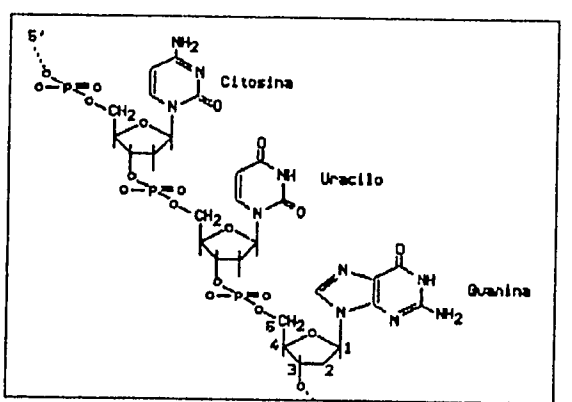
MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.4 DETECCION / PSTVd

Fascículo 3.4.3 Hibridación de Acidos Nucleicos

Los virus son complejos de proteínas y ácidos nucleicos infecciosos capaces de dirigir su propia replicación al infectar una célula hospedera específica. Los viroides se comportan de una forma similar, pero están compuestos solamente por ácidos nucleicos circulares sin cubierta proteica.

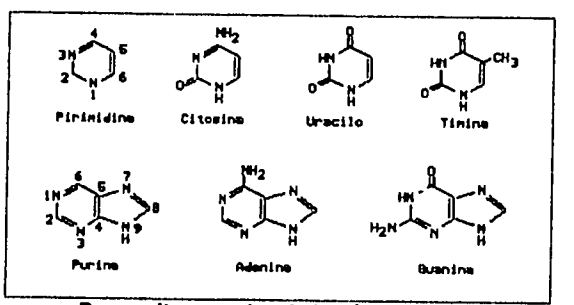
La estructura química de los ácidos nucleicos y su conformación molecular han hecho posible desarrollar recientemente las técnicas de hibridación que permiten detectar la existencia de los virus y viroides con niveles de sensibilidad y especificidad muy altos.



Cadena de nucleóticos del RNA

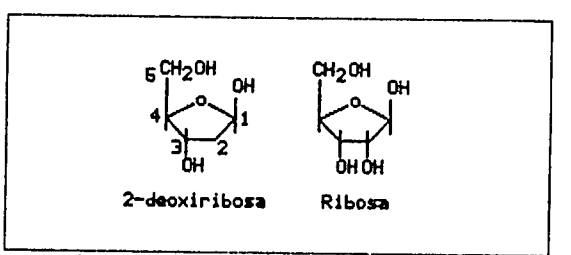
Los ácidos nucleicos son moléculas formadas por cadenas de monómeros llamados nucleó-tidos. Cada nucleótido contiene tres componentes característicos:

a) Base nitrogenada. Puede ser derivada de una purina (adenosina o guanina) o de una pirimidina (citosina, uracilo y timina).



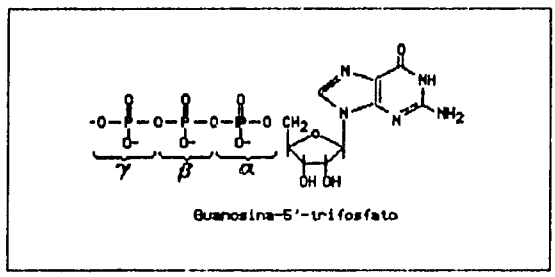
Bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos

b) Pentosa. La desoxirribosa en el caso del DNA y la ribosa en el caso de RNA.

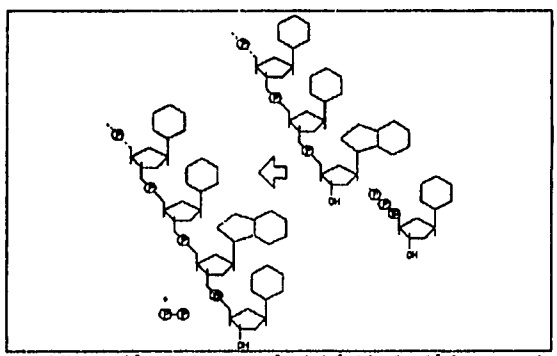


Pentosas presentes en los ácidos nucleicos

c) Acido fosfórico. Proporciona la energía necesaria para la formación de los enlaces fosfodiéster en la cadena de nucleótidos.

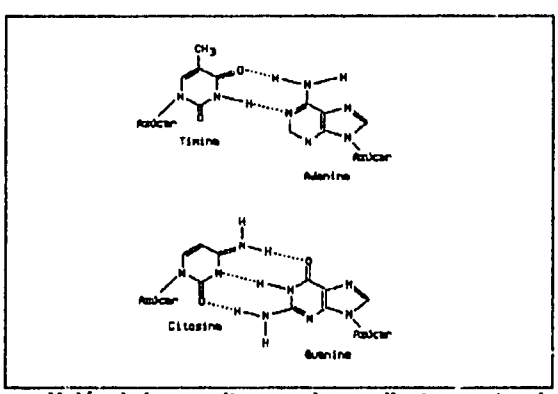


Gupo trifosfato componente de los nucleóticos



Liberación de la energía del ácido fosfórico para la formación del enlace fosfodiéster

Las bases nitrogenadas forman pares de bases mediante puentes de hidrógeno. La adenina se une con la timina o el uracilo mediante dos puentes de hidrógeno, mientras que la citosina se une con la guanina mediante tres puentes de hidrógeno.



Unión de bases nitrogenadas mediante puentes de higrógeno

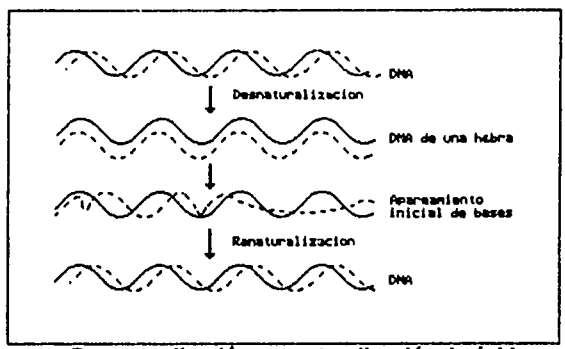
Es posible obtener cadenas dobles de DNA, cadenas dobles de RNA y cadenas dobles mixtas de DNA-RNA. Estas cadenas dobles tienen una conformación tridimensional de doble hélice. Las dos hebras pueden separarse fácilmente cuando se rompen los enlaces de hidrógeno entre las bases apareadas.

DNA - DNA	RNA - RNA	DNA - RNA
T - A	U - A	T - A
A - T	A - U	A - U
A - T	A - U	A - U
T - A	U - A	T - A
A - T	A - U	A - U
C - G	C - G	C - G
C - G	C - G	C - G
G - C	G - C	G - C
G - C	G - C	G - C
C - G	C - G	C - G
C - G	C - G	C - G
C - G	C - G	C - G
A - T	A - U	A - U

DNA = A, T, G, C
RNA = A, U, G, C

Cadenas doble de DNA, RNA, Y DNA-RNA

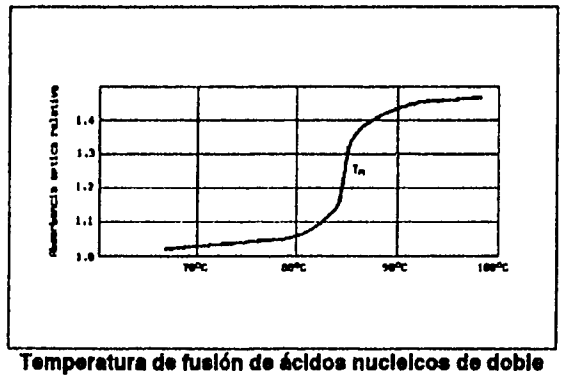
La desnaturalización puede lograrse calentando la solución de DNA o añadiendo un álcali o ácido para ionizar las bases. Si la solución se enfría lentamente o se contrarresta el grado de pH, las hebras de DNA vuelven a aparearse y ocurre la renaturalización de la doble hélice. El desenrollamiento o fusión de DNA se traduce en un incremento de su absorbancia a 260 nm., efecto que se denomina hipercrómico.



Desnaturalización y renaturalización de ácidos nucleicos

La temperatura de fusión (Tm) se define como aquella en la cual se disocia la mitad de la estructura helicoidal.

El aspecto más importante de la doble hélice es la especificidad de sus bases; una hebra es complementaria a la otra. Si una muestra de ácido nucleico desnaturalizado se fija en un membrana de nitrocelulosa y además se pone en contacto, bajo ciertas condiciones de temperatura y fuerza iónica, con otra muestra desnaturalizada, ocurrirá la hibridación si las hebras son complementarias entre sí.

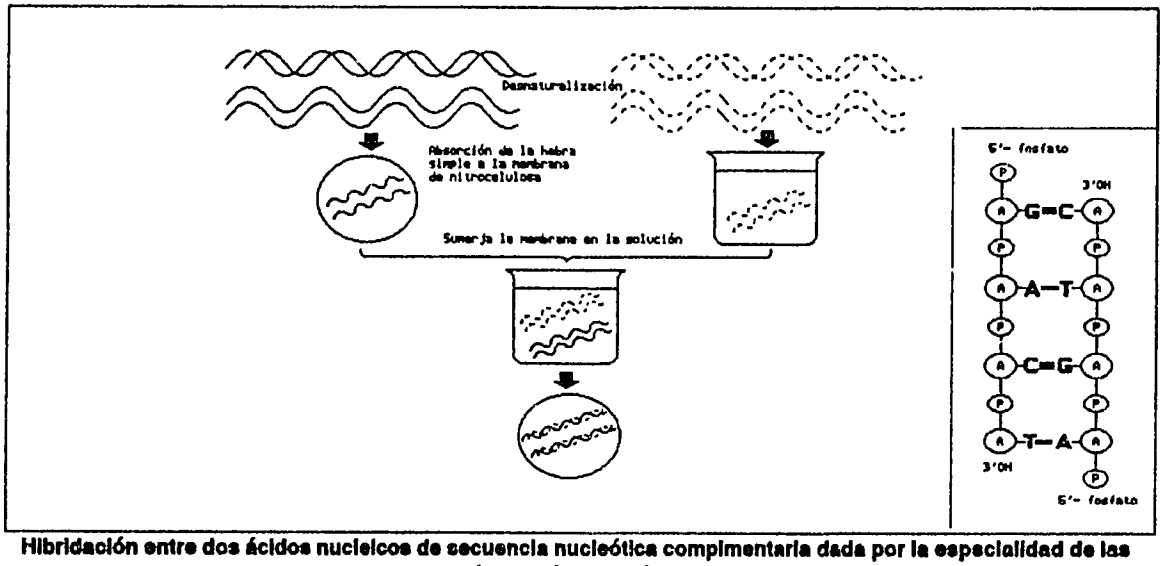


Temperatura de fusión de ácidos nucleicos de doble cadena

REFERENCIAS

OLD, R.W. y S.B. PRIMROSE. 1985. Principios de Manipulación Genética. Editorial Acribia, S.A., España. 375 pp.

Nucleic acid Hibridization, a practical approach. 1988. Edited by B.D. Hames & S.J. Higgins. IRL Press Limited, England. 245 pp.



Hibridación entre dos ácidos nucleicos de secuencia nucleótica complmentaria dada por la especialidad de las bases nitrogenadas

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.4 DETECCION / PSTVd

Fascículo 3.4.4 Preparación de Muestras para la Detección de PSTVd mediante Hibridación de Ácidos Nucleicos

Antes de realizar el análisis de las muestras, leer cuidadosamente las instrucciones y verificar si se dispone de todo el material necesario para completar la prueba.

1. Tratamiento de las membranas de nitrocelulosa

Advertencia: las membranas de nitrocelulosa son tóxicas; se debe tener mucho cuidado al manipularlas y en todo momento se debe utilizar guantes y pinzas. No tocar las membranas con los dedos ya que las impresiones digitales pueden producir reacciones inespecíficas.

Cortar las membranas en un tamaño adecuado según el número de muestras (12 x 16 cm para 150 muestras). Trazar cuadrados de 1 cm de lado con un lapicero. Remojar en agua destilada y lavar 2 veces durante diez minutos cada vez en SSC 20X*.

SSC 20X	
NaCl 3M	175,32 g
Citrato de sodio dihidratado 0,3M	88,23 g

Disolver en 800 ml de agua destilada. Corregir el pH a 7,0 con NaOH. Agregar agua destilada hasta un volumen final de 1 000 ml

*Nota: para desarrollar la prueba utilizando el procedimiento no radiactivo, lavar las membranas como se indica pero utilizando SSC 10X.

Colocar las membranas sobre papel filtro y dejar secar completamente a temperatura ambiente o bajo una lámpara.

2. Preparación de las muestras

Cuando se colecten las muestras en bolsas de plástico, recordar siempre que deben ser identificadas apropiadamente.

a) Hojas y brotes:

Colectar las muestras en bolsas plásticas (hojas de la parte apical de la planta - 1 ó 2 foliolos - y brotes de cualquier parte del tubérculo).

Nota: Las muestras de hojas o brotes nunca deben ser congeladas a -20°C antes de ser procesadas. Se pueden guardar en una refrigeradora común a 4°C durante dos días como máximo. Los tubérculos almacenados a 4°C tienen que estar por lo menos dos semanas a temperatura ambiente antes de ser procesados.

Macerar la muestra en la bolsa con 2 volúmenes de solución amortiguadora de extracción (2 ml por gramo de muestra) y transferir la savia a un tubo de ensayo o Eppendorf mantenido sobre hielo.

Solución amortiguadora de extracción

1)	Formaldehído al 37%	49,4 ml
	SSC 10X	50,6 ml
2) *	K_2HPO_4	200 mM
	DIECA	10 mM
	DTT	5 mM
	Tritón X-100	1%

(*Incluida en los kits)

Agregar inmediatamente 1/2 de volumen de fenol saturado (ver apéndice a para su preparación) y 1/2 de volumen de cloroformo; mezclar bien con un agitador de tubos (vortex). Procesar las muestras restantes.

Precauciones: el fenol debe ser utilizado cuidadosamente ya que puede causar quemaduras en la piel. Si esto sucede, lavarse con abundante agua y jabón y luego tratar la quemadura con etanol.

Dejar los tubos en la refrigeradora a 4°C durante toda la noche o centrifugar durante 5 minutos a una velocidad mayor de 2 000 rpm para separar las fases.

Con la ayuda de un pipetor o una pipeta Pasteur, colocar de 3 a 5 ul ó una gota del sobrenadante claro (o = 0,4 cm) sobre la membrana de nitrocelulosa. Identificar las muestras en la membrana utilizando una hoja de datos como guía.

Hornear la membrana a 80°C durante 2 horas. Guardarla en un lugar seco hasta el momento de la hibridación.

Nota: Para desarrollar la prueba utilizando el sistema no radiactivo, es improtante centrifugar siempre las muestras durante 5 minutos a 8 000 -10 000 rpm para separar las fases y obtener un sobrenadante más limpio.

b) Semilla botánica:

Poner la cantidad adecuada de semillas (ver Apéndice b) en un tubo de vidrio. Cada muestra no debe contener más de 100 semillas. Embeber en agua destilada durante 2 horas como mínimo o durante toda la noche.

Pasar las semillas a mortero, drenar el agua con una pipeta Pasteur o inclinando el mortero y añadir solución amortiguadora de extracción (0,5 ml por cada 25-50 semillas).

Macerar completamente y pasar a tubos de ensayo o Eppendorf mantenidos sobre hielo.

Agregar inmediatamente 1/2 de volumen de fenol saturado (ver apéndice a para su preparación) y 1/2 de volumen de cloroformo; mezclar bien con un agitador de tubos (vortex). Procesar las muestras restantes.

Precauciones: el fenol debe ser utilizado cuidadosamente ya que puede causar quemaduras en la piel. Si esto sucede, lavarse con abundante agua y jabón y luego tratar la quemadura con etanol.

Dejar los tubos en la refrigeradora a 4°C durante toda la noche o centrifugar durante 5 minutos a una velocidad mayor de 2 000 rpm para separar las fases.

Con la ayuda de un pipetor o una pipeta pasteur, colocar de 3 a 5 ul ó una gota del sobrenadante claro (o = 0,4 cm) sobre la membrana de nitrocelulosa. Identificar las muestras en la membrana utilizando una hoja de datos como guía.

Hornear la membrana a 80°C durante 2 horas. Guardarla en un lugar seco hasta el momento de la hibridación.

Nota: Para desarrollar la prueba utilizando el sistema no radiactivo, es improtante centrifugar siempre las muestras durante 5 minutos a 8 000 -10 000 rpm para separar las fases y obtener un sobrenadante más limpio.

112

3. Apéndice

a) Preparación de fenol saturado

Precaución: Trabajar bajo una campana extractora. Usar guantes gruesos, lentes especiales y una mascarilla. El fenol puede causar quemaduras y es muy tóxico cuando se realiza la mezcla.

Apartir del fenol líquido:

Agregar 0,1% de 8-hidroxiquinolina y 10% de m-cresol en el fenol líquido. Agitar 1 hora. Para estabilizar el pH, realizar de 3 a 4 lavados (agregar la solución amortiguadora, mezclar, esperar separación de fases y eliminar la solución) con solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, luego con 0,1M Tris-HCl pH 8,0 hasta que el pH de la solución de fenol sea mayor que 7,6.

Para preparar la solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, disolver 121,1 g de Tris en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 utilizando HCl 0,1N (aproximadamente 29 ml) y agregar agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1 000 ml. Esterilizar en autoclave.

A partir del fenol cristalizado (para 500 g):

Agregar 140 ml de agua destilada directamente a la botella que contiene fenol. Una vez disuelto, agregar 10% de m-cresol y agitar 1 hora. Agregar 0,68 g de 8-hidroxiquinolina y agitar 1 hora más. Dejar a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente estabilizar el pH como en el caso del fenol líquido. Almacenar a 4^0C en botellas de vidrio de color ambar. En estas condiciones el fenol saturado es estable por uno o dos meses.

b) Cantidad de semilla que debe probarse de acuerdo al tamaño del lote y con tres niveles de precisión

Nota: Ya que cada muestra a probar debe tener un máximo de 100 semillas, cada vez que se requiera probar más de 100 semillas, la muestra puede dividirse en submuestras. Por ejemplo, si se requiere probar 139 semillas, deben tomarse dos submuestras de aproximadamente 70 semillas cada una. Para probar una muestra de 3 457 semillas, ésta debe ser dividida en 34 ó 35 submuestras de 100 semillas cada una.

Número de semillas en el lote	Nivel de precisión deseado		
	10%	5%	1%
<25	Probar cada plántula		
26-99	Probar el 20% del lote		
100	26	58	97
250	31	89	233
500	32	109	437
750	33	117	617
1 000	34	121	775
2 000	35	130	1 267
5 000	35	135	2 044
10 000	35	136	2 569
100 000	35	139	3 342
200 000	35	139	3 398
300 000	35	139	3 417
400 000	35	139	3 327
500 000	35	139	3 433
1 000 000	35	139	3 445
10 000 000	35	139	3,457

REFERENCIAS

MELTON, D.A., P.A. KRIEG, M.R. REBAGLIATI, T. MANIATIS, K. ZINN y M.R. GREEN. 1984. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acid Research 12: 7035-7056.

OWENS, R.A. y T.O. DIENER. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hibridization. Science 213: 670-672.

BOULTON, R.E., G.I. JELLIS, D.C. BAULCOMBE y A.M. SQUIRE. 1986. The application of complementary DNA probes to routine virus detection with particular reference to potato viruses. en Developments and applications in virus testing. Jones R.A.C. y L. Torrance editores, Great Britain. pp. 41-53.

HOPP, H.E., L. GIAVEDONI, M.A. MANDEL, A. ARESE, B. ORMAN, F. BRAVO ALMONACID, H.N. TORRES y A.N. MENTABERRY. 1988. Biotinylated nucleic acid hybridization probes for potato virus detection. Archives of Virology 103:231-

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.4 DETECCION / PSTVd

Fascículo 3.4.5 Preparación de Sondas con ^{32}P Mediante el Sistema de Transcripción

Esta técnica de detección de PSTVd está basada en la hibridación de una molécula altamente radiactiva de RNA complementario al PSTVd, con el PSTVd presente en la muestra previamente fijada en una membrana de nitrocelulosa. El híbrido resultante es detectado mediante una autoradiografía.

1. Marcaje (RNA-transcription)

El sistema de transcripción es un proceso mediante el cual el mensaje genético contenido en una molécula de DNA es transcrito en forma de RNA. Este método está limitado a secuencias clonadas dentro de vectores específicos útiles para este fin.

La transcripción requiere de la presencia de un promotor (por ejemplo, SP6 ó T7) reconocido por la RNA polimerasa correspondiente, y la secuencia de cDNA tiene que estar ubicada luego del promotor.

Para asegurar la síntesis de únicamente la secuencia deseada, el plásmido es linearizado inmediatamente después de la secuencia clonada, de este modo, la transcripción empieza en correspondencia del promotor, sigue a lo largo de la molécula clonada y se interrumpe en el punto de linearización.

Si en la mezcla uno de los nucleótidos se encuentra en forma radiactiva o marcada, éste será incluido en la síntesis de la nueva molécula de RNA. La degradación del plásmido utilizado como molde por acción de una DNasa permite obtener el RNA marcado en forma pura. Para el marcaje se utiliza el "Riboprobe Gemini System II" (Promega) y nucleótido radiactivo "Uridine-5'-triphosphate" (^{32}P, actividad específica: 650 Ci/ mmol, concentración: 10 mCi/ml).

Advertencia: el desarrollo del método pide la utilización de material radiactivo. Usar guantes en todos los pasos y tener el cuidado necesario para un manejo seguro. El material radiactivo tiene que ser eliminado en recipientes apropiados y almacenados siguiendo las indicaciones de la institución responsable de la seguridad nuclear. El tiempo de vida media del ^{32}P es de 14 días; en consecuencia, el tiempo mínimo de almacenamiento para que la radiactividad sea nula es de aproximadamente 4 a 5 meses.

Mezclar en un tubo Eppendorf a temperatura ambiente en el mismo orden lo siguiente:

5X "transcription buffer"	4 ul
DTT 100 mM	2 ul
RNasin (Promega)	1 ul
GTP 10mM	1 ul
ATP 10 mM	1 ul
CTP 10 mM	1 ul
a^{32}P-UTP 10 mCi/ml (70 uCi)	7 ul
RNA polymerase (SP6 ó T7, según el promotor contenido en el plásmido, 15-20 unidades/ul)	1 ul
Plásmido linearizado (= 1 ug)	2 ul

Mezclar bien y centrifugar brevemente. Incubar a 38°C durante 120 minutos en baño maría. Agregar 1 ul RQ1 DNasa (1 unidad/ul) e incubar a 37°C durante 20 minutos. Luego adicionar 179 ul ddH_2O y mezclar.

Agregar 100 ul de fenol saturado y 100 ul de cloroformo. Mezclar en agitador de tubos (vórtex) y centrifugar durante 2 ó 5 minutos.

Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y agregar 200 ul de cloroformo. Mezclar en agitador de tubos (vórtex) y centrifugar durante 2 ó 5 minutos.

Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y agregar 20 ul de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 550 ul de etanol frío.

Mezclar y poner a -70°C por 30 minutos o más. Luego descongelar 5 minutos y centrifugar durante 15 minutos a 14 000 rpm, aproximadamente. Eliminar el sobrenadante (chequear a 10 cm de distancia; el sobrenadante debe medir 0,5 mR; el pellet de 1 a 1,5 mR a 10X) y voltear el tubo Eppendorf para secar el pellet.

Resuspender el pellet en 100 ul de $T_{10}E_1$ con 1% de mercaptoetanol y mezclar bien. Guardar a -70°C hasta su utilización.

2. Medición de la incorporación

Cortar papel filtro 3MM Whatman en cuadrados de 2 por 0,5 cm. Colocar 1 ul de RNA marcado en el centro del papel y dejar secar completamente.

Lavar el papel filtro como sigue:

2 veces durante 5 minutos en TCA al 5%
1 vez durante 5 minutos en etanol al 70%
1 vez durante 5 minutos en etanol absoluto

Dejar secar completamente. Colocar el papel filtro dentro de la tapa de plomo utilizada para el transporte del nucleótido radiactivo. Colocar el contador Geiger sobre la tapa y medir la radiactividad como se muestra en el cuadro al final de la página siguiente.

3. Hibridación

Poner la membrana en una bolsa plástica específica para este fin, sellar la bolsa y cortar una esquina. Para una membrana de 12 x 16 cm, poner 9,6 ml de solución amortiguadora de hibridación en la bolsa, cerrar e incubar en baño maría a 55°C durante 10 minutos.

Solución amortiguadora de hibridación

Solución stock	x 40 ml	Conc. final
Formamida desionizada	20 ml	50%
Cacodilato de sodio 200 mM	5 ml	25 mM
SDS al 20%	0,25 ml	0,125%

Completar con H_2O hasta volumen final

Desnaturalizar el "calf-thymus DNA" (stock: 6 mg/ml) calentándolo a 100°C durante 5 minutos; colocarlo inmediatamente sobre hielo.

Agregar 1 ml de "calf-thymus DNA" en la bolsa y mezclar bien. Incubar a 55°C durante 10 minutos.

Agregar 2,4 ml de sulfato de dextran (previamente calentado a 55°C, stock al 50%) e incubar a 55°C durante 10 minutos más.

Agregar la cantidad adecuada de sonda (calculada como ya se indicó) para obtener una concentración final de 400 000 CPM/ml de solución amortiguadora de hibridación (por ejemplo: 9,6 + 1 + 2,4 = 13 ml).

Mezclar bien los componentes, sellar la bolsa plástica evitando la formación de burbujas de aire. Incubar, a 55°C en el caso de viroides y a 45°C en el caso de virus, en baño maría durante toda la noche.

Al día siguiente, retirar la bolsa, cortar una esquina y retirar la solución amortiguadora de hibridación (*cuidado, es altamente radiactiva y tiene que ser eliminada en un recipiente apropiado*).

3. Lavado

Los pasos de lavado se deben realizar en una bandeja metálica y utilizando un agitador rotatorio. Luego de su utilización, las soluciones de lavado deben ser eliminadas según lo indicado.

Solución amortiguadora de lavado N°1

NaCl 0,36M (21 g/l)

Tris base 20 mM (2,4 g/l)

HCl 1,48 ml/l (diluir 1,75 ml de HCl al 37% en 10 ml de agua y de éstos usar 8 ml)
SDS 0,1%

Solución amortiguadora de lavado N°2

SSC 0,1X
SDS 0,1%

Solución amortiguadora de lavado N°3

SSC 2X

Lavar como sigue:

2 veces durante 20 minutos en solución amortiguadora N°1 a temperatura ambiente

1 vez durante 30 minutos en solución amortiguadora N°2 en baño maría a 65°C

2 veces durante 10 minutos en solución amortiguadora N°3 a temperatura ambiente

1 vez durante 20 minutos en 100 ml de solución amortiguadora N°3 con 20 ul de RNasa (stock: 10 mg/ml) a temperatura ambiente (concentración final de 2 ug/ml)

1 vez durante 20 minutos en solución amortiguadora N°2 en baño maría a 50°C

Al terminar los lavados, secar las membranas bajo una lámpara que emane calor moderado o a temperatura ambiente.

Medición de la radiactividad (cálculo de los CPM - "Counts per Minute")

mR	Ampl	mR x Ampl = mR totales	mR totales x 2500 = CPM	PM x 17,8 = CPM/ul	400 000 / CPM/ul = ul/ml	ul/ml x ml S. hibridación = ul totales

4. Autoradiografía

Colocar la membrana seca en el cassette (trabajar cuidadosamente y con guantes; la membrana es radiactiva) y fijarla con cinta adhesiva en las esquinas para evitar que se mueva. Cubrir la membrana con plástico no electrostático para evitar la contaminación de la placa fotográfica.

Los siguientes pasos deben realizarse en un cuarto oscuro provisto de luz roja apropiada (luz con filtro GBX-2) y utilizando guantes:

a) Posicionar una placa fotográfica (Kodak X-Omat AR ó similar) sobre de la membrana y cubrir con "intensifying screen".

b) Cerrar el cassette.

c) Poner a -70°C durante el tiempo adecuado, generalmente 24 horas.

d) Retirar del congelador y desarrollar al momento.

e) Sacar la placa fotográfica del cassette en un cuarto oscuro y cortar una esquina para identificar la posición original dentro del cassette.

f) Desarrollar durante 2 minutos en "developer" (solución de desarrollo) en una bandeja de metal a 22-23°C agitando las membranas suavemente.

g) Enjuagar brevemente en agua.

h) Colocar las membranas en "fixer" durante 2 minutos (solución fijadora).

i) Lavar con abundante agua corriente (bajo el caño abierto) y finalmente enjuagar con agua destilada.

j) Secar las placas.

Identificar los resultados colocando la placa fotográfica encima de la membrana y localizando la posición de las manchas de los positivos.

5. Preparación de soluciones

a) SSC 20X (1 litro)

175,32 g de NaCl (3M)
88,23 g de citrato de sodio dihidratado (0,3M)

Disolver en 800 ml de agua destilada. Corregir el pH a 7,0 con NaOH. Llevar el volumen a 1 litro. Si es necesario, esterilizar en una autoclave.

b) Formamida desionizada (200 ml)

Mezclar 200 ml de formamida y 7 g de "mixed-bed, ion-exchange resin" (Bio-Rad AG 501-X8, 20-50 mesh) en un beaker. Agitar lentamente con un magneto durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente. Filtrar a través de papel filtro Whatman N°1. Repetir esta operación con 7 g más y filtrar. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.

c) SDS 20% (100 ml)

Disolver 20 g de "electrophoresis-grade SDS" en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar la disolución. Corregir el pH a 7,2 con HCl concentrado. Llevar el volumen a 100 ml. No se necesita esterilizar.

d) Acetato de sodio 3M pH 5,2 (10 ml)

Disolver 2,46 g de CH_3COONa (PM 82,03) en 8 ml de ddH_2O y corregir el pH a 5,2 agregando CH_3COOH. Completar a 10 ml con ddH_2O. Esterilizar en autoclave.

e) Solución amortiguadora cacodilato de sodio (200 mM)

Solución stock	x 100 ml	Conc. final
Cacodilato de sodio	2,72 g	170 mM
Acido cacodílico	0,414 g	30 mM
NaCl	10,4 g	1,8 M
EDTA (Stock: 500 mM, pH 8,0)	2 ml	10 mM

Disolver en agua destilada estéril y llevar al volumen final. Usar guantes y mascarilla en la preparación porque es muy tóxico.

f) $T_{10}E_1$ + mercaptoetanol 1%

Para 100 ml, diluir 1 ml de TrisHCl 1M pH 8,0 y 0,2 ml de EDTA 500mM pH 8,0 en dH_2O, autoclavar y luego agregar 1% de mercaptoetanol. Dividir en alícuotas y almacenar a -20°C.

g) TCA al 5%

Para la preparación de 500 ml, disolver en agua destilada estéril 25 g de ácido tricloroacético y 1,42 g de Na_2HPO_4. Agitar hasta que se disuelva completamente y llevar al volumen final. La concentración de Na_2HPO_4 será 0,02M.

h) Sulfato de dextran 50%

Disolver 50 g en agua destilada, llevar el volumen a 100 ml. Para disolver completamente, calentar en baño maría a 60-70°C. La solución es muy densa; almacenar a -20°C.

i) EDTA 500mM pH 8,0

Para la preparación de 100 ml, pesar 18,6 g de EDTA (PM 372,2) y diluir en agua destilada estéril. La disolución es muy lenta. Agregar NaOH en pastillas hasta obtener un pH de 8,0. Agregar agua destilada estéril hasta completar al volumen final.

j) Calf thymus DNA (6 mg/ml)

Disolver 1 g en 170 ml de agua destilada estéril en agitación por toda la noche a 4°C (poner alta la velocidad del agitador porque a medida que se va disolviendo, el DNA se vuelve más denso). Pasar con fuerza el DNA disuelto por una jeringa 2 ó 3 veces para romperlo más. Dividir en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf y guardar a -20°C.

k) RNasa (10 mg/ml)

En 10 ml de ddH_2O agregar 50 ul de Tris-HCl 2M pH 7,5 (concentración final: 10 mM) y 40 ul de NaCl 4M (concentración final: 15 mM). Pesar 10 mg/ml de "Ribonuclease A" (Type 1A, Sigma R4875) y disolver en agitación. Poner a baño maría a 100°C durante 15 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y luego dividir en alícuotas en tubos Eppendorf y almacenar a -20°C.

l) Soluciones requeridas

-Marcaje: Kit (Promega), nucleótido ^{32}P-UTP (ICN), RQ1 DNasa, DTT (100 mM), RNasin, fenol saturado, cloroformo, acetato de sodio 3M pH 5,2, etanol, $T_{10}E_1$ + M.E. 1%.

-Medición de la incorporación: TCA al 5%, etanol al 70%, etanol absoluto.

-Hibridación: formamida, cacodilato de sodio, EDTA, SDS, Calf thymus DNA (6 mg/ml), sulfato de dextran 50%.

-Lavado: SSC, SDS, RNasa (10 mg/ml).

-Revelado de placas fotográficas: solución de desarrollo ("developer"), solución fijadora ("fixer").

6. Preparación de fenol saturado

Precaución: Trabajar bajo una campana extractora. Usar guantes gruesos, lentes especiales y una mascarilla. El fenol puede causar quemaduras y es muy tóxico cuando se realiza la mezcla.

a) Apartir del fenol líquido:

Agregar 0,1% de 8-hidroxiquinolina y 10% de m-cresol en el fenol líquido. Agitar 1 hora. Para estabilizar el pH, realizar de 3 a 4 lavados (agregar la solución amortiguadora, mezclar, esperar separación de fases y eliminar la solución) con solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, luego con 0,1M Tris-HCl pH 8,0 hasta que el pH de la solución de fenol sea mayor que 7,6.

Para preparar la solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, disolver 121,1 g de Tris en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 utilizando HCl 0,1N (aproximadamente 29 ml) y agregar agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1 000 ml. Esterilizar en autoclave.

b) A partir del fenol cristalizado (para 500 g):

Agregar 140 ml de agua destilada directamente a la botella que contiene fenol. Una vez disuelto, agregar 10% de m-cresol y agitar 1 hora. Agregar 0,68 g de 8-hidroxiquinolina y agitar 1 hora más. Dejar a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente estabilizar el pH como en el caso del fenol líquido. Almacenar a 4°C en botellas de vidrio de color ambar. En estas condiciones el fenol saturado es estable por uno o dos meses.

REFERENCIAS

MELTON, D.A., P.A. KRIEG, M.R. REBAGLIATI, T. MANIATIS, K. ZINN y M.R. GREEN. 1984. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acid Research 12: 7035-7056.

OWENS, R.A. y T.O. DIENER. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hibridization. Science 213: 670-672.

BOULTON, R.E., G.I. JELLIS, D.C. BAULCOMBE y A.M. SQUIRE. 1986. The application of complementary DNA probes to routine virus detection with particular reference to potato viruses. en Developments and applications in virus testing. Jones R.A.C. y L. Torrance editores, Great Britain. pp. 41-53.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.4 DETECCION / PSTVd

Fascículo 3.4.6 Preparación de Sondas con ^{32}P Mediante la Técnica "nick translation"

El procedimiento para preparar sondas marcadas con fósforo radiactivo mediante esta técnica tiene varias etapas: marcaje, medición de la incorporación, pre-hibridación, hibridación, lavado y autoradiografía.

1. Marcaje

El método "Nick Translation" consiste en crear grupos 3'OH libres dentro de la molécula de DNA utilizando una nucleasa (DNA nuclease I). La DNA polimerasa utiliza estos extremos como puntos de inicio para una nueva síntesis de DNA utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Si en la mezcla de reacción está presente uno de los nucleótidos en forma radiactiva, éste también será incorporado en la molecula que se va a sintetizar. Para el marcaje se utiliza el "Nick Translation Reagent Kit" (BRL) y un nucleótido marcado con a^{32}P (por ejemplo (^{32}P)dCTP, actividad específica: 650 Ci/mmol, concentración: 10 mCi/ml).

En un tubo Eppendorf sobre hielo mezclar en orden lo siguiente:

..... ul	ddH_2O estéril*
5 ul	Solución A (todos los nucleótidosdNTPs menos el marcado)
..... ul	Plásmido (= 1 ug)*
..... ul	(^{32}P)dNTP (=180 pmol/50 ml)*

*Volumen final: 45 ul, ver apéndice

Mezclar y añadir 5 ul de la solución C (DNA polimerasa I / DNasa I). Centrifugar brevemente e incubar en baño maría a 16°C durante 60 minutos. Luego de la incubación añadir:

3 ul	H_2O
5 ul	Solución D "stop-buffer"
1 u	SDS al 20%
1 u	"yeast tRNA (20 mg/ml solución stock)
30 ull	Acetato de amonio 7,5M (Concentración final 2,5M)

Mezclar y añadir:

40 ul	Fenol saturado
40 ul	Cloroformo

Agitar y centrifugar durante 5 minutos. Luego transferir la fase acuosa a otro tubo Eppendorf y añadir 225 ul de etanol. Incubar a -20°C durante toda la noche ó a -70°C durante 1 hora y centrifugar por 15 minutos. Eliminar el sobrenadante y añadir al pellet lo siguiente:

90 ul	SSC 1X
10 ul	Acetato de sodio 3M pH 5,2
	Mezclar bien y añadir :
225	Etanol

Incubar a -20°C durante toda la noche o a -70°C durante 1 hora y centrifugar por 15 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet al vacío. Resuspender el pellet en 100 ul de $T_{10}E_1$ y almacenar a -20°C hasta su utilización.

2. Medición de la incorporación

Diluir el (^{32}P)-DNA:

1 ul	DNA
39 ul	H_2O

Cortar papeles filtro 3MM Whatman de 2 por 0,5 cm e identificarlos con un lápiz. Con la ayuda de un pipetor colocar en el centro de cada papel 0 ul, 2ul, 5ul, 10 ul y 20 ul del DNA marcado diluido como ya se indicó y dejar secar completamente. Lavar el papel filtro como sigue:

3 veces durante 5 minutos en TCA al 5% (en TCA el DNA precipita pero el trifosfato no)

1 vez durante 5 minutos en etanol al 70%

1 vez durante 5 minutos en etanol absoluto

Nota: tener mucho cuidado al desechar estas sustancias de lavado porque son altamente radiactivas. Utilizar un recipiente adecuado.

Dejar secar los papeles sobre papel tissue y bajo una lámpara de luz. Poner de uno en uno los papeles filtro dentro de la tapa de plomo utilizada para el transporte del (a^{32}P)dNTP. Colocar el contador Geiger sobre la tapa y medir los CPM de cada papel como se muestra en el cuadro al final de la página.

3. Pre-hibridación

Solución amortiguadora de pre-hibridación e hibridación:

Solución stock	x 50 ml	Conc. final
SSC 20X	13,0 ml	5X
$NaPO_4$ 1M pH 6,5	2,5 ml	50mM
Denhardt's solution 50X	5 ml	5X
EDTA 0,25M	0,5 ml	2,5 mM
SDS al 20%	1,5 ml	0,6%
Formamida desionizada	25,0 ml	50%
Sulfato de dextran al 50%	*	5%
Herring Sperm DNA 10mg/ml	*	100 ug/ml

Medición de la Radiactividad (Cálculo de los CPM - Counts per Minute)

ul aplicados	ul reales	mR	Ampl	mR x Ampl = mR total	mR total x 2 500 = CPM	CPM x 17,8 = CPM/ul	1 000 000 CPM/ml / CPM/ul = ul/ml	ul/ml x ml s. hibridación = ul totales

* Añadir la cantidad requerida directamente en la bolsa en el orden siguiente:

-9 ml de solución amortiguadora de pre-hibridación
-120 ul Herring Sperm DNA**
-1 ml sulfato de dextran

** Desnaturalizar inmediatamente antes de usar y luego añadir directamente en la bolsa.

Colocar la membrana en una bolsa plástica específica para este fin, sellar la bolsa y cortar una esquina.

Desnaturalizar el Herring Sperm DNA, calentándolo a 100°C durante 10 minutos y enfriándolo en hielo.

Para una membrana de 12 x 16 cm, agregar 9 ml de solución amortiguadora de pre-hibridación. Esperar que el papel esté completamente húmedo y añadir 120 ul de Herring Sperm DNA desnaturalizado y 1 ml del sulfato de dextran previamente calentado a la temperatura de pre-hibridación. Mezclar bien.

Sellar la bolsa evitando la formación de burbujas de aire. Pre-hidridizar a 45°C (para los virus) ó a 55°C (para los viroides) durante dos horas.

4. Hibridación

Desnaturalizar la sonda o "probe" calentándola a 100°C por 10 minutos y poniéndola inmediatamente después sobre hielo.

Cortar una esquina de la bolsa y agregar la sonda en la cantidad calculada. Mezclar bien y sellar, evitando dejar burbujas de aire en la bolsa. Incubar toda la noche en baño maría a 45°C (para los virus) ó a 55°C (para los viroides).

Al día siguiente, retirar la bolsa, cortar una esquina y eliminar la solución amortiguadora de hibridación con extrema precaución y en un recipiente adecuado ya que es altamente radiactivo.

5. Lavado

Los pasos de lavado se deben realizar en una bandeja metálica y utilizando un agitador rotatorio. Luego de su utilización, las soluciones de lavado deben ser eliminadas según lo indicado.

Lavar como sigue:

2 veces durante 15 minutos en solución amortiguadora N°1 (SSC 2X, SDS 0,1%) a temperatura ambiente
1 vez durante 30 minutos en solución amortiguadora N°2 (SSC 0,2X, SDS 0,2%) en baño maría a 37°C
1 vez durante 30 minutos en solución amortiguadora N°3 (SSC 0,1X, SDS 0,2%) en baño maría a 55°C

Al terminar los lavados, secar las membranas bajo una lámpara que emane calor moderado o a temperatura ambiente.

6. Autoradiografía

Poner la membrana seca en el cassette (*trabajar cuidadosamente y con guantes; la membrana es radiactiva*) y fijarla con cinta adhesiva en las esquinas para evitar que se mueva. Cubrir la membrana con plástico no electrostático para evitar la contaminación de la placa fotográfica.

Los siguientes pasos deben realizarse en un cuarto oscuro provisto de luz roja apropiada (luz con filtro GBX-2) y utilizando guantes:

a) Posicionar una placa fotográfica (Kodak X-Omat AR ó similar) sobre de la membrana y cubrir con "Intensifying screen".

b) Cerrar el cassette.

c) Poner a -70°C durante el tiempo adecuado, generalmente 24 horas.

d) Retirar del congelador y desarrollar al momento.

e) Sacar la placa fotográfica del cassette en un cuarto oscuro y cortar una esquina para identificar la posición original dentro del cassette.

f) Desarrollar durante 2 minutos en "developer" (solución de desarrollo) en una bandeja de metal a 22-23°C agitando las membranas suavemente.

g) Enjuagar brevemente en agua.

h) Colocar las membranas en "fixer" durante 2 minutos (solución fijadora).

i) Lavar con abundante agua corriente (bajo el caño abierto) y finalmente enjuagar con agua destilada.

j) Secar las placas.

Identificar los resultados colocando la placa fotográfica encima de la membrana y localizando la posición de las manchas de los positivos.

7. Preparación de soluciones amortiguadoras

a) SSC 20X (1 litro)

175,32 g de NaCl (3M)
88,23 g de citrato de sodio dihidratado (0,3M)

Disolver en 800 ml de agua destilada. Corregir el pH a 7,0 con NaOH. Llevar el volumen a 1 litro. Si es necesario, esterilizar en una autoclave.

b) Formamida desionizada (20 ml)

Mezclar 200 ml de formamida y 7 g de "mixed-bed, ion-exchange resin" (Bio-Rad AG 501-X8, 20-50 mesh) en un beaker. Agitar lentamente con un magneto durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente. Filtrar a través de papel filtro Whatman N°1. Repetir esta operación con 7 g más y filtrar. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.

c) SDS 20% (100 ml)

Disolver 20 g de "electrophoresis-grade SDS" en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar la disolución. Corregir el pH a 7,2 con HCl concentrado. Llevar el volumen a 100 ml. No se necesita esterilizar.

d) Acetato de sodio 3M pH 5,2 (10 ml)

Disolver 2,46 g de CH_3COONa (PM 82,03) en 8 ml de ddH_2O y coregir el pH a 5,2 agregando CH_3COOH. Completar a 10 ml con ddH_2O. Esterilizar en autoclave.

e) $T_{10}E_1$

Esterilizar en autoclave.

f) TCA al 5%

Para la preparación de 500 ml, disolver en agua destilada estéril 25 g de ácido tricloroacético y 1,42 g de Na_2HPO_4. Agitar hasta que se disuelva completamente y llevar al volumen final. La concentración de Na_2HPO_4 será 0,02M.

g) Sulfato de dextran 50%

Disolver 50 g en agua destilada, llevar el volumen a 100 ml. Para disolver completamente, calentar en baño maría a 60-70°C. La solución es muy densa; almacenar a -20°C.

h) EDTA 500mM pH 8,0

Para la preparación de 100 ml, pesar 18,6 g de EDTA (PM 372,2) y diluir en agua destilada estéril. La disolución es muy lenta. Agregar NaOH en pastillas hasta obtener un pH de 8,0. Agregar agua destilada estéril hasta completar al volumen final.

i) Denhardt's solution 50X

Ficoll al 1%
Polivinilpirrolidona al 1%
BSA (Pentax fraction V) al 1%

Disolver en agua destilada y filtrar utilizando un filtro Nalgene. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.

j) Herring sperm DNA (10 mg/ml)

Disolver 1 g de Herring sperm DNA en 100 ml de agua destilada estéril. Disolver a 4°C durante toda la noche utilizando un agitador magnético.Pasar la solución de Herring sperm DNA a través de una jeringa limpia de 4 a 5 veces con fuerza para poder romper el DNA. Incubar en baño maría a 100°C durante 10 minutos y poner inmediatamente sobre hielo. Dividir en alícuotas y guardar en tubos estériles a -20°C.

k) Yeast transfer-RNA (20 mg/ml)

Pesar 0,25 g de tRNA y resuspender en 100 ml de agua destilada estéril. Añadir 5 ml de fenol (1/2 vol) y 5 ml de cloroformo (1/2 vol). Mezclar bien en un agitador de tubos y separar las fases centrifugando. Recolectar el sobrenadante y repetir la extracción con fenol y cloroformo 2 veces más. Extraer una vez con 10 ml de cloroformo y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo. Agregar 1 ml de acetato de sodio 3M pH 5,2 (1/10 vol) y 25 ml de etanol (2 1/2 vol). Precipitar toda la noche y centrifugar a 10 000 rpm durante 15 minutos. Secar el pellet al vacío y resuspender en 12 ml de H_2O ó $T_{10}E_1$ estériles.

l) Acetato de amonio 7,5M

Disolver 5,78 g en agua destilada y esterilizar por filtración.

m) Fosfato de sodio 1M pH 6,5

Preparar fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 1M, disolver 13,79 g en 100 ml de agua destilada. El pH es aproximadamente 4,2.

Preparar fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 1M, disolver 14, 19 g en 100 ml de agua destilada. El pH es aproximadamente 9,15. Mezclar las dos soluciones en relación aproximada de 1:1 hasta obtener un pH final de 6,5.

8. Preparación de fenol saturado

Precaución: Trabajar bajo una campana extractora. Usar guantes gruesos, lentes especiales y una mascarilla. El fenol puede causar quemaduras y es muy tóxico cuando se realiza la mezcla.

a) Apartir del fenol líquido:

Agregar 0,1% de 8-hidroxiquinolina y 10% de m-cresol en el fenol líquido. Agitar 1 hora. Para estabilizar el pH, realizar de 3 a 4 lavados (agregar la solución amortiguadora, mezclar, esperar separación de fases y eliminar la solución) con solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, luego con 0,1M Tris-HCl pH 8,0 hasta que el pH de la solución de fenol sea mayor que 7,6.

Para preparar la solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, disolver 121,1 g de Tris en 800ml

de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 utilizando HCl 0,1N (aproximadamente 29 ml) y agregar agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1 000 ml. Esterilizar en autoclave.

b) A partir del fenol cristalizado (para 500 g):

Agregar 140 ml de agua destilada directamente a la botella que contiene fenol. Una vez disuelto, agregar 10% de m-cresol y agitar 1 hora. Agregar 0,68 g de 8-hidroxiquinolina y agitar 1 hora más. Dejar a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente estabilizar el pH como en el caso del fenol líquido. Almacenar a 4°C en botellas de vidrio de color ambar. En estas condiciones el fenol saturado es estable por uno o dos meses.

9. Apéndice

a) Nota sobre el ^{32}P

el fósforo radiactivo se envía con la siguiente información:

Lot. Nr.
Total activity: 0,60 mCi
Activity ordered: 0,50 mCi
Total volume: 0,06 ml
Specif. activity: 650 Ci/m mole
Concentration*: 0,015 umol/ml

$$\frac{\text{Total activity mCi}}{\text{Total volume}} = \frac{0{,}60 \text{ mCi}}{0{,}06 \text{ ml}} = 10 \text{ mCi/ml}$$

$$\frac{10\text{mCi/ml}}{\text{SP}} = \frac{10\text{mCi/ml}}{650 \text{ Ci/mmol}} = 0{,}015 \text{ um dATP/ml}$$

Concentración = 0,015 u mol/ml
= 15 m mol/ml
= 15 p mol/ul
SP: Specific activity

*La concentración se necesita para calcular la cantidad de ^{32}P para el "nick translation". Si esta información no existe se puede calcular de la siguiente manera:

Para realizar el "nick translation" según el kit necesitamos 180 p mol de dNTP. Tenemos: 15 p mol/ul = 150 p mol/10 ul.

REFERENCIAS

MELTON, D.A., P.A. KRIEG, M.R. REBAGLIATI, T. MANIATIS, K. ZINN y M.R. GREEN. 1984. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acid Research 12: 7035-7056.

OWENS, R.A. y T.O. DIENER. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hibridization. Science 213: 670-672.

BOULTON, R.E., G.I. JELLIS, D.C. BAULCOMBE y A.M. SQUIRE. 1986. The application of complementary DNA probes to routine virus detection with particular reference to potato viruses. en Developments and applications in virus testing. Jones R.A.C. y L. Torrance editores, Great Britain. pp. 41-53.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

3.4 DETECCION / PSTVd

Fascículo 3.4.7 Preparación de Sondas No Radiactivas Mediante la Técnica "nick translation"

El sistema no radiactivo de detección de PSTVd es una modificación de la prueba convencional radiactiva de hibridación de ácidos nucleicos. El ensayo radiactivo está basado en la hibridación de un ácido nucleico altamente radiactivo complementario a la secuencia de PSTVd, con el PSTVd fijado a la membrana de nitrocelulosa, lo cual permite la detección autoradiográfica del híbrido resultante.

En el método no radiactivo se utiliza una sonda de DNA marcado con biotina y la hibridación se visualiza en la membrana por intermedio de una reacción enzimática. El ensayo puede realizarse por completo en laboratorios con mínimas facilidades. En este ensayo, una pequeña cantidad de la muestra se deposita en la membrana. Luego, en el paso de pre-hibridación se bloquean las áreas no utilizadas por las muestras y la membrana es hibridizada con la sonda de PSTVd. La membrana es sometida a varios lavados y a un bloqueo ulterior para evitar reacciones inespecíficas. En el último paso, la sonda biotinilada se hace reaccionar con un conjugado específico unido a una enzima. De esta forma, la detección del complejo sonda-conjugado enzimático se realiza mediante la reacción con el sustrato apropiado. La intensidad de la coloración de la mancha depende directamente de la concentración del viroide, es estable y se mantiene visible por varios meses.

El procedimiento de esta prueba se describe a continuación.

1. Marcaje con nucleótidos biotinilados.

El método más apropiado para la preparación de sondas marcadas con un nucleótido biotinilado es el método "nick translation". Para el marcaje se utiliza el "Nick Translation Reagent Kit" (BRL) y un nucleótido biotinilado (biotin-7-dATP o biotin-14-dATP). Mezclar en un tubo Eppendorf lo siguiente y en orden:

Mezclar y añadir 5 ul de la solución C (polimerasa I/ DNasa I). Centrifugar brevemente e incubar a 15°C durante 90 minutos. Luego de la incubación añadir:

Mezclar y añadir 225 ul de etanol e incubar a -20°C durante toda la noche ó a -70°C durante

..... ul	ddH_2O estéril*
5 ul	Solución A (todos los dNTPs menos el marcado
..... ul	Plásmido (= 1 ug)*
2,5 ul	Nucleótido biotinilado (biotin-dATP 0,4 mM)

*El volumen total debe ser de 45 ul

Mezclar y añadir 5 ul de la solución C (polimerasa I/ DNasa I). Centrifugar brevemente e incubar a 15°C durante 90 minutos. Luego de la incubación añadir:

3 ul	H_2O
5 ul	Solución D "stop-buffer"
1 ul	SDS al 5%
1 ul	"Yeast tRNA" (solución stock: 20 mg/ml)
30 ul	Acetato de amonio 7,5M (concentración final: 2,5M)

Mezclar y añadir 225 ul de etanol e incubar a -20°C durante toda la noche ó a -70°C durante 1 hora. Centrifugar por 15 minutos. Eliminar el sobrenadante y añadir al pellet:

90 ul	SSC 1X
10 ul	Acetato de sodio 3M pH 5,2

Mezclar bien y añadir 225 ul de etanol. Incubar a -20°C durante toda la noche ó a -70°C durante 1 hora y centrifugar por 15 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet. Resuspender el pellet en 100 ul de SSC 1X. Guardar a -20°C hasta su utilización.

2. Test de control

El test de control se realiza para estimar la calidad del DNA producido cuantificando en forma aproximada la incorporación del nucleótido marcado. Una buena incorporación permite la visualización de 1 pg de DNA biotinilado.

El test consiste en aplicar en la membrana de nitrocelulosa diluciones seriadas de la sonda marcada. Luego se desarrolla el test en todos los pasos siguientes.

Preparar 4 diluciones seriadas (2 ul de DNA biotinilado + 18 ul de H_2O; 1:10, 1:100, 1:1 000 y 1:10 000). En una membrana de nitrocelulosa poner 5 ul del DNA biotinilado puro y 5 ul de cada dilución y dejar secar a temperatura ambiente. Para el control de la incorporación empezar el tratamiento desde "bloqueo y lavado". Una buena incorporación permite visualizar hasta la cuarta dilución.

3. Pre-hibridación

Poner la membrana en una bolsa plástica específica para este fin, sellar la bolsa y cortar una esquina.

Desnaturalizar el Herring sperm DNA calentándolo a 100°C por 10 minutos y ponerlo inmediatamente en hielo.

Agregar la solución amortiguadora de pre-hibridación conteniendo el Herring sperm DNA desnaturalizado a la bolsa.

Mezclar bien y sellar evitando dejar burbujas de aire en la bolsa. Incubar a 42°C en baño maría durante 2 a 4 horas.

Solución amortiguadora de pre-hibridación

Solución stock	x 10 ml	Conc. final
Formamida	5 ml	50%
SSC 20X	2,5 ml	5X
Denhardt's solution 50X	1 ml	5X
Fosfato de sodio 1M pH 6,5	250 ul	25 mM
H_2O	0,75 ml	
Herring sperm DNA* (10 mg/ml)	0.5 ml	0,5 mg/ml

*Desnaturalizar inmediatamente antes de usar, luego añadir a los otros componentes

4. Hidridación

Cortar una esquina de la bolsa y retirar la solución amortiguadora de pre-hibridación.

Desnaturalizar el Herring sperm DNA y la sonda calentando a 100°C por 10 minutos y poniendo inmediatamente en hielo.

Agregar la solución amortiguadora de hibridación a la bolsa, mezclar bien y sellar. Incubar toda la noche en baño maría a 42°C.

Al día siguiente retirar la bolsa, cortar una esquina y retirar la solución amortiguadora de hibridación. Esta solución amortiguadora puede ser reutilizada si se guarda a -20°C.

Solución amortiguadora de Hibridación

Solución stock	x 10 ml	Conc. final
Formamida	4,5 ml	45%
SSC 20X	2,5 ml	5X
Denhardt's solution 50X	200 ul	1X
Fosfato de sodio 1M pH 6,5	200 ul	20 mM
Sulfato de dextran al 50%	1 ml	5%
H_2O	1,3 ml	
Herring sperm DNA* 10 mg/ml	100 ul	0,2 mg/ml
Sonda*		

*Desnaturalizar inmediatamente antes de usar, luego añadir a los otros componentes

5. Lavado

Los pasos de lavado se hacen en una bandeja plástica y utilizando un agitador rotatorio. Ver la tabla al final de la página para la preparación de las soluciones amortiguadoras necesarias. (*Calentar previamente la solución amortiguadora N°3 a 50°C.)

6. Bloqueo y visualización

Ver la tabla de la página siguiente para la preparación de las soluciones amortiguadoras necesarias en cada una de las etapas. (** Calentar previamente la solución amortiguadora N°5 a 60°C. *** Disolver separadamente en 100 ul de n-n-Dimetilformamida [DMF] y agregar a la solución en un recipiente cubierto con papel aluminio. La reacción coloreada de desarrollo tiene que llevarse a cabo también en un recipiente con tapa oscura. *CUIDADO, el n-n- dimetilformamida es altamente tóxico; utilizar guantes en todo momento mientras es manipulado.*)

7. Preparación de soluciones requeridas para el NASH no radiactivo

a) SSC 20X (1 litro)

175,32 g de NaCl (3M)
88,23 g de citrato de sodio dihidratado (0,3M)

Disolver los reactivos en 800 ml de agua destilada. Corregir el pH a 7,0 con NaOH concentrado. Llevar el volumen a 1 litro. Si es necesario, esterilizar en una autoclave.

b) Denhardt's solution 50X

Ficoll al 1%
Polivinilpirrolidona al 1%
BSA (Pentax fraction V) al 1%

Disolver en agua destilada y filtrar utilizando un filtro Nalgene. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.

c) Herring sperm DNA (10 mg/ml)

Disolver 1 g de Herring sperm DNA en 100 ml de agua destilada estéril. Disolver a 4°C durante toda la noche utilizando un agitador magnético.

Pasar la solución de Herring sperm DNA a través de una jeringa limpia de 4 a 5 veces con fuerza para poder romper el DNA. Incubar en baño maría a 100°C por 10 minutos y poner inmediatamente en hielo. Dividir en alícuotas y guardar en tubos estériles a -20°C.

d) Formamida desionizada

Mezclar 200 ml de formamida y 7 g de "mixed-bed, ion-exchange resin" (Bio-Rad AG 501-X8, 20-50 mesh) en un beaker. Agitar con un magneto durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente. Filtrar a través de papel filtro Whatman N°1. Repetir esta operación con 7 g más y filtrar. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.

Solución	Tiempo	Temp.	Cantidad por lavado	Cantidad requerida	Conc. final de componentes	Stock	Cantidad requerida de componentes
Lavado							
N°1	2x5'	amb.	250 ml	500 ml	SSC 2X	20X	50 ml
					SDS 0,1%	20%	2,5 ml
N°2	2x5'	amb.	250 ml	500 ml	SSC 0,2X	20X	5 ml
					SDS 0,1%	20%	2.5 ml
N°3	2x15'	50°C*	250 ml	500 ml	SSC 0,16X	20X	4 ml
					SDS 0,1%	20%	2,5 ml
N°4	3'	amb.	200 ml	200 ml	SSC 2X	20X	20 ml
Bloqueo							
N°5				600 ml	Tris-HCl		
					0,1M pH 7,5	2M	30 ml
					NaCl 0,1	5M	18 ml
N°6	1h	60°C**	100 ml	100 ml	Solución N°5		
					BSA 3%		3 g
Visualización							
N°7	20'	amb.	10 ml		Solución N°5		
					SA-AP 1:1000		10 ul
N°8	2x15'	amb.	250 ml		Solución N°5		
N°9	10'	amb.	200 ml	200 ml	Tris-HCl	1M	20 ml
					0,1M pH 9,5		
					NaCl 0,1M	5M	4 ml
					$MgCl_2$ 0,05M	1M	
N°10	30'-2h	amb.	30 ml		Solución N°9		
					NBT ***		6 mg
					BCIP ***		3 mg
N°11	2x5'	amb.	200 ml		agua destilada		

e) SDS 20%

Disolver 20 g de "electrophoresis-grade SDS" en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar la disolución. Corregir el pH a 7,2 con HCl concentrado. Llevar el volumen a 100 ml No se necesita esterilizar.

f) Yeast transfer-RNA (20 mg/ml)

Pesar 0,25 g de tRNA y resuspender en 10 ml de agua destilada estéril. Añadir 5 ml de fenol saturado (1/2 vol) y 5 ml de cloroformo (1/2 vol). Mezclar bien en un agitador de tubos y separar las fases centrifugando. Recolectar el sobrenadante y repetir la extracción con fenol y clororformo 2 veces más. Extraer una vez con 10 ml de cloroformo y pasa el sobrenadante a un tubo nuevo. Agregar 1 ml de acetato de sodio 3M pH 5,2 (1/10 vol) y 25 ml de etanol (2 1/2 vol). Precipitar toda la noche y centrifugar a 10 000 rpm durante 15 minutos. Secar el pellet al vacío y resuspender en 12 ml de agua destilada estéril ó $T_{10}E_1$ estéril.

g) Acetato de sodio 3M pH 5,2

Disolver 2,46 g de $CH_3COO.Na$ (PM 82,03) en 10 ml finales de ddH_2O y coregir el pH a 5,2 agregando lentamente CH_3COOH. Esterilizar en autoclave.

h) Acetato de potasio 7,5M

Disolver 5,78 g en 10 ml de agua destilada y esterilizar por filtración.

i) Sulfato de dextran 50%

Disolver 50 g en agua destilada, llevar el volumen a 100 ml. Para disolver completamente, calentar en baño maría a 60-70°C. La solución es muy densa. Almacenar a -20°C.

j) Fosfato de sodio 1M pH 6.5

Preparar fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 1M, disolver 13,79 g en 100 ml de agua destilada. El pH es aproximadamente 4,2.

Preparar fosfato de sofio dibásico (Na_2HPO_4) 1M, disolver 14,19 g en 100 ml de agua destilada. El pH es aproximadamente 9,15.

Mezclar las dos soluciones en relación aproximada de 1:1 hasta obtener un pH final de 6,5.

k) Soluciones stock

NaCl 5M: disolver 29,2 g en 100 ml de agua destilada y autoclavar.

$MgCl_2$ 1M: disolver 20,3 g en 100 ml de agua destilada y autoclavar.

Tris-HCl 2M pH 7,5: disolver 26,2 g en 80 ml de dH_2O y llevar a un pH de 7,5 con HCl concentrado. Completar a 100 ml y autoclavar.

Tris-HCl 1M pH 9,5: disolver 12,1 g en 80 ml de dH_2O y llevar a un pH de 9,5 con HCl concentrado. Completar el volumen a 100 ml y autoclavar.

l) Soluciones requeridas

Marcaje: Kit (BRL), nucleótido (BRL), SDS 5% (diluir stock 20%), Yeast tRNA (20 mg/ml), acetato de amonio 7,5M, etanol absoluto, SSC 1X (diluir SSC 20X y autoclavar), acetato de sodio 3M pH 5,2.

Pre-hibridación e hibridación: formamida, SSC 20X, Denhardt's solution 50X, Herring sperm DNA (10 mg/ml), fosfato de sodio 1M pH 6,5, sulfato de dextran 50%.

Lavado: SSC 20X, SDS 20%, Tween-20.

Bloqueo: Tris-HCl 2M pH 7,5, NaCl 5M, BSA, SA-AP, Tris-HCl 1M pH 9,5, $MgCl_2$ 1M, NBT, BCIP, n-n-dimetilformamida.

8. Preparación de fenol saturado

Precaución: Trabajar bajo una campana extractora. Usar guantes gruesos, lentes especiales y una mascarilla. El fenol puede causar quemaduras y es muy tóxico cuando se realiza la mezcla.

a) Apartir del fenol líquido:

Agregar 0,1% de 8-hidroxiquinolina y 10% de m-cresol en el fenol líquido. Agitar 1 hora. Para estabilizar el pH, realizar de 3 a 4 lavados (agregar la solución amortiguadora, mezclar, esperar separación de fases y eliminar la solución) con solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, luego con 0,1M Tris-HCl pH 8,0 hasta que el pH de la solución de fenol sea mayor que 7,6.

Para preparar la solución amortiguadora Tris-HCl 1M pH 8,0, disolver 121,1 g de Tris en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 utilizando HCl 0,1N (aproximadamente 29 ml) y agregar agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1 000 ml. Esterilizar en autoclave.

b) A partir del fenol cristalizado (para 500 g):

Agregar 140 ml de agua destilada directamente a la botella que contiene fenol. Una vez disuelto, agregar 10% de m-cresol y agitar 1 hora. Agregar 0,68 g de 8-hidroxiquinolina y agitar 1 hora más. Dejar a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente estabilizar el pH como en el caso del fenol líquido. Almacenar a 4°C en botellas de vidrio de color ambar. En estas condiciones el fenol saturado es estable por uno o dos meses.

REFERENCIAS

MELTON, D.A., P.A. KRIEG, M.R. REBAGLIATI, T. MANIATIS, K. ZINN y M.R. GREEN. 1984. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acid Research 12: 7035-7056.

OWENS, R.A. y T.O. DIENER. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hibridization. Science 213: 670-672.

BOULTON, R.E., G.I. JELLIS, D.C. BAULCOMBE y A.M. SQUIRE. 1986. The application of complementary DNA probes to routine virus detection with particular reference to potato viruses. en Developments and applications in virus testing. Jones R.A.C. y L. Torrance editores, Great Britain. pp. 41-53.

HOPP, H.E., L. GIAVEDONI, M.A. MANDEL, A. ARESE, B. ORMAN, F. BRAVO ALMONACID, H.N. TORRES y A.N. MENTABERRY. 1988. Biotinylated nucleic acid hybridization probes for potato virus detection. Archives of Virology 103:231-241.

Las Unidades Técnicas de Capacitación (TTU), constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

4.0 MICROSCOPIA

Fascículo 4.1 Microscopía Electrónica

FUNDAMENTOS

En 1872, Ernest Abbe respondió el dilema del por qué un microscopio de luz, aun con la óptica más fina, es incapaz de superar la resolución de 0,2 um. Se debía a la limitación que tiene la longitud de onda de la luz (lambda), pues la resolución se define como:

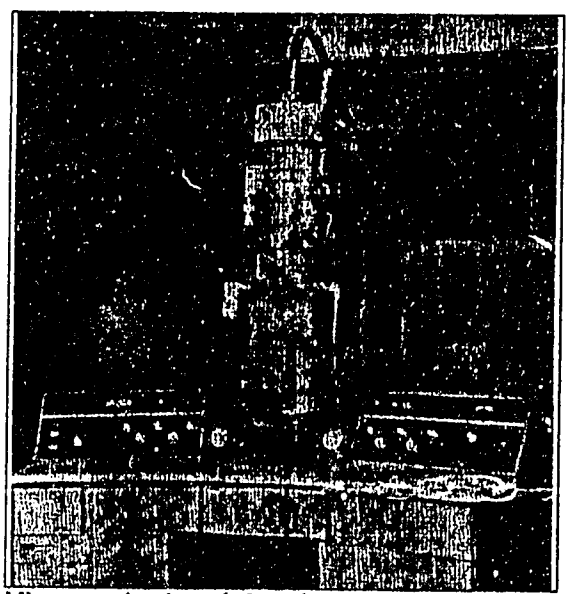
donde NA es la abertura numérica de la lente objetivo.

$$\frac{\text{lambda} \times \text{NA}}{2}$$

De acuerdo con ello, sólo se podría aumentar la resolución si se disminuyera lambda.

Ese pensamiento fue realizado 65 años más tarde por Ernest Ruska, en 1934, cuando presentó su primer microscopio electrónico, utilizando un haz de electrones en vez de luz y electroimanes como lentes. Así a 100 000 voltios lambda es de aproximadamente 0,05 angstroms (A) lo que permitió superar el límite que había señalado Abbe.

El primer microscopio electrónico (ME) comercial , diseñado por Ruska, fue lanzado al mercado por Siemens en 1939. Por esa razón, Ruska es considerado como el padre de la microscopía electrónica.



Microscopio electrónico de alta resolución (JEM-100U).

Fundamentalmente existen dos tipos de microscopios electrónicos: el de transmisión (MET) y el de rastreo (MER). El primero se puede comparar con un microscopio de luz (ML) y el segundo con un microscopio estereoscópico o de disección. El MET utiliza los electrones transmitidos, es decir, aquellos que logran atravesar el espécimen. Obviamente la muestra debe ser muy delgada. La imagen obtenida, al menos mediante los métodos convencionales, es plana.

El MER utiliza los electrones dispersados a partir de la superficie de la muestra, ya sean secundarios o retrodispersos, y la imagen obtenida es de tipo tridimensional.

1. Interacción entre el haz de electrones y la muestra

Cuando los electrones de una energía determinada inciden sobre una substancia, éstos son derivados como electrones transmitidos, electrones retrodispersos (electrones reflejados) y electrones absorbidos (absorción) mediante una interacción con los átomos de dicha substancia. Los electrones transmitidos pueden ser clasificados en tres tipos:

a) electrones transmitidos (onda transmitida), los cuales pasan a través del espécimen con un pequeño cambio de dirección o de longitud de onda,

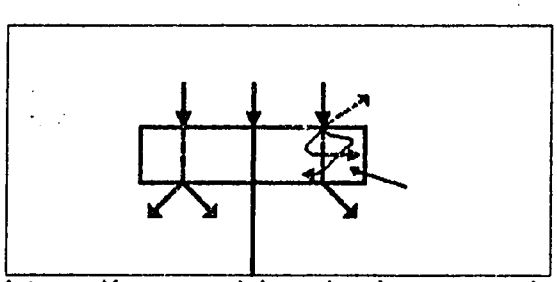
b) electrones dispersados elásticos (ondas dispersadas elásticas), los cuales reciben un cambio direccional debido a colisiones atómicas pero retienen su energía, y,

c) electrones dispersados inelásticos (ondas dispersadas inelásticas), los cuales reciben un cambio de dirección y una pérdida parcial de energía.

Los electrones dispersados elásticos pueden ser divididos en dos tipos:

a)electrones coherentes (electrones de reflexión de Bragg), los cuales pasan a través de una substancia que tiene un ordenamiento regular en su estructura atómica, y,

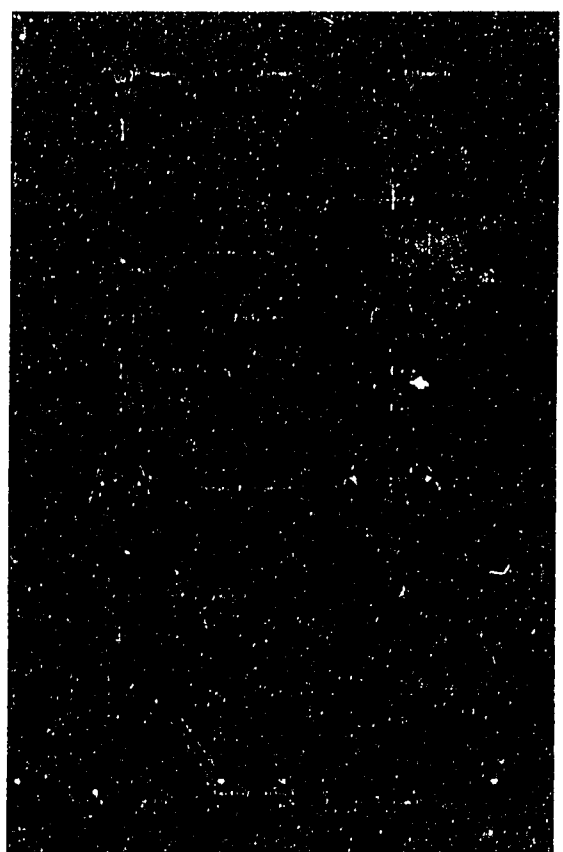
b) electrones incoherentes, los cuales pasan a través de una substancia que tiene un ordenamiento irregular.



Interacción entre el haz de electrones y la muestra. Los electrones que inciden en el espécimen son derivados en electrones transmitidos, electrones dispersados inelásticos y electrones dispersados elásticos. Estos últimos pueden ser coherentes o incoherentes, de acuerdo a la estructura de la muestra.

El contraste de las imágenes en el microscopio electrónico de transmisión está relacionado con la tasa de electrones transmitidos entre los electrones dispersados elásticos.

2. Contraste y Formación de la Imagen



Comparación entre un microscopio de luz y uno electrónico. En cada uno, la iluminación de la fuente (lámpara, filamento en el cañón electrónico) se enfoca mediante la lente condensadora hacia el espécimen. Una primera imagen es formada por la lente objetivo. La imagen es luego magnificada por la lente proyectora sobre una pantalla de vidrio (luz) o sobre una pantalla fluorescente (electrones).

En microscopía óptica, el contraste de la imagen está determinado por la diferencia en el coeficiente de absorción entre diferentes porciones del espécimen, y, parcialmente, por la diferencia en la reflectividad. Sin embargo, en microscopía electrónica, el contraste de la imagen está determinado por el contraste de absorción dispersada, el contraste de difracción y el contraste de fase.

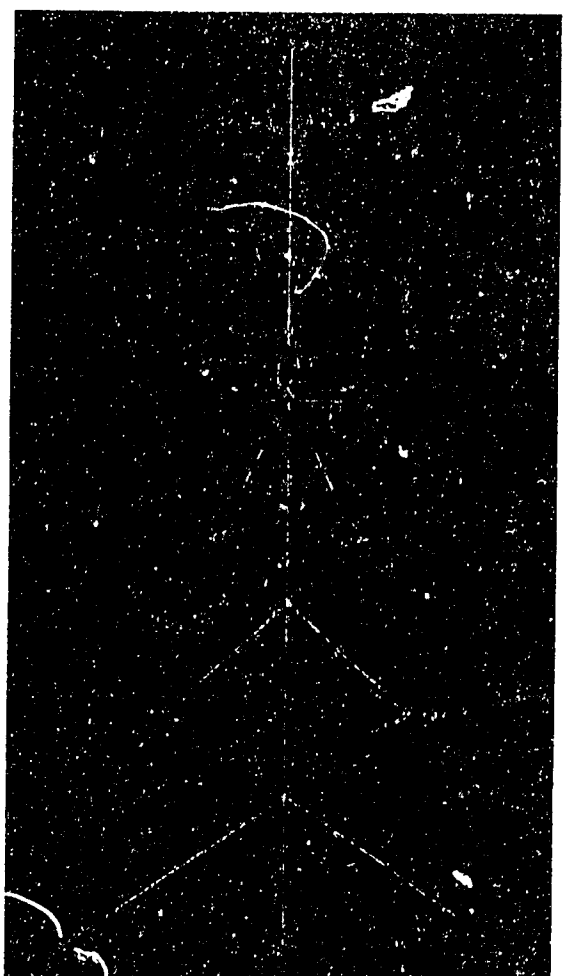
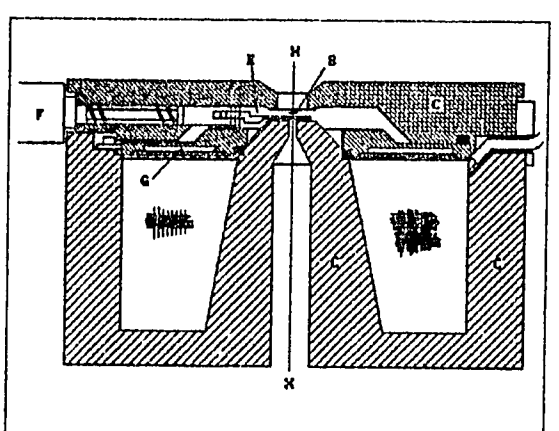


Diagrama de rayos del MET: **F**: filamento; **C1**: lente condensadora 1; **C2**: lente conden- sadora 2; **CA**: abertura del condensador; **S**: espécimen; **O**: lente objetivo; **OA**: abertura del objetivo; **SA**: primera imagen intermedia; **P1**: lente intermedia; **I2**: segunda imagen in- termedia; **P2**: lente proyectora; **FC**: imagen final en la pantalla fluorescente.

Si el espécimen es una sustancia amorfa, los electrones dispersados por él son capturados por la abertura, la cual está localizada cerca del plano focal posterior de la lente objetivo; de este modo, se genera el contraste de absorción dispersada. La abertura de la lente es de tamaño muy pequeño (varias decenas de micrómetros) para minimizar la aberración esférica. Por consiguiente, si la dispersión es grande (especialmente la dispersión elástica incoherente), muchos de los electrones dispersados obstruirían la abertura y se formaría una porción oscura en la imagen. La extensión de la dispersión de los electrones es proporcional al grosor de la masa del espécimen. De este modo, el contraste de absorción dispersada provee información concerniente a la existencia y a la configuración del objeto.

3. Perfil de la Estructura y Función del MET

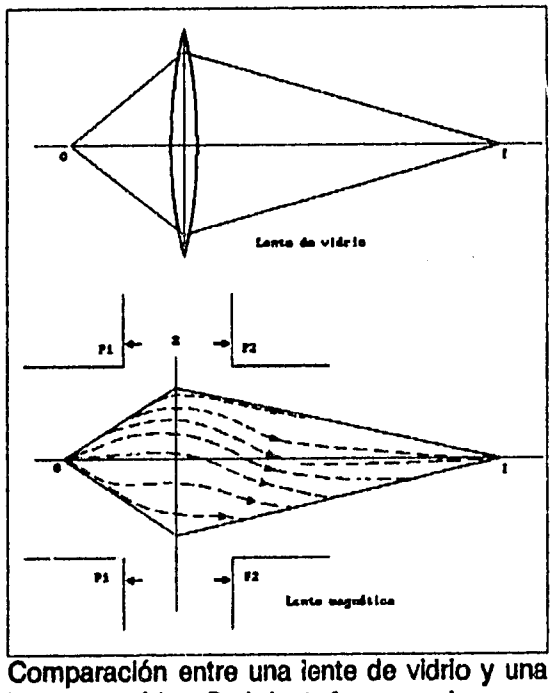
El uso básico del microscopio electrónico es la observación de imágenes de alta resolución y alta magnificación. Imágenes de alta calidad superior pueden ser obtenidas fácilmente



Corte transversal de una lente objetivo. El espécimen se ubica en **S**. Las aberturas del objetivo se ubican en la varilla **E** y se ajustan con la perilla de control **F**. Los canales de enfriamiento de agua **G** se ubican sobre la espiral de la lente. **C** es un circuito pesado de acero y **XX** el eje de la lente.

dentro de un amplio rango de magnificación, desde magnificaciones extremadamente bajas hasta magnificaciones ultra altas que pueden alcanzar el nivel de observación atómica.

Con el empleo de un sistema de formación de imágenes de 6 lentes electromagnéticas se pueden obtener imágenes de alta calidad, amplio campo visual, mínima distorsión de imagen y alto contraste. A una magnificación 50x, un campo visual de 2mm de diámetro puede ser observado sin distorsión de la imagen. Además, si se usa una lente objetivo con piezas polares de alta resolución es posible obtener una resolución entre línea y línea de 0,14 nm.

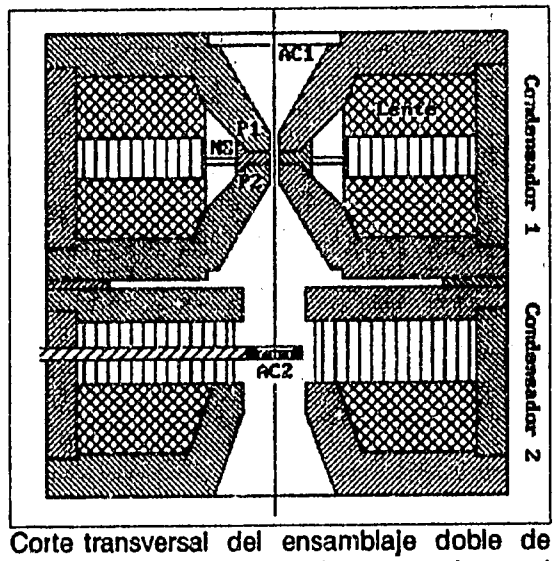


Comparación entre una lente de vidrio y una lente magnética. Cada lente forma una ima- gen I del objeto O, de tal manera que la for- mación geométrica de la imagen es idéntica; sin embargo, los electrones describen una trayectoria en espiral sobre el eje de la lente mientras pasan a través del campo magné- tico formado entre los polos **P1** y **P2**.

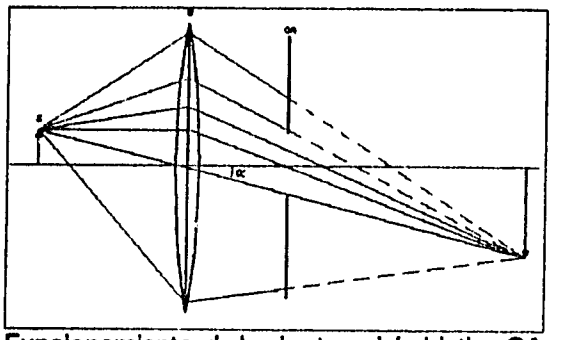
En principio se pueden usar lentes electrostáticas o magnéticas para enfocar un haz de electrones, pero en la práctica se emplean lentes magnéticas que poseen menores defectos que las lentes electrostáticas. El campo magnético requerido para formar una lente electrónica es un fuerte campo axial localizado en la dirección del haz de electrones. La figura de un haz de electrones es exactamente análoga a la de un haz de luz pasando a través de una lente convergente, excepto que los electrones viajan haciendo un recorrido helicoidal través de la lente. Este movimiento de rotación adicional es una característica de las lentes magnéticas.

El microscopio electrónico está compuesto por una columna, la cual esencialmente contiene un sistema de lentes electrónicas, un sistema de suministro de energía eléctrica, que se utiliza para la aceleración de voltaje de los electrones y la excitación de las lentes, un sistema de control de circuitos, que controla tales flujos de energía, y un sistema de evacuación que provee de una vía de vacío a los electrones.

El sistema de iluminación comprende parte de la columna que va desde el cañón de

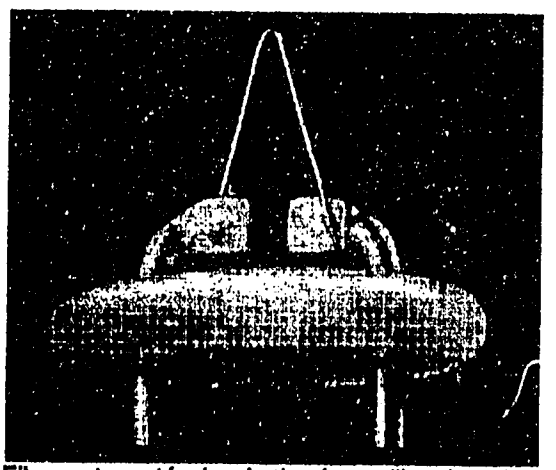


Corte transversal del ensamblaje doble de lentes condensadoras. La lente superior es el **condensador 1** con abertura fija; la lente inferior es el **condensador 2** con abertura ajustable. Los polos están indicados por **P1** y **P2**, y el espaciador no magnético por **NS**.



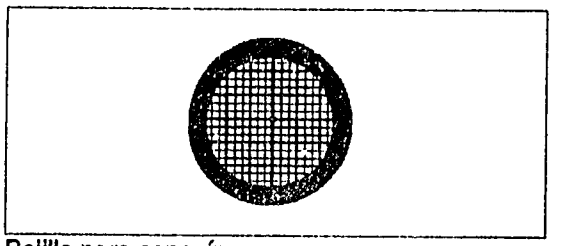
Funcionamiento de la abertura del objetivo **OA** deteniendo electrones dispersados del espécimen **S** en frente de la lente objetivo **O**; **alfa** es la abertura semi-angular de la lente.

electrones hasta las lentes condensadoras, las cuales reúnen a los electrones acelerados en haces muy finos de rayos paralelos y los dirigen acertadamente hasta la superficie del espécimen que quedará iluminado. La porción que se extiende a partir de la lente objetivo hasta la segunda lente proyectora se llama "sistema de lentes de la imagen", en el cual el objeto es enfocado por la lente objetivo mientras que la imagen producida es magnificada masivamente por las lentes intermedias y más finamente por la primera y segunda lente proyectora. Las lentes condensadora y objetivo están cada una provistas de aberturas movibles con diámetros en el rango de 0,1-1 mm y de 0,01-0,1 mm, respectivamente.



Filamento estándar de tipo horquilla; alam- bre uniforme de tungsteno en forma de **V**.

El cañón electrónico tiene los mismos principios de operación que un tríodo directo de tipo caliente. El cátodo consiste en un filamento de tungsteno en forma de V, el cual se calienta hasta 2600°K para generar termo-iones. Entre éste y el ánodo, se aplica una aceleración de voltaje para que se efectúe el salto y la



Rejilla para especímenes.

aceleración de los electrones. Una "capucha", llamada tubo de Wehnelt, está ubicada entre el filamento y el ánodo, y sirve no sólo para impedir que los electrones se dispersen sino también para controlar su intensidad. La gran mayoría de los microscopios electrónicos operan en el rango de voltaje de 25-200 Kv. Unos pocos están operando a 1000 Kv o más.

El espécimen generalmente se monta sobre una rejilla (usualmente de cobre) electroformada de 3 mm de diámetro. Esta se conoce como rejilla porta-espécimen. La rejilla puede tener una variedad de diseños. Se obtiene mejor resolución si la rejilla es colocada entre el espacio que hay entre las piezas polares de la lente objetivo.

Debajo del sistema proyector se ubica la cámara de observación, la cual incorpora la pantalla fluorescente sobre la cual la imagen es recién visible al ojo humano. Para obtener un registro permanente de la imagen se ha intro-

$$Do = \frac{d}{alfa}$$

ducido material fotográfico en el microscopio para exposiciones directas con el haz de electrones.

Una característica que ocasiona alguna sorpresa al principio, es que el material

$$Di = \frac{M^2 \times d}{alfa}$$

fotográfico (placas) se ubica frecuentemente en un plano varios centímetros alejado de la pantalla fluorescente, que es donde la imagen está enfocada. Esto es posible debido a la extensa profundidad de campo del microscopio electrónico, que se incrementa a medida que se utilizan aberturas de menor diámetro en la lente objetivo.

Para una resolución de la imagen de **d** y una abertura de objetivo **alfa**, la profundidad de campo en el plano del objeto es **Do**:

Cuando esta profundidad de campo se refiere al plano de la imagen se le conoce como profundidad de foco.

Para una magnificación total **M**, la profundidad de foco **Di** sería muy grande debido a:

Si M = 10 000x; d = 1,5 nm; alfa = 0,01 rad; entonces, Di = 50 m. Por lo tanto, es intracendente que la pantalla fluorescente y la cámara estén en diferentes planos, ya que su separación es insignificante comparada con la profundidad de foco.

En general, ya que la placa fotográfica está por debajo de la pantalla, la magnificación de la pantalla debe ser 20% menos que la magnificación indicada.

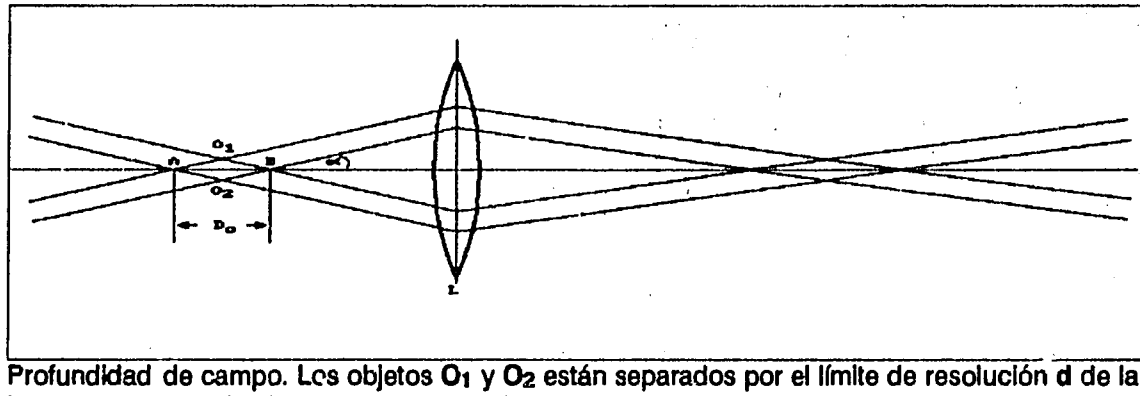
La magnificación de la imagen final **Mt** es el producto de las magnificaciones de las lentes individuales, como:

$$Mt + Mo \times M1 \times M2$$

donde **Mo** es la magnificación de la lente objetivo, **M1** es la magnificación de la primera lente proyectora (también llamada algunas veces lente intermedia) y **M2** es la magnificación de la segunda lente proyectora. Valores típicos de estas magnificaciones serían:

Mo = 50x
M1 = 16x
M2 = 250x
por lo tanto, Mt = 200 000x

Se utilizan, además, especímenes estándares para medir la magnificación. Estos pueden ser réplicas de rejillas de difracción óptica que tienen espacios entre línea y línea de 1 um ó 0,5 um. Estas réplicas son ampliamente usadas para magnificaciones no mayores de 50 000x. Para altas magnificaciones se utilizan rejillas cristalinas de distancias conocidas entre líneas, como por ejemplo, de 126 nm (phtalocianina de cobre, etc.). Cuando estos especímenes son fotografiados y cuando la distancia **d** mm entre líneas es medida a partir del negativo revelado y el espacio de la rejilla conocido es **do** nm, la



Profundidad de campo. Los objetos O_1 y O_2 están separados por el límite de resolución **d** de las lentes. Los rayos desde esos puntos atraviezan al eje en **A** y **B**. Entonces, los puntos entre **A** y **B** aparecerán igualmente definidos, y **AB** es la profundidad de campo **Do** de la lente para una abertura semi-angular **alfa**.

magnificación alcanzada por el instrumento sería de:

$$\frac{d}{do}$$

Por ejemplo, si se utiliza una "Line Grating Replica" que se conoce tiene 2 160 líneas/mm y se toma una fotografía a una magnificación nominal de 20 000x, entonces la magnificación calibrada sería:

d = 9,3 mm
do = 462,9 nm

Magnificación calibrada = 20 090x

Para averiguar el poder de resolución, la imagen observada debe ser fotografiada a una ligera baja magnificación para luego ser amplificada. Ya que las fotografías obtenidas con un microscopio electrónico tienen una resolución **d2** de aproximadamente 20 um en buenas condiciones, el aumento de magnificación requerida **M1** por la resolución es 5x, el cual se calcula con la siguiente ecuación:

$$M1 = d1/d2$$

donde, **d1** es el poder de resolución del ojo (aproximadamente 0,1mm).

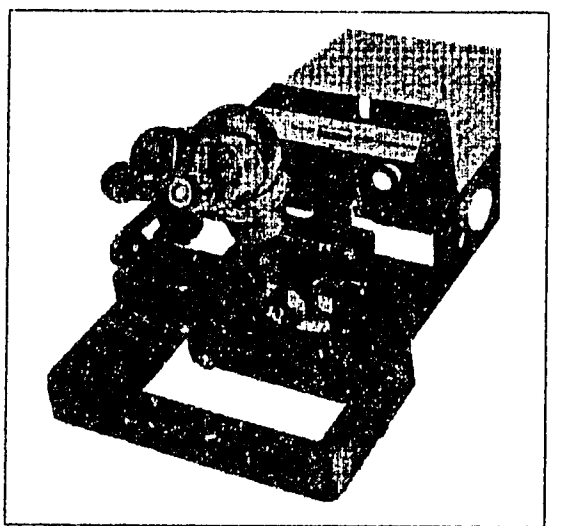
Pero si se desea determinar el poder de resolución **d** de la imagen a simple vista por la cámara de observación, se debe lograr una adecuada magnificación si el microscopio electrónico lo permite; por ejemplo, en un JEOL JEM100S, que tiene un poder de resolución de 0,34nm, la mínima magnificación efectiva **M** está determinada por el poder de resolución del ojo del observador **d1** (aproximadamente, 0,1-0,2mm).

si M = d1/d

d1 = 0,1mm

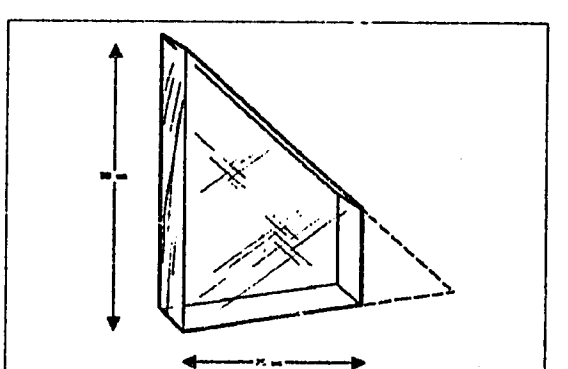
d = 0,34 nm ("lattice resolution")

entonces, M = 294 118x , esto significa que no se podría observar distancias tan pequeñas



Ultramicrótomo "Cambridge Huxley Mark 2".

(0,34nm) debido a que el modelo JEM 100S solamente tiene un poder de magnificación de 200 000x. Sin embargo, esta limitación se puede superar utilizando los binoculares que pueden amplificar la imagen por 10 veces más, es decir que se puede obtener una magnificación máxima de 2 000 000x con el JEM100S.



Cuchilla de vidrio para el ultramicrótomo.

ULTRAMICROTOMIA

La ultramicrotomía es una técnica muy especial que tiene como objetivo la producción de

secciones ultrafinas (25 a 90 nm) de materiales biológicos fijados, deshidratados e incluidos, mediante micrótomos especiales (de avance térmico o mecánico) y cuchillas de vidrio o de diamante de filos muy agudos y fuertes. El primer modelo fue diseñado por Ivan Sorvall en 1953 y se conoce con el nombre de Sorvall-MT1. Una casa sueca fabrica a escala comercial ultramicrotomos con avance térmico llamados "Ultratome".

Las cuchillas de vidrio se fabrican seccionando un vidrio especial, de tal manera que se obtenga un borde afilado cortante. La casa sueca ha desarrollado una máquina para hacer cuchillas. Los filos de las cuchillas no deben tocarse ni rozarse y deben descartarse cuando ya no cortan satisfactoriamente.

La obtención de secciones ultrafinas mediante microtomía es la más importante entre las técnicas de microscopía electrónica. Las características óptimas de una sección ultrafina son:

a) Espesor de corte de 30 a 60 nm.

b) Consistencia suficiente para soportar el haz de electrones.

c) Susceptible al buen contraste por afinidad con los tintes.

Los cortes finos deben flotar en agua detrás del borde afilado de la cuchilla conforme van obteniéndose; de este modo, se puede conocer su espesor mediante la observación del color de interferencia (que es el reflejo de una luz fluorescente blanca que ilumina el área de los cortes) y pueden ser recogidas con facilidad.

Los cortes de mayor utilidad para estudios ultraestructurales son los grises (25 a 60 nm) y los plateados (60 a 90 nm). Estos se montan sobre rejillas de cobre de 200 mesh sin membrana de soporte; pero se deben utilizar membranas plásticas cuando las rejillas son menores de 200 mesh.

TINCION

En microscopía electrónica, los especímenes son teñidos para incrementar el contraste y también para facilitar los estudios citoquímicos. El aumento en el contraste se obtiene depositando átomos de alto número atómico en los componentes orgánicos de la materia.

Existen varios métodos para tinción en microscopía electrónica:

a) el ácido fosfotúngstico de Wohlfarth y Bottemian (1956),

b) el acetato de uranilo de Watson (1968), y,

c) el citrato de plomo o pH alto de Reynolds (1963).

1. Preparación y Uso del tinte de citrato de plomo para secciones de tejido

Solución 1: Pesar 3 g de citrato de plomo y transferir a un pomo de 30 a 50 ml de capacidad. Añadir 30 ml de NaOH 1N. Agitar bien y dejar reposar por 1 hora.

Solución 2: Preparar 30 ml de NaOH 0,05N.

Solución Tinte: Centrifugar la solución 1 durante 5 minutos a 2 000g. Diluir el sobrenadante 1:5 ó 1:10 con la solución 2. Utilizar inmediatamente para teñir las rejillas.

La tinción de las secciones de tejidos debe realizarse en un medio con una atmósfera libre de dióxido de carbono, ya que éste reacciona con el plomo. El procedimiento es el siguiente:

a) Preparar una placa Petri con cera que tenga un hoyo apropiado para colocar "pellets" de NaOH. Añadir 5 pellets de NaOH al hoyo central (esto funciona como una trampa para atrapar el dióxido de carbono).

b) Para cada rejilla (máximo 10 por vez) colocar en la superficie de la cera 1 gota de agua destilada y 1 gota de la solución del tinte.

c) Poner las rejillas sobre las gotas de agua durante 30 segundos y luego en el tinte durante 5 minutos.

d) Retirar las rejillas, lavar inmediatamente con 10 ó 20 gotas de agua, secar y examinar en el microscopio electrónico.

2. Tintes usados en microscopía electrónica para Virus

La tinción negativa fue aplicada por primera vez por Hall en 1955 para teñir virus. Estos tintes se utilizan para tinciones negativas, es decir, que los metales del tinte se depositan alrededor de las partículas viraies de tal forma que delinean el contorno del virus volviéndolo electrodenso; en cambio, toda el área de la partícula de virus es translúcida a los electrones.

Cuando el tinte penetra la cápside viral hasta el centro del virus, se produce una tinción positiva, en la cual toda la partícula es electrodensa, y su contorno es translúcido a los electrones.

Para una apropiada tinción negativa, el material biológico debe cumplir con ciertos requerimientos: sus constituyentes tienen que estar libres en la suspensión y sus diámetros no deben ser menores de 5 nm; se debe utilizar una concentración mínima de material; el material no debe interactuar con los tintes y debe tener una afinidad por la membrana de soporte; y, la preparación debe estar libre de detergentes.

Se asume que una solución de sales metálicas es capaz de ocupar las regiones hidratadas dentro y alrededor del objeto.

a) Acido Fosfotúngstico (PTA)

Normalmente se usa al 1 o 2% de PTA en agua destilada (p/v). La solución puede ajustarse al pH requerido por la adición (gota a gota) de NaOH 1N. El rango de pH usado es de 5, 6, 6,5, 7 y 8.

b) Molibdato de Amonio

Normalmente se usa de 0,5 a 2% en agua destilada. Se puede ajustar con NaOH 1N entre el rango de pH de 6 a 8.

c) Formiato de Uranilo (UrF)

Normalmente se usa de 1 a 2% en agua destilada. Se debe preparar y usar fresco. La solución es inestable al calor o la luz de tungsteno. Es un tinte ácido con pH 3. Sus mejores ventajas son alta resolución y contraste.

d) Acetato de Uranilo (UAc)

Normalmente se usa de 1 a 2% en agua destilada o al 4% en alcohol etílico al 50%. La solución es inestable al calor o a una luz de tungsteno. Es un tinte ácido con pH 3. Proporciona alta resolución y tiene mayor alto contraste que el UrF.

3. Métodos para Teñir Partículas Virales

Antes de teñir una muestra de virus es necesario disponer de rejillas para microscopía electrónica cubiertas con membranas adecuadas. Se utilizan rejillas de cobre de 200, 300 ó 400 mesh, dependiendo del tamaño del objeto que va a ser estudiado y de la clase de sustrato que se va a usar como membrana de soporte.

Comúnmente, se utilizan dos tipos de mebranas, de carbón y plásticas ("formvar", "collodion", etc.). Las membranas de carbón son superiores a las membranas plásticas debido a su mínimo grosor (1,5 a 2 nm), su pureza y su baja contribución a la imágen. Desafortunadamente, son frecuentemente hidrofóbicas y su preparación es muy costosa. Es por ello que resulta más práctico utilizar

membranas de plástico, que son de fácil preparación y menos costosas.

Las membranas de "formvar" se preparan de la siguiente forma:

En una solución de formvar al 0,8 - 1% (p/v) en cloroformo puro sumergir las placas portaobjeto de vidrio. Dejar secar y raspar los bordes del slide con una hoja de afeitar o bisturí. Desprender la membrana sumergiendo la placa (en un ángulo de 45°) en agua destilada. Colocar las rejillas invertidas sobre la membrana cuidadosamente y levantarlas con ayuda de un papel. Dejar secar.

Los métodos para teñir partículas virales varían de acuerdo a si la preparación es semipurificada o purificada, y normalmente se utilizan rejillas de carbón:

a) Para preparaciones purificadas que contengan sucrosa o soluciones amortiguadoras contaminantes:

Colocar una gota de bacitracina al 0,01% sobre el lado de la rejilla que tiene la membrana de carbón durante 15 segundos. Drenar y reemplazar la gota de bacitracina con una gota de la muestra durante 30 segundos. Drenar y secar. Luego, dejar flotando las rejillas sobre 6 ó 7 gotas de molibdato de amonio al 2% pH 6 a 7, sobre un papel parafinado. Dejar durante 3 a 5 minutos, remover, secar y examinar.

b) Para alta resolución a partir de preparaciones purificadas libres de contaminantes (purificaciones finales de virus libres de componentes celulares):

Colocar una gota de bacitracina al 0,01% sobre el lado de la rejilla que tiene la membrana de carbón durante 15 segundos. Lavar con 10 a 15 gotas de acetato de amonio 0,05M dejando una gota sobre la rejilla. Con un capilar de 10 ul diluir el virus dentro de la gota. Sin drenar, lavar con 6 a 10 gotas de acetato de uranilo o formiato de uranilo al 2%. Drenar, secar y examinar.

4. Métodos usados para examinar material fresco de hojas

a) Método "Epidermal Strip"

Se toma una rejilla con la ayuda de pinzas y se coloca en la rejilla una gota de agua destilada, solución amortiguadora o PTA. Utilizando las puntas finas de una pinza, desprender piezas de epidermis de la hoja. Colocar las piezas sobre la gota de líquido y agitar suavemente, teniendo cuidado de no romper la membrana de carbón. Después de 30 segundos, remover las piezas de epidermis, drenar la gota con papel filtro, y si no se ha utilizado tinte, lavar con 3 a 4 gotas del mismo. Drenar, secar y examinar al microscopio electrónico.

b) Método "Leaf Dip"

Tomar una rejilla utilizando pinzas y colocar sobre ella una gota de agua destilada, solución amortiguadora o PTA. De una hoja, cortar un pedazo pequeño de 1 x 3 mm y tomarlo con otra pinza por un extremo. Tocar la gota con el borde cortado de la hoja 10 veces. Remover la hoja, drenar con un papel filtro y teñir si es necesario.

c) Método "Leaf Squash"

Colocar sobre una lámina portaobjeto una pieza de hoja de 1 cm^2. Utilizar una segunda lamina, inclinada en 45 grados, para macerar la muestra. Adicionar algunas gotas de agua destilada, solución amortiguadora o PTA sobre la muestra, y utilizando la segunda lámina macerar el material completamente. Comprimir el macerado entre las dos láminas hasta que el líquido alcance uno de los bordes y escurrir una o dos gotas sobre un tubo de ensayo. Diluir con el líquido original hasta que tome un color verde pálido. Con una pipeta pasteur tomar una

muestra y colocar una gota sobre la rejilla. Teñir de la manera usual.

FIJACION

Solución A*	50 ml
HCl 0,2N	2,7 ml
$CaCl_2.2H_2O$	100 mg

*cacodilato de sodio 0,2 M

En algunos casos es recomendable fijar el material antes de teñirlo, porque se ha demostrado que durante el proceso de tinción negativa puede producirse un efecto degradativo, especialmente en las partículas virales. Esto ocurre frecuentemente con los geminivirus, los tenuivirus, los rhabdovirus y algunos otros grupos virales.

Solución stock:	
veronal de sodio	2,89 g
$CH_3COO.Na$	1,15 g
agua destilada	100 ml
Solución amortiguadora:	
solución stock	5 ml
agua destilada	15 ml
HCl 0,1N	5 ml*

*añadir gota a gota hasta un pH de 5,1

En la actualidad se dispone de dos excelentes tipos de fijadores para microscopía electrónica: el glutaraldehído y el tetraóxido de osmio.El glutaraldehído produce puentes transversales entre las proteínas y las estabiliza. El tetraóxido de osmio es un fijador muy útil para una post-fijación debido a su reactividad con una gran variedad de componentes celulares, a su total solubilidad, tanto en fase acuosa como lipídica, y a su potente efecto inhibidor de las reacciones enzimáticas.

paraformaldehído al 8%*	12 ml
cacodilato de sodio 0,1M	33 ml
glutaraldehído al 70%	2 ml

acetato de uranilo	100 mg
acetato de veronal 0,28 M	10 ml

En la preparación de los fijadores es necesario incorporar una solución amortiguadora que ayude a mantener un pH cercano al fisiológico del tejido a fijar. Los más utilizados son: veronal acetato, fosfato de sodio y cacodilato de sodio.

1. Preparación de soluciones amortiguadoras

a) Cacodilato de sodio 0,1M pH 7,4

Añadir HCl 0,2N gota a gota a la solución A hasta alcanzar un pH 7,4. Luego, incrementar el volumen de la solución hasta 100 ml con agua bidestilada. Disolver el dicloruro de calcio (2 hidrato) en la solución.

b) Acetato de veronal 0,28M

2. Preparación de Soluciones Fijadoras

a) Solución fijadora de Karnovsky's

*En un erlenmeyer de 100 ml disolver 4 g de paraformaldehído en 50 ml de agua bidestilada. Elevar la temperatura a 60°C. Añadir 1 gota de NaOH 1N hasta que la solución turbia se aclare. Enfriar y filtrar.

b) Solución fijadora de acetato de uranilo

c) Solución fijadora de tetraóxido de osmio

Preparar una solución de tetraóxido de osmio al 1% en solución amortiguadora cacodilato 0,1M pH 7,4.

3. Fijación del material

En primer lugar se debe usar material fresco y la muestra (por ejemplo hojas) se puede colectar en bolsas plásticas para su procesamiento inmediato. Esto significa que los especímenes biológicos se deben fijar inmediatamente en viales con la solución fijadora.

a) Colocar la hoja humedecida en Karnovsky sobre la bolsa o una plancha de plástico y cortar en pequeños pedazos de 1 mm^2. Colocar las piezas de hoja en viales con el fijador y dejarlas 1 hora a temperatura ambiente.

b) Colocar los viales a 50 Torr de vacío por 30 minutos y luego a presión atmosférica.

c) Lavar con solución amortiguadora cacodilato 0,1M pH 7,4 realizando 6 cambios de 10 minutos cada uno.

d) Fijar por segunda vez con tetraóxido de osmio al 1% en solución amortiguadora cacodilato durante 1 hora. Hacerlo en una campana extractora para evitar inhalar los gases del osmio que son muy tóxicos.

e) Lavar con solución amortiguadora cacodilato 0,1M realizando 2 cambios de 5 minutos cada uno y con solución amortiguadora acetato de veronal durante 5 minutos.

f) Fijar por tercera vez con acetato de uranilo al 1% en solución amortiguadora acetato de veronal durante 1 hora a temperatura ambiente.

g) Lavar con solución amortiguadora acetato de veronal realizando 2 cambios de 5 minutos cada uno y con agua bidestilada durante 5 minutos.

DESHIDRATACION

Se deshidratan las muestras en una gradiente de acetona o etanol al 30, 50, 70, 80, y 90% durante 5 minutos cada vez, y luego en acetona o etanol al 96% 3 veces durante 5 minutos cada vez. Finalmente se colocan en acetona o etanol al 100% 3 veces durante 10 minutos cada vez.

Si se utiliza etanol, entonces se le reemplaza luego con otro agente deshidratante como el óxido de propileno:

-3:1* durante 20 minutos.
-2:2* durante 20 minutos.
-1:3* durante 20 minutos.
-Oxido de propileno puro durante 20 minutos.
-Oxido de propileno puro durante 20 minutos.

* proporción etanol absoluto : óxido de propileno:

INFILTRACION

Se colocan los tejidos para su infiltración en las siguientes mezclas de acetona y el medio de inclusión ó de óxido de propileno y el medio de inclusión.

Es preferible utilizar resinas epóxicas como el medio de Spurr's (1969) que es una resina de baja viscosidad y de excepcional penetración en todo tipo de tejido:

-Acetona : Spurr (3:1) durante 30 minutos.
-Acetona : Spurr (1:1) durante 30 minutos.
-Acetona : Spurr (1:2) durante 30 minutos.
-Resina pura durante toda la noche.
-Resina pura durante 1 hora.

Dióxido de vinil ciclohexeno (ERL-4206)
Eter diglicídico de propileno-glicol (DER-736)
Anhidrido nonenilsuccínico (NSA)
Dimetil aminoetanol (S-1)

Cuando se utiliza el óxido de propileno como deshidratante:

-Oxido de propileno : Spurr (3:1) durante toda la noche.
-Oxido de propileno : Spurr (2:2) durante 2 horas.
-Oxido de propileno : Spurr (1:3) durante 2 horas.

-Resina pura durante 2 horas.
-Resina pura durante 2 horas.

Incluir las muestras en cápsulas de gelatina secas o moldes plásticos con resina fresca.

ERL-4206	10 ml
DER-736	6 ml
NSA	26 ml
S-1	0,4 ml

Colocarlas en una estufa a 60°C durante 24 a 48 horas para su polimerización.

Preparación de la Mezcla de Spurr

Las resinas de tipo "epoxi", casi no producen daño durante la polimerización. Forman puentes transversales que, una vez polimerizados, son insolubles en todos los solventes. Las resinas epoxi no se subliman cuando se irradian con electrones, protegiendo así a las estructuras de la distorsión.

La inclusión de células y tejidos en plástico es un paso esencial en microscopía electrónica y nos permite manejar el tejido en un medio sólido que facilita la obtención de secciones ultrafinas.

El medio de embebido Spurr, se compone de las siguientes sustancias:

La mezcla tiene una vida de uso de 3 a 4 días. Es fácil de preparar si los componentes se mezclan en una sola probeta y son correctamente embebidos. Es deseable que el catalizador (S-1) se agregue al final. El aire de la mezcla se puede eliminar en una campana de vacío.

Mezcle en una probeta graduada las siguientes cantidades en ese mismo orden:

REFERENCIAS

AGAR, A.W., R.H. ALDERSON y D. CHENOE. 1980. Principles and practice of electron microscope operation. Editado por Audrey M. Glavert (North-Holland Publishing Company). p. 345.

SPIESS, E., H.P. ZIMMERMANN y H. LIINSDORT. 1987. Negative staining of protein molecules and filaments. en Electron microscopy in molecular biology. A practical approach. Editado por J. Sommerville y U. Scheer. IRL PRESS Limited. pp. 147-150

HERNANDEZ, F. 1987. Historia de la microscopía electrónica. Los primeros microscopios electrónicos. Rev. Cost. Cienc. Med., 8(4): 199-202.

REID, N. 1975. Ultramicrotomy. Practical methods in electron microscopy. Editado por Audrey M. Glavert (North Holland / American Elsevier Publishing Co. pp. 213-253.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU),** constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

5.0 CONTROL

Fascículo 5.1 Estudio de Poblaciones de Afidos

INTRODUCCION

Pocos insectos transmiten virus de papa tan eficientemente como los áfidos. Mientras se alimentan de la savia de las plantas de papa, estos insectos pueden infectar un cultivo con virus dañinos como el virus del enrollamiento de las hojas de papa (PLRV), el virus del mosaico de la alfalfa y los virus Y, A y M de la papa.

Es particularmente importante controlar la diseminación de los virus provenientes de áfidos en los cultivos de papa destinados a la producción de semilla. Los tubérculos-semilla infectados por virus producen una baja densidad de plantas y menos tubérculos que la semilla libre de enfermedades.

Además, en cada nueva siembra, la calidad de los tubérculos reservados para semilla continúa degenerando. Finalmente, los rendimientos son tan bajos que los agricultores se ven obligados a comprar tubérculos limpios a un alto costo para renovar sus reservas.

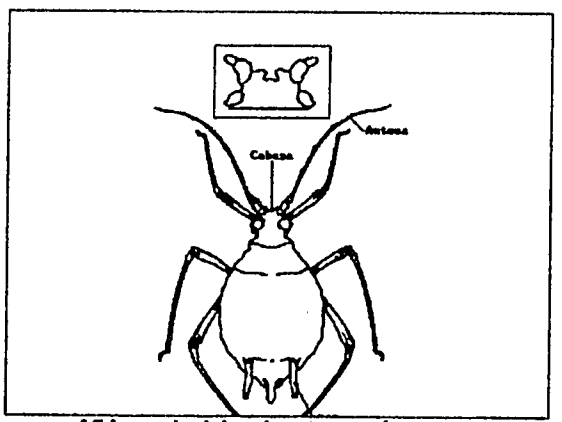
Cuando se seleccionan áreas posibles para producción de semilla, se debe primero estudiar la infestación de áfidos en los campos. Basándose en los datos obtenidos, se puede decidir mejor dónde, cuándo y cómo producir tubérculos-semilla.

El áfido

Muchas especies de áfidos transmiten virus de papa, pero el mayor daño es causado por

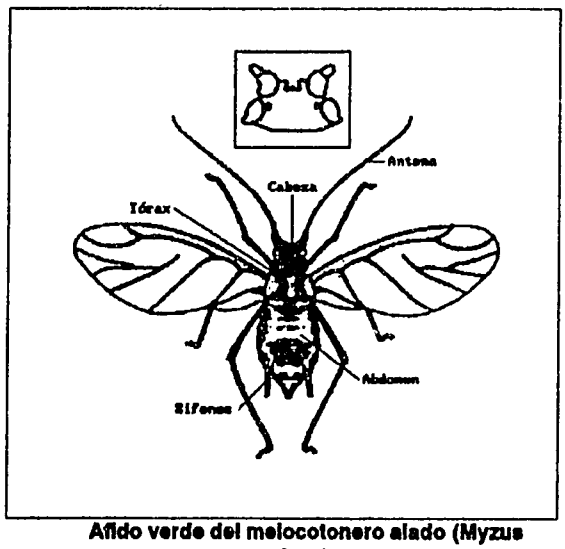
Myzus persicae (áfido verde del melocotonero). Este insecto, que se encuentra en todo el mundo, es el principal vector del virus del enrollamiento de la hoja de papa y del virus Y de la papa. Mide aproximadamente 1,5 a 2,5 mm de largo y tiene formas ápteras y aladas.

En la forma áptera, el cuerpo es ovoide y su cabeza es notablemente indentada. Este áfido es generalmente de un color verde claro a casi transparente, pero también puede ser de un rosado oscuro o de color de melocotón. Sus sifones son ligeramente abultados. Aun cuando existen áfidos ápteros en los campos, éstos tienen una importancia muy reducida en la diseminación de las enfermedades víricas.



Afido verde del melocotonero áptero (Myzus persicae)

La forma alada, por el contrario, puede causar un daño considerable. Este áfido, gracias al vuelo, puede diseminar rápidamente virus en un cultivo entero. En consecuencia, usted debe estudiar con atención cómo se comporta. La forma alada se distingue por cabeza y tórax de color entre pardo y negro. Como el áfido áptero, tiene su cabeza indentada. El abdomen puede ser verde, rosado o de un rojo opaco y tiene un parche negro característico. Sus sifones son ligeramente hinchados y del mismo color que el abdomen. Los extremos de los sifones son algo más oscuros.



Afido verde del melocotonero alado (Myzus persicae)

A continuación se describen tres métodos comunes para el estudio de poblaciones de áfidos:

- Conteo de áfidos por planta.
- Conteo de áfidos por hoja.
- Trampas amarillas de agua.

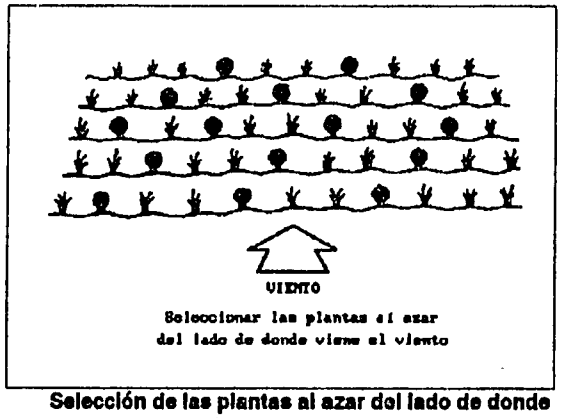
Aunque estas técnicas funcionan bien para estudiar el comportamiento de la mayoría de los áfidos, este trabajo está dirigido específicamente al estudio del áfido verde del melocotonero.

1. Conteo de áfidos por planta

El conteo de áfidos por planta, o el "método del golpe" como a veces se llama, es una técnica rápida y eficiente que se utiliza temprano en la temporada de cultivo cuando las plantas están jóvenes y las poblaciones de áfidos son bajas. Debe ser utilizada principalmente para detectar la migración inicial de los áfidos alados en un campo de papa. Esta migración no puede, normalmente, ser detectada solamente con trampas.

Procedimiento

Observar aproximadamente 50 plantas seleccionadas al azar de las primeras hileras del borde por donde llega el viento al campo. La primera afluencia de áfidos alados se establece generalmente en las plantas de estas hileras.



Selección de las plantas al azar del lado de donde viene el viento

Para recolectar los áfidos, poner una cartulina o un papel de color claro de aproximadamente 25 x 45 cm debajo de un lado de la planta. Sacuda suavemente la planta encima de la cartulina. Contar los áfidos que caen sobre la cartulina. La cuenta es bastante confiable aunque puede ocurrir que algunos áfidos alados salgan volando cuando se agite la planta.

Una bandeja cortada en mitades, o dos bandejas con muescas en los lados de modo que se puedan juntar dejando en el centro un hueco

donde encaja el tallo de la planta, funciona bien para recoger los áfidos que caen. Los conteos de áfidos por planta, cuando se hacen semanalmente, proporcionan datos suficientes para programar la aplicación de insecticidas. Esta técnica no se debe aplicar cuando las poblaciones de áfidos son altas.

El conteo de áfidos por planta ofrece las siguientes ventajas:

- las infestaciones tempranas de áfidos se detectan rápida y eficientemente en plantas jóvenes,
- se obtienen datos confiables para la aplicación de insecticidas, y,
- funciona bien en combinación con otras técnicas, en particular con las trampas amarillas de agua.

2. Conteo de áfidos por hoja

Cuando las plantas maduren y desarrollen más hojas, se deberá contar áfidos presentes en hojas por lo menos una vez a la semana para observar las infestaciones de áfidos. Esta técnica puede también ser utilizada en aquellos campos que no pueden ser visitados con tanta frecuencia como para efectuar el estudio con trampas de agua.

Procedimiento

Observar aproximadamente 50 plantas seleccionadas al azar en todo el cultivo. Examinar cuidadosamente tres hojas plenamente desarrolladas de cada planta: una hoja de cada una de las partes apical, media y basal.

Los áfidos se establecen en el envés (superficie inferior) de las hojas, y se debe tener cuidado en no alterarlos al voltear las hojas. Utilizar una lupa para contar la cantidad de áfidos alados y ápteros en cada hoja. Esta técnica también proporciona a los agricultores datos suficientes para la programación de aplicación de insecticidas.

Las ventajas del conteo de áfidos por hoja son lassiguientes:

- permite detectar las infestaciones de áfidos en las plantas que están demasiado maduras para la cuenta de áfidos por planta,
- da buenos resultados en las áreas posibles para producción de semilla, que sean estudiadas con poca frecuencia, y,
- proporciona datos confiables para la aplicación de aficidas.

3. Trampas amarillas de agua

La trampa de áfidos de uso más común es la trampa amarilla de agua. Este aparato muy fácil de utilizar, funciona bien ya sea sólo o en combinación con otras técnicas de estudio durante toda la temporada de cultivo. Su color amarillo brillante es especialmente atractivo para *Myzus persicae*. En consecuencia, los datos obtenidos de la trampa proporcionan una información precisa sobre el vuelo de los áfidos.

Hay dos tipos de trampas amarillas de agua: rectangular y circular. Las trampas rectangulares son las preferidas debido a que son fáciles de hacer y de bajo costo. Deben tener aproximadamente 50 cm de largo, 32 cm de ancho y 8 cm de profundidad. Están hechas de una lámina metálica para que no se deterioren en el campo. Las bandejas circulares de plástico también funcionan bien. Tienen que ser suficientemente grandes para cubrir un área que corresponda a la extensión de una planta de papa madura, es decir, aproximadamente 30 cm de diámetro.

Se puede escoger entre las bandejas rectangulares o las circulares; pero, para obtener datos comparables dentro de un mismo campo o una misma región, tienen que utilizarse bandejas de la misma forma y del mismo tamaño.

Las trampas amarillas de agua tienen un tubo de drenaje de aproximadamente 20 mm de

diámetro en el fondo de la bandeja donde se coloca un tapón. El fondo y hasta 2 cm de los costados interiores de la bandeja se pintan de amarillo y lo que queda de los costados y el exterior, se pinta de gris oscuro. Los entomólogos recomiendan utilizar el color amarillo primario del Estándar Británico (B.S.0-011), comúnmente llamado amarillo canario.

Si se cultivan las plantas en condiciones lluviosas, o si se aplica riego por aspersión, las trampas necesitan un rebosadero a un costado. Una malla simple o un pedazo de percalina puesto sobre el rebosadero permite el flujo del agua de exceso sin perder los áfidos.

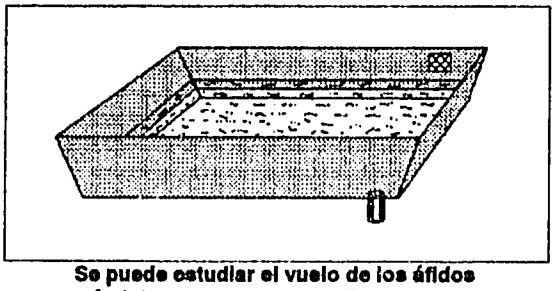
Procedimiento

Poner dos trampas aproximadamente a 5 m de distancia entre ellas en el campo. Instalarlas sobre unas plataformas más o menos a 60 cm del suelo. Quitar las plantas que podrían estar en contacto con las plataformas para impedir que los áfidos entren caminando a la trampa.

Normalmente, se ponen las trampas dentro del campo; sin embargo, algunos agricultores prefieren ponerlas inmediatamente fuera del campo. De esta manera, los trabajadores no necesitan caminar entre las plantas Para controlar las trampas.

Llenar las trampas con agua fresca y clara hasta 2 cm encima de la parte amarilla. Para romper la tensión superficial e impedir que los áfidos se escapen, agregar al agua unas cuantas gotas de algún detergente líquido.

Para limpiar la trampa, amarrar primero una bolsita de percalina al extremo del tubo de drenaje. Quitar el tapón y vaciar el agua a un balde. Recoger los áfidos de la bolsita de percalina y también los que queden en la trampa. Si el estudio va a continuar, la bandeja se vuelve a llenar con agua. Se puede utilizar la misma agua de la trampa si está limpia. Cuando se haya completado el estudio, voltear las bandejas o sacarlas del campo.



Se puede estudiar el vuelo de los áfidos capturándolos en trampas amarillas de agua, que son sencillas y de bajo costo

La frecuencia de evaluación de las trampas, depende del objetivo del estudio. Si los agricultores están buscando áreas buenas para la producción de tubérculos-semilla, las trampas deben ser evaluadas diariamente o, por lo menos, una vez a la semana durante toda la temporada de cultivo.

Para identificar las diferentes especies de áfidos en la trampa, puede ser necesario pedir la asistencia de un técnico experimentado de laboratorio. En tal caso, separar los áfidos de las demás especies de insectos y guardarlos en alcohol al 60 ó 70%. Para un almacenamiento a largo plazo, poner los áfidos en alcohol al 98% y rotular el recipiente con detalles de fecha y lugar de recolección. Basándose en el número de áfidos recolectados y en la presencia de virus en los campos, se puede saber cuáles son las áreas apropiadas para la producción de semilla.

Las ventajas de las trampas amarillas de agua son las siguientes:

- atraen a *Myzus persicae*, el principal vector de PLRV y PVY,
- proporcionan datos exactos sobre las poblaciones de áfidos, lo cual ayuda a seleccionar las áreas más adecuadas para la producción de semilla, y,
- funcionan bien tanto solas como en combinación con otras técnicas de estudio.

Las trampas amarillas de agua pueden ser utilizadas en cualquier momento durante la

temporada de cultivo. Son fáciles y sencillas de usar por los trabajadores del campo y proporcionan datos que ayudan a programar las fechas de siembra y cosecha y las aplicaciones de aficidas.

Consideraciones

Los datos sobre las poblaciones de áfidos deben ser registrados en esquemas parecidos al que se muestra en la última página. Recolectando datos exactos, se puede determinar cuándo una acumulación de poblaciones de áfidos puede afectar seriamente los cultivos.

Cada una de las tres técnicas para evaluar áfidos tiene aplicaciones específicas y es útil para estudiar poblaciones de áfidos. Aunque las correlaciones más altas se dan entre el número de áfidos alados capturados por día en las trampas amarillas de agua y la diseminación de PLRV, los entomólogos recomiendan que se combine este método con el conteo por planta u hoja para obtener los mejores resultados.

El conteo de áfidos por planta ayuda a detectar el comienzo de una infestación de áfidos, y el conteo de áfidos por hoja ayuda a medir el aumento de la población. Por ejemplo, según datos de algunos países, cuando las poblaciones de *Myzus persicae* son superiores a 20 áfidos por cada 100 hojas durante la parte temprana de la temporada de cultivo, el área no es apropiada para la producción de semilla.

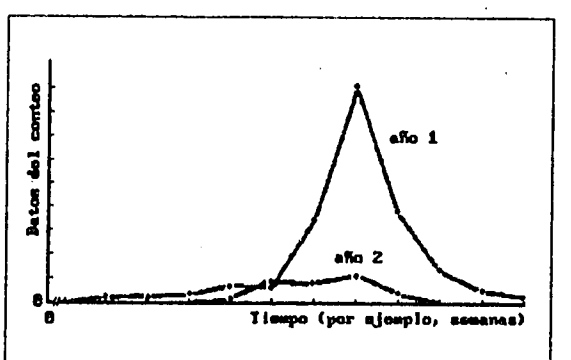
Mediante el estudio de las poblaciones de áfidos, los agricultores pueden conocer cuándo las poblaciones de áfidos son muy bajas o cuándo se llega al Límite crítico. El límite crítico indica cuándo las poblaciones de áfidos han llegado a ser suficientemente grandes como para causar en el cultivo un porcentaje de enfermedad virótica superior a lo permitido en un programa de certificación de semilla. Basándose en esta información, se pueden seleccionar las áreas que más convienen para producir tubérculos-semilla libres de enfermedades.

Utilización de datos sobre poblaciones de áfidos

Debido a las ventajas específicas de cada uno de los tres métodos, los entomólogos recomiendan aplicar más de uno durante la temporada.

Los conteos de áfidos en plantas pueden ayudar a detectar el comienzo de la infestación por áfidos. Los conteos de áfidos por hoja revelan el movimiento de los áfidos y la acumulación poblacional dentro de un cultivo. Los datos pueden ser representados gráficamente, utilizando como variable el tiempo; de este modo, se puede observar el avance de la infestación.

Las trampas amarillas de agua permiten el estudio del vuelo de los áfidos alados. Este vuelo está más directamente relacionado con la transmisión de virus que el movimiento de los áfidos ápteros.



Los datos del estudio de poblaciones de áfidos se pueden representar gráficamente utilizando el tiempo como variable. De ese modo se puede observar el avance de la infestación (comparación de dos años)

Los datos de los estudios de poblaciones pueden ayudar a pronosticar el grado de infección de virus. Sin embargo, hay que considerar variables adicionales como:

- susceptibilidad varietal,
- fecha de siembra,
- medidas de control de áfidos,
- prácticas de manejo de cultivos,
- condiciones climáticas.

En general, los datos de estudio de poblaciones de áfidos son útiles para:

- seleccionar las mejores áreas de producción de semilla,
- seleccionar las mejores temporadas de cultivo,
- programar la aplicación de insecticidas,
- programar fechas para destruir follaje y cosechar.

Se pueden diseñar experimentos para determinar la correlación entre los datos sobre las poblaciones de áfidos y la diseminación de virus. De esta manera se pueden determinar los límites críticos de las poblaciones de los vectores. Los límites críticos indican que las poblaciones de áfidos han llegado a ser lo suficientemente grandes para causar un grado económicamente significativo de infección de virus.

En áreas aceptables para la producción de semilla, sólo se capturan unos pocos áfidos *M. persicae* alados. A medida que aumenta el número de áfidos alados, aumenta la diseminación de virus. Esta correlación es más estrecha para PLRV que para PVY. La diseminación de PVY parece más errática y por eso, en este caso, es más difícil determinar los límites críticos. Debido a que PLRV normalmente es un problema más serio en la zona tórrida, la correlación de los datos de los estudios de poblaciones con la incidencia de PLRV es generalmente el indicador más práctico de las medidas que se deban tomar.

Esquema para Registro de Datos del Estudio de Poblaciones de Afidos

Región: País: Localidad:

Persona Responsable: Fecha de Siembra: Fecha de evaluación:

Método de estudio	Número de trampas o plantas	Especies de Afidos						Otras observaciones
		M. persicae		*M. euphorbiae*		Otros		
		alado	áptero	alado	áptero	alado	áptero	
Promedio								

Adaptado del "Boletín de Información Técnica 2", CIP, Lima-Perú, 1985 y de "Series CIP de Diapositivas Didácticas, Serie IV-2", CIP, Lima-Perú, 1984.

Para una mayor información sobre el estudio de áfidos, toma contacto con el Centro Internacional de la Papa (CIP), Departamento de Nematología y Entomología, Apartado 5969, Lima, Perú.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

5.0 CONTROL

Fascículo 5.2 Técnica de Inoculación Masiva con Pistola Pulverizadora para Evaluar la Resistencia a los Virus X e Y de la Papa

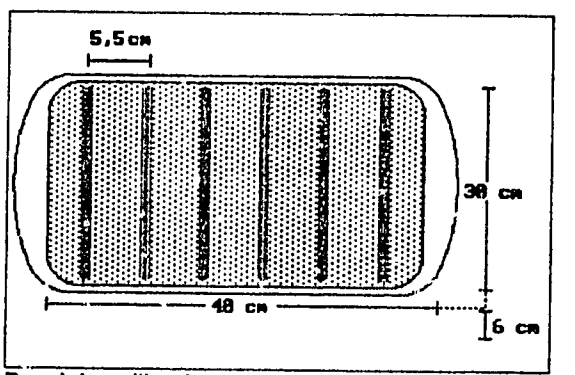
En un programa de cruzamientos para obtener resistencia al virus X de la papa (PVX) y al virus Y de la papa (PVY), usualmente es necesario evaluar un gran número de progenies y es aconsejable reducir el tamaño de la población eliminando, lo más temprano posible, el máximo número de progenies susceptibles. La técnica de inoculación masiva con pistola pulverizadora en las primeras etapas de la selección sirve para este propósito y evita la contaminación durante la inoculación con otros virus. El nivel de inmunidad para la resistencia a PVX y PVY y el carácter monogénico dominante para cada uno de ellos facilita el proceso de selección de progenies resistentes.

La técnica de inoculación masiva con pistola pulverizadora que se describe está basada en estudios para mejorar su eficiencia. Más del 96% de los almácigos se infectan y de ellos el 88% muestran síntomas, haciendo innecesario una segunda inoculación mecánica.

Después de la inoculación con PVX o PVY, los almácigos resistentes se pueden evaluar en el invernadero o en el campo para conocer su resistencia a otros patógenos como el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV), *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* y nematodos.

Procedimiento

Las semillas deben ser tratadas con ácido giberélico (1 ppm durante 24 horas) y se deben dejar secar como mínimo durante 2 días antes de ser sembradas. El ácido giberélico rompe la dormancia resultando en una mejor germinación y uniformidad de los almácigos. La siembra se realiza en bandejas de plástico de 30 x 40 x 6 cm; de esta forma se pueden obtener 150 almácigos por bandeja por familia. Distribuir las semillas en 6 filas paralelas distanciadas 5,5 cm entre sí.



Bandeja utilizada para sembrar e inocular almácigos de papa. Los surcos paralelos se pueden hacer con la ayuda de un molde de madera.

Cuando los almácigos alcanzan el estadío de 2 a 4 hojas (aproximadamente a las tres semanas de la siembra), se inoculan pulverizando el inóculo con un aerógrafo (pistola pulverizadora de pintura para artes gráficas) a una presión de aire de 25 a 30 lb/pulg^2 ó de 1,8 kg/cm^2.

La presión de aire es suministrada por un compresor. La marca más utilizada de pistola

pulverizadora es "Homi Y-4", fabricada en Japón (se puede utilizar otra marca de pistola que tenga las características adecuadas). Sus partes son metálicas y pueden ser autoclavadas. El tanque de la pistola tiene capacidad para 50 ml de inóculo, el suficiente para una bandeja de almácigos. Normalmente se utilizan de 50 a 100 ml por cada bandeja.

La pulverización debe realizarse lo más cerca posible a las hojas hasta que se observe alguna infiltración del inóculo. Esto toma alrededor de 2,2 segundos por plántula; sin embargo, la pulverización puede ser más rápida sin que se observe una disminución sensible en el porcentaje de infección. Se puede realizar en 0,6 segundos por plántula sin necesidad de observar infiltración.

El inóculo debe se diluido al 2% (p/v) (2 g de *Nicotiana occidentalis* infectada con PVY ó 2 g de *Nicotiana glutinosa* infectada con PVX en 100 ml de agua destilada). Las plantas que servirán de inóculo deberán tener de 15 a 25 días de inoculadas. El inóculo diluido se filtra a través de capas de gasa con 0,5% de Carborundum de 600 mesh.

Los almácigos inoculados se transfieren a un invernadero con 16 a 28°C de temperatura. Inmediatamente después de la inoculación, los almácigos deben cubrirse con papel húmedo durante 24 horas para conservar la humedad.

Los síntomas aparecen en 4, 11 y hasta 21 días después de la inoculación. Separar los almácigos que no muestren síntomas y luego de 3 a 4 semanas transferirlos a macetas individuales. Esperar a que las plantas formen tubérculos o bien esperar de cuatro a cinco semanas para transplantarlas al campo para su evaluación agronómica.

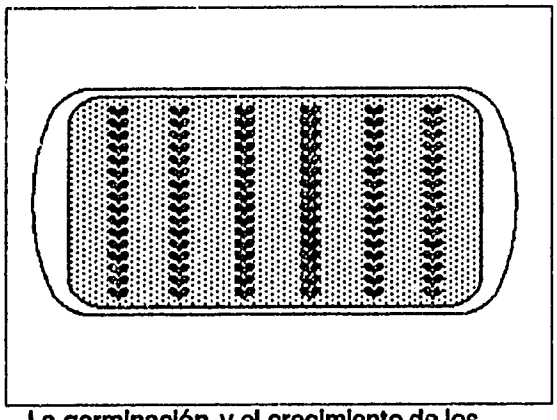
Modificado de:

FERNANDEZ-NORTHCOTE, E. 1991. Potato seedling screening for resistance to potato viruses X and Y by the mass inoculation technique. CIP Research Guide 37. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 12 pp.

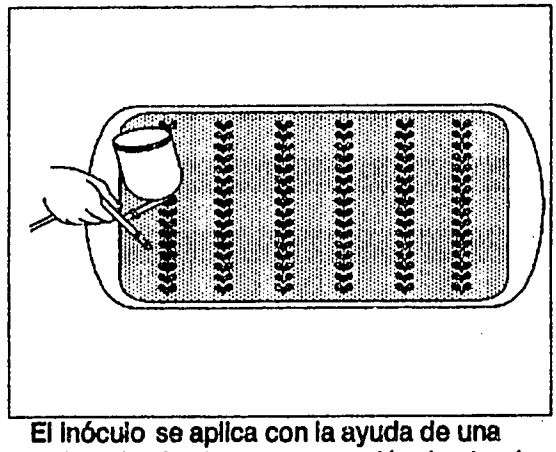
REFERENCIAS

DAVILA, C. R, y E.N. FERNANDEZ-NORTHCOTE. 1984. Factor affecting the potato seedling screening for resistance to potato virus Y by using the mass inoculation technique with spray gun. En EAPR 9th Triennial Conference, Interlaken, Schweiz. Abstracts of Conference Papers. p. 154.

LINDNER, R.C. y H.C. KIRKPATRICK. 1959. The airbrush as a tool in virus inoculations. Phytopathology 49: 507-509.



La germinación y el crecimiento de los almácigos debe ser uniforme. El tratamiento de las semillas con ácido giberélico sirve para este fin.



El inóculo se aplica con la ayuda de una pistola pulverizadora a una presión de aire de 25 a 30 lb/pulg^2.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

5.0 CONTROL

Fascículo 5.3 Cultivo de Tejidos para la Eliminación de Patógenos

Los patógenos vegetales, tales como nematodos, hongos, bacterias y virus, pueden ser transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas. Sin embargo, no todas las células resultan infectadas; los tejidos meristemáticos se encuentran algunas veces libres de enfermedades por lo que es posible recobrar plantas no infectadas mediante técnicas de cultivo in *vitro* de meristemas, y lograr su crecimiento como plantas sanas.

1. Naturaleza de los patógenos

Los patógenos vegetales incluyen nematodos, hongos, bacterias, rickettsias, micoplasmas, virus y viroides y pueden ser transmitidos de plantas enfermas a plantas sanas. Hasta el momento no existe información sobre rickettsias patógenas de papa. El tamaño relativo de estos patógenos varía mucho. Entre los patógenos vegetales, los nematodos son los más grandes y pueden ser observados fácilmente con un microscopio estereoscopio. Los viroides y los virus son los más pequeños, y para la observación de éstos últimos se requiere de un microscopio electrónico

La ocurrencia de una enfermedad no sólo depende de la relación del hospedero y del patógeno. Las condiciones ambientales, especialmente la humedad y la temperatura, juegan un papel importante en el desarrollo de una enfermedad. Así, una enfermedad puede definirse como el producto de la interacción entre el hospedero, el patógeno y el ambiente

Este concepto de una enfermedad es conocido como " triángulo de la enfermedad".

La distribución de los diferentes patógenos dentro de la planta varía también mucho. *Pseudomonas solanacearum*, el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) y los micoplasmas están restringidos al tejido vascular de una planta. *Erwinia carotovora* y el virus X de la papa (PVX), invaden tanto el tejido vascular como el resto de los tejidos de la planta. No todas las células en una planta enferma se encuentran infectadas con patógenos. Los tejidos meristemáticos de la raíz y de los brotes terminales de una planta infectada están, algunas veces, libres de virus. En algunas ocasiones, tal como sucede en la papa con el PVX y el TRV ("tobacco rattle virus), solamente la cúpula y los primeros primordios foliares se encuentran libres de virus. Se desconoce la razón exacta por lo que esto sucede; sin embargo, se cree que uno, o todos, de los siguientes factores son responsables de ello:

a) Alta actividad metabólica.

Los virus se multiplican acompañando el curso del metabolismo del hospedero. Debido a la gran actividad metabólica de las células meristemáticas del hospedero, los virus no

pueden tomar el control de la maquinaria biosintética de las mismas.

b) Carencia del tejido vascular.

Los virus que se ubican tan sólo en el floema (PLRV) no pueden invadir los tejidos meristemáticos debido a la ausencia de diferenciación celular. En esta zona meristemática, los virus que infectan los tejidos no vasculares se diseminan de célula en célula a través de los conductos intercelulares (plasmodesmos). Este es un proceso lento por lo que resulta relativamente difícil que los virus infecten en su totalidad a las células que vienen dividiéndose rápidamente.

c) Alta concentración de auxinas.

Los tejidos meristemáticos de las plantas tienen una concentración más alta de auxinas que los tejidos de otras partes de las mismas. Algunos autores indican que estas auxinas inhiben la multiplicación de los virus.

Debido a que los tejidos meristemáticos se encuentran algunas veces libres de patógenos, es posible recobrar plantas no infectadas mediante técnicas de cultivo *in vitro* de meristemas, y mantenerlas hasta obtener plantas adultas sanas.

2. Termoterapia

La termoterapia a temperaturas elevadas (37°C) no elimina al viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd). El PSTVd está compuesto por una molécula circular de RNA enroscada a manera de una gran espiral. Por esta razón es resistente a las nucleasas. Las altas temperaturas, lejos de reducir la concentración del viroide, favorecen su multiplicación. Por lo tanto, debe llevarse a cabo una prueba para detectar PSTVd al finalizar el período de termoterapia.

Un método que permite la erradicación del PSTVd se basa en la observación de que en las plantas que crecen con temperaturas bajas, la concentración del viroide es baja. En un experimento, las plantas fueron mantenidas a 8°C durante cuatro meses y luego se disectaron los meristemas apicales. El 30% de las plántulas regeneradas estaban libres de PSTVd, aun en la segunda generación de tubérculos. Se observó una típica relación inversa entre el tamaño de la disección meristemática y el éxito en la erradicación.

Este método, sin embargo, no es apropiado como una técnica de rutina debido a que toma mucho tiempo y es muy costoso. Puede ser muy útil en casos específicos en los cuales un clon muy valioso se encuentre muy infectado y no se cuente con material que haya pasado la prueba contra este patógeno.

Experimentos llevados a cabo con diferentes sistemas de virus y sus hospederos han demostrado que el tratamiento de plantas con temperaturas elevadas (termoterapia) lleva a una reducción en la concentración del virus en la planta. Se han dado diferentes razones para explicar este fenómeno; probablemente no sólo una, sino una combinación de ellas pueden ser la causa de la reducción en la concentración del virus. Estas pueden incluir competencia por lugares de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, entre las células del hospedero que se encuentran en rápida división y las partículas del virus, lo cual puede llevar a un cambio en el balance entre la síntesis y degradación de las partículas virales. También el ácido nucleico del virus, portador de su información genética, está normalmente protegido del ataque de enzimas degradantes por una cubierta compuesta de muchas subunidades proteicas. A altas temperaturas, la unión entre estas subunidades se vuelve más débil, se pueden producir aberturas temporales y permitir el ataque de las nucleasas, lo que inactiva al virus y disminuye la concentración del mismo.

La termoterapia ha sido aplicada a tubérculos de papa en reposo. Se ha observado una reducción en la concentración de virus, espe-

cialmente del virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV). Sin embargo, la eliminación de todos los virus no ha sido lograda, con la excepción del PLRV.

La termoterapia aplicada a la planta entera, al igual que la aplicada a tubérculos ya brotados, seguida por cultivo de meristemas, ha sido exitosamente utilizada para la eliminación de muchos virus de papa.

En el procedimiento estándar empleado en el CIP, los mejores resultados han sido obtenidos cuando la planta es decapitada antes de ser tratada por termoterapia, y las yemas axilares se encuentran creciendo mientras reciben el tratamiento de calor. Un régimen de temperatura diaria de 36°C durante 16 horas y de 30°C durante 8 horas, bajo luz continua de alta intensidad (10 000 lux + 108 $uEm^{-2}s^{-1}$) mejoró las tasas de eliminación. Las plantas son mantenidas bajo estas condiciones durante cuatro semanas. meristemas, tanto de las yemas axilares como de las yemas apicales, son aislados y cultivados como se muestra en la sección 6.

El proceso de termoterapia antes señalado se está también aplicando a plántulas *in vitro*. Nudos con una yema son colocados en cajas de plástico (Magenta GA-7) conteniendo el medio C (20 nudos/caja). Estas se colocan en el cuarto de cultivo con las condiciones apropiadas. Cuando las plantas alcanzan 3 cm de altura aproximadamente y presentan un buen sistema radicular, se sellan las cajas con cinta adhesiva y se continúa en forma similar al procedimiento *in vivo*. Al cabo de un mes de tratamiento se aíslan y siembran los meristemas apicales.

3. Quimioterapia

Como una alternativa a la termoterapia, se ha probado en papa la quimioterapia. Un análogo de nucleósido, el Virazole, conocido por su amplio espectro contra el DNA y el RNA de los virus que afectan a los animales, ha mostrado resultados variables cuando se ha aplicado en plantas de papa mediante aspersión o mediante cultivos hidropónicos, seguido de cultivo de meristemas. Resultados preliminares muestran cierta promesa cuando los ápices meristemáticos disectados son cultivados en un medio con 100 ppm de Virazole.

Sin embargo, algunos informes indican que los productos químicos antivirales pueden causar mutaciones en las plantas. Por lo tanto, hasta ahora la termoterapia definitivamente es el método preferido de pre-tratamiento antes de efectuar el cultivo de meristemas.

4. Esterilización de la superficie

Si la superficie del material vegetal está contaminada por patógenos o saprófitos, y éste es sembrado en un medio de cultivo, algunos de los contaminantes crecen rápidamente y pueden matar al tejido y al órgano (explante) de la planta. La mayoría de los contaminantes de superficie, tales como bacterias y hongos, pueden ser eliminados por esterilización de la superficie del material vegetal con un agente esterilizador apropiado.

Los agentes esterilizadores de la superficie se aplican normalmente durante 10 a 15 minutos. Bajo condiciones asépticas, la solución esterilizadora es luego eliminada y el material vegetal lavado 3 ó 4 veces durante 5 minutos cada vez por agitación en agua destilada estéril. El lavado es muy importante para eliminar el exceso del agente esterilizador el cual puede inhibir el crecimiento de la planta.

a) Etanol (alcohol)

El alcohol es un agente esterilizador común de la superficie para eliminar bacterias y hongos, y es frecuentemente utilizado como un breve lavado antes de aplicar otros tratamientos de esterilización de la superficie de las plantas. Tiene una baja tensión superficial y puede

penetrar fácilmente entre las pilosidades foliares y mojar la superficie de la planta. El etanol al 70% es más efectivo como agente esterilizador que el de 95% ó 100%.

b) Hipoclorito de sodio o de calcio

La superficie del material vegetal puede también ser esterilizada con soluciones acuosas de hipoclorito de sodio (NaOCl) o de hipoclorito de calcio (Ca[OCl]). La sal de calcio es preferida porque es menos fitotóxica. Muchos laboratorios utilizan lejía de uso doméstico tal como Clorox. Estos productos comerciales contienen normalmente 5,25% de NaOCl como principio activo. Cuando se les diluye con agua (1 parte de lejía por 9 partes de agua), la solución esterilizadora resultante deberá contener no menos de 0,5% de NaOCl.

Debido a la disociación completa, el hipoclorito tienen una actividad relativamente pequeña a un pH superior a 8,0 y es más efectivo fijando la solución alrededor de un pH de 6,0. La superficie del tejido, disectado y sumergido completamente en la solución de hipoclorito, queda esterilizada después de una exposición de 10 ó 15 minutos. A continuación del tratamiento con hipoclorito, el material tratado debe ser lavado cuidadosamente con varios cambios de agua destilada para eliminar completamente el desinfectante.

c) Bicloruro de mercurio

El bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) ha sido utilizado como desinfectante pese a que es extremadamente tóxico. La solución de bicloruro de mercurio es volátil a temperatura ambiente y puede provocar envenenamiento por mercurio. Por lo tanto no recomendamos su uso como agente esterilizador.

d) Bactericidas y fungicidas.

Con el material que se encuentra fuertemente contaminado, algunos investigadores recomiendan el lavado en una mezcla bactericida/fungicida comercial antes de proceder a la esterilización de la superficie. Debe recordarse, sin embargo, que este tratamiento no tiene efecto sobre infecciones sistémicas. La sección 5 da una lista de bactericidas y fungicidas conjuntamente con información referente a su uso.

5. Antibióticos

A pesar de ser utilizados rutinariamente en el cultivo de células animales para prevenir contaminaciones bacterianas, los antibióticos no han sido muy utilizados en cultivo de tejidos vegetales. Los fisiólogos, a finales de los años 50, sabían que estos productos naturales pueden alterar el crecimiento y desarrollo de los cultivos *in vitro* de tejidos vegetales. De hecho, los tejidos vegetales son sensibles a los antibióticos y muestran una respuesta variable de acuerdo a su genotipo.

La mayoría de los especialistas en cultivo de tejidos no confían en los antibióticos para eliminar los contaminantes superficiales en las disecciones. Estos productos son caros y ninguno es efectivo contra todos los tipos posibles de organismos contaminantes. Los antibióticos son utilizados sólo cuando los microorganismos son difíciles de eliminar por otros medios

Los siguientes antibióticos o combinaciones de los mismos han sido exitosamente aplicados:

Cefotaxina
Gentamicina
Rifampicina
Nistatina + Carbenecilina
Gentamicina + Amfotericina B
Vancomicina HCl + Micostatin
Estreptomicina + Carbenecilina

En algunos casos se ha encontrado fitotoxicidad causada por:

Penicilina
Estreptomicina
Bactericina

Esparsomicina

En el CIP, para erradicar bacterias o levaduras se está utilizando con cierto éxito la incorporación de antibióticos al medio de cultivo. En caso de bacterias, se recomienda usar Rifampicina (Rimactán 300-CIBA) a una concentración de 40 g/l o Cefotaxima sódica (Claforán ROUSSEL) a 200 mg/l.

Se prepara una solución concentrada del antibiótico a utilizar (Rifampicina 12 000 mg/l ó Claforán 40 000 mg/l), se esteriliza por filtración y se coloca en pequeños cuadrados de papel filtro estéril (5 x 5 mm), los cuales se dejan secar en una cámara de flujo laminar. Se colocan aproximadamente 0,03 ml de solución concentrada por cada cuadrado de papel. Se recomienda no utilizarlos después de siete días de haberlos preparado, ya que pierden progresivamente su eficacia.

Este trabajo debe realizarse bajo condiciones de asepsia. Los cuadrados de papel son introducidos en el medio de cultivo junto a la yema sembrada, y ésta debe ser transferida a medio fresco con otro papel-antibiótico cada 3 ó 5 días. También se pueden usar otros antibióticos como Cefoxitina (Mefoxin MERCK) en dosis de 500 ppm.

En el caso que la contaminación sea por levaduras, se recomienda usar Anfotericina B en dosis de 0,25 ppm a 0,5 ppm, siguiendo en todos los casos el mismo sistema del papel filtro.

6. Aislamiento y cultivo de meristemas

El punto de crecimiento del ápice de la planta es el meristema. Es una zona pequeña compuesta de células meristemáticas que se dividen rápidamente.

El domo de la yema contiene las verdaderas células meristemáticas y está rodeada por primordios foliares y hojas primarias. debido a que los tejidos vasculares más diferenciados se encuentran alejados de los meristemas (hacia los tejidos más viejos del tallo), los elementos vasculares de los primordios foliares son incipientes, y no han hecho aún contacto con la parte principal del sistema vascular del tallo. Por lo tanto, las partículas de virus que puedan estar presentes en el sistema vascular pueden llegar a la zona meristemática del ápice solamente moviéndose de célula en célula; un proceso muy lento. Esta es una de las razones principales del porqué en una planta infectada con virus la concentración de éstos disminuye acropetalmente hacia los meristemas tanto del ápice como de las yemas axilares.

El aislamiento en condiciones asépticas de la porción apical, llamada punto meristemático, y su cultivo en un medio nutritivo adecuado e igualmente aséptico, permite el desarrollo de plántulas. En principio, esta secuencia de desarrollo sigue un patrón similar al de aquel presente en una planta normal. Las células del meristema se dividen y la diferenciación de nuevos tejidos continúa. La nutrición de la sección disectada de la planta es proporcionada por el medio artificial. Esta técnica, llamada cultivo de meristemas, fue aplicada por primera vez para la erradicación de virus en dalias hace unos 30 años por Morel y Martin (1952), y lleva a la obtención de plantas libres de patógenos.

La disección aséptica del meristema es un proceso delicado y requiere muchas horas de práctica. El procedimiento es el siguiente:

Se cortan los tallos de la planta, que acaba de ser sometida a termoterapia, en segmentos que contengan cada uno un nudo con su yema axilar. Se remueven las hojas cuidadosamente. Se desinfectan los segmentos de tallo durante 30 segundos en alcohol al 70%, y a continuación con hipoclorito de calcio al 2,5% durante 15 minutos. Luego los tallos son lavados cuatro veces, por cinco minutos cada vez con agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito.

Bajo un microscopio binocular de disección, se eliminan las hojuelas que rodean el punto de crecimiento hasta que quede solamente la cúpula de la yema apical y unos cuantos primordios foliares (generalmente dos). La cúpula y dos primordios foliares son disectados y transferidos al medio de cultivo meristemático A (ver sección 8). El meristema disectado es transferido semanalmente al medio B. Después de 6 a 8 semanas, las pequeñas plántulas son subcultivadas para un mayor crecimiento y micropropagación.

Después de la regeneración a partir de los meristemas, las plantas son probadas para detectar cualquier infección persistente de virus.

7. Mantenimiento de cultivos

El material *in vitro* pueden ser conservado en cultivos por un tiempo indefinido cuando se toman suficientes precauciones para evitar contaminaciones y cuando la transferencia a medio fresco es realizada a intervalos apropiados. Las plántulas *in vitro* probadas contra patógenos pueden ser mantenidas como colecciones base para la propagación en un programa de semilla.

Para mantenimiento por un período corto, las plantas son mantenidas en tubos sobre el medio de propagación C ó D (ver sección 8). Los tubos son sellados con tapas de plástico autoclavables. Estas son mejores que los tapones de algodón que pueden ser penetrados fácilmente por las esporas de hongos presentes en el aire y por insectos.

La tasa de crecimiento de las plantas depende de la temperatura de incubación, la com-posición del medio y del genotipo.

Los medios E y F para almacenamiento (ver sección 8) ejercen un estrés osmótico sobre las plántulas y pueden ser utilizados para almacenamiento a 25 °C; el estrés reduce la tasa de crecimiento y da lugar a entrenudos cortos. Muchos nudos están así disponibles cuando se inicia la propagación del material almacenado. El material almacenado bajo estas condiciones necesita normalmente ser transferido solamente una vez al año.

Si la temperatura puede bajarse a 6°C, esto reduce significativamente la tasa de crecimiento de las plántulas y las transferencias son requeridas solamente una vez cada 2 ó 3 años.

Es posible, por lo tanto, mantener una colección de germoplasma bajo condiciones de almacenamiento descritas anteriormente. Cuando se recibe un pedido para la exportación de un determinado genotipo probado contra patógenos, éste puede sacarse del almacenamiento, ser micropropagado, y luego ser distribuido *in vitro*.

8. Medios de cultivo

Todos los medios utilizados para este trabajo están basados en las sales de Murashige y Skoog (1962). Las soluciones concentradas de sales son normalmente preparadas en cuatro partes separadas:

Sales
$MgSO_4$
Hierro
Vitaminas

a) Solución concentrada de sales

NH_4NO_3	35,0 g
KNO_3	40,0 g
$CaCl_2.2H_2O$	9,0 g
KH_2PO_4	3,5 g
H_3BO_3	0,1 g
$MnSO_4.4H_2O$	0,5 g
$MnSO_4.H_2O$	0,4 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,2 g
$ZnSO_4.H_2O$	0,2 g
KI	0,02 g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,005 g

Disuelva cada sal en 200 ml de agua destilada:

Disuelva 5 mg (0,005 g) de $CuSO_4.5H_2O$ y 5mg de $CoCl_2.6H_2O$ en 10 ml de agua; agregue 1 ml de esta solución a 200 ml de agua para la solución concentrada.

Mezcle las diez soluciones de sales individuales juntas para hacer 2000 ml (2 l) de la solución concentrada de sales.

b) Solución concentrada de sulfato de magnesio

Mezclar 3,7 g de $MgSO_4.7H_2O$ en 100 ml de agua destilada.

c) Solución concentrada de hierro

Na_2EDTA	0,75 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,55 g

Disuelva $FeSO_4.7H_2O$ en 20 ml de agua destilada; Na_2EDTA en 20 ml de agua destilada caliente. Mezcle las soluciones frías y lleve a 100 ml con agua destilada

d) Solución concentrada de vitaminas

Tiamina	0,4 mg/l	20 mg
Glicina	2,0 mg/l	100 mg
Acido nicotínico	0,5 mg/l	25 mg
Piridoxina	0,5 mg/l	23 mg

Disolver cada vitamina y completar hasta 500 ml con agua destilada. Repartir 10 ml de la solución de vitaminas en pequeños envases y mantenerlos congelados. Utilizar un envase por cada litro de medio.

e) Preparación del medio

Prepare 1 000 ml (1 l) del medio básico de Murashige-Skoog (MS) mezclando las soluciones concentradas en las siguientes proporciones:

Sales	100 ml
MgSO4	10 ml
Hierro	5 ml
Vitaminas	10 ml
Inositol	100 mg

Agregue las hormonas que correspondan y sacarosa (vea la página siguiente) y ponga el medio, con o sin agar, en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Modificado de:

LIZARRAGA, R., A. PANTA, U. JAYASINGHE y J. DODDS. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos. Guía de investigación CIP-3. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 21 pp.

Adiciones al medio MS básico para la preparación de tipos específicos de medios.

Medios	Medio Ms	+	los siguientes ingredientes
A	0,1 mg/l		ácido giberélico
Para meristemas	0,04 mg/l		kinetina
	2,5%		sacarosa
	0,6%		agar*
B	0,1 mg/l		ácido giberélico
Para meristemas	20,2 mg/l		putrescina HCl
	2,5%		sacarosa
	0,6%		agar*
C	1,0 mg/l		ácido fólico
Para propagación	50,0		agua de coco
	4,0 mg/l		L-arginina HCl
	2,0 mg/l		Pantotenato de calcio
	10,0 mg/l		putrescina HCl
	3,0%		sacarosa
	0,8%		agar*
D	0,1 mg/ml		ácido giberélico
Para propagación	2,5%		sacarosa
	0,8%		agar*
E	4,0%		sorbitol
Para almacenamiento	2,0%		sacarosa
	0,8%		agar*
F	4,0%		manitol
Para almacenamiento	3,0%		sacarosa
	0,8%		agar*

* Otros agentes gelificantes como Phytagel o Gelrite (Marca registrada) se pueden utilizar en lugar de agar. Phytagel se añade en mitad de la concentración de agar y Gelrite se utiliza a un cuarto de la concentración del mismo.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

6.0 DETECCION / Purificación

Fascículo 6.1 Fundamentos de la Purificación de Virus de Plantas

El conocimiento acerca de un virus, antes que éste sea purificado, es muy limitado. Se necesitan preparaciones de virus muy puras para realizar estudios químicos, físicos y otros estudios biológicos. Existen muchos virus que infectan plantas y se dispone de varios procedimientos de purificación diferentes para adaptarse a cada uno de ellos. Sin embargo, podemos reconocer varios sistemas diferentes de purificación de acuerdo al tipo de virus.

Grupo 1. Un solo componente nucleoproteico

Las partículas de virus de este grupo contienen una molécula de ácido nucléico central (que lleva la información genética) rodeado por una cubierta proteica. El virus del mosaico del tabaco y los virus esféricos parecidos al virus del mosaico del pepino y al virus del enrollamiento de la hoja de la papa pertenecen a este grupo. Hasta el momento la mayoría de los virus de plantas aislados pertenecen a este grupo.

Grupo 2. Nucleoproteínas multicompuestas

Además de las partículas nucleoproteicas características, muchos virus tienen otras partículas que no contienen ácido nucléico. Otros virus pueden tener varias partículas diferentes que contengan cantidades diferentes de ácido nucléico. Los métodos usados en lapurificación de estos virus son muy similares a las del Grupo 1, pero en el paso final, los tipos diferentes de partículas virales son separados haciéndose uso de las diferencias en sus coeficientes de sedimentación o densidades.

Grupo 3. Virus satélite

Algunos virus son incapaces de multiplicarse solos en un hospedero a menos que éste sea simultáneamente infectado con otro virus. (Ejemplo: el virus satélite del virus de la necrosis del tabaco.) En este sistema los dos virus son propagados juntos y luego separados durante o después de la purificación.

Grupo 4. Virus cubiertos

Además de la cubierta proteíca que encierra al ácido nucléico, estos virus tienen una membrana externa compuesta de lípidos. Estas membranas lipídicas son muy delicadas y se dañan fácilmente causando la inactivación de las partículas. Además, los procedimientos de purificación de virus en el Grupo 1 y que son dirigidos hacia la destrucción de membranas no son adecuados para estos virus. Se deben utilizar métodos más suaves.

Grupo 5. Viroides

Los viroides, como el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd), no tienen una

cubierta proteica. Son moléculas de ácido nucléico libres. Los métodos de purificación utilizados están basados en aquellos que sirven para el aislamiento de ácidos nucléicos. No se pueden aislar por ninguno de los procedimientos utilizados para los cuatro grupos anteriores.

Aunque existen muchos métodos de purificación diferentes para aislar virus, hay algunos pasos muy comunes en todos ellos:

a) Los virus deben ser propagados en un hospedero apropiado en el cual alcancen altas concentraciones.

b) Los virus tienen que ser extraidos a un medio líquido con una pérdida mínima de infectividad.

c) El extracto debe ser clarificado para remover la mayor parte del material del hospedero.

d) El virus aislado debe ser concentrado a un volumen más pequeño.

Las purificaciones siempre deben ser realizadas con virus que sean biológicamente puros. Esto quiere decir que los cultivos de virus estén libres de otros virus contaminantes o que no contengan mezclas de aislamientos o "strains" diferentes. Los virus mutan muy rápidamente y es muy difícil evitar la producción de mutantes en un cultivo. Sin embargo, la tasa de mutación de los virus puede ser mantenida a un mínimo suprimiendo las condiciones en que éstas son más frecuentes, como temperaturas elevadas, irradiación y exposición a componentes químicos mutagénicos. El virus aislado debe ser analizado periódicamente utilizando plantas indicadoras para determinar la posible existencia de mezclas.

El cultivo del virus puede ser mantenido biológicamente puro inoculando plantas indicadoras en las que se produzcan lesiones locales y aislando al virus de la lesión e inoculándolo a otra planta hospedera. La transferencia de varias lesiones locales reduce la probabilidad de que el aislamiento esté contaminado con otro virus u otro "strain" del virus. Una vez que el cultivo esté puro, se deberá tomar toda precaución para prevenir su contaminación.

SELECCION DEL HOSPEDERO PARA LA PURIFICACION

Es importante elegir a una planta hospedera de la que se obtengan grandes cantidades de virus, ya que la concentración del mismo puede variar considerablemente en diversas plantas hospederas. Las plantas infectadas sistémicamente con el virus son siempre preferidas a aquellas en las cuales el virus está localizado.

La facilidad y la velocidad de propagación en la planta hospedera y el estado de crecimiento en el que pueden ser inoculadas, son factores importantes a considerar durante la selección.

Es muy conveniente que las plantas hospederas seleccionadas no contengan grandes cantidades de taninos, gomas ni compuestos fenólicos puesto que estos compuestos interfieren con la purificación de virus. Generalmente, estos compuestos están presentes en grandes cantidades en plantas leñosas haciéndolas inapropiadas para los trabajos de purificación.

Las condiciones bajo las cuales las plantas inoculadas crecen determinan la concentración del virus en éstas. Se obtienen rendimientos máximos en plantas de crecimiento vigoroso. Las condiciones medio ambientales como la temperatura y la luz afectan la concentración del virus. Usualmente las temperaturas bajas retardan su multiplicación, pero las temperaturas más altas inducen su mutación.

Generalmente, una temperatura de 20-25°C es apropiada.

intensidades de luz baja también ayudan a inducir la multiplicación del virus. En regiones donde la intensidad de luz es más alta, la reducción de la intensidad de la luz a un 20% de la iluminación externa normal dentro del invernadero favorece la multiplicación del virus en el hospedero. Los nutrientes de las plantas y la duracion del día pueden afectar la multiplicación del virus; sin embargo, sus efectos no son tan importantes como los de la luz y la temperatura.

Ciertos virus de plantas se multiplican durante largo tiempo en las hojas mientras que otros alcanzan un pico de concentración dentro de un período corto de tiempo. En ciertos virus la concentración se incrementa hasta un cierto nivel y luego comienza a disminuir. Es importante cosechar las hojas cuando la concentración está cerca al máximo. Es también importante notar que la concentración del virus en partes diferentes de la planta puede variar muchísimo.

Las hojas cosechadas pueden ser almacenadas congelándolas a -20°C. Sin embargo, muchos virus son inactivados por la congelación. Si el virus no se inactiva, la congelación tiene la ventaja que desnaturaliza ciertas proteínas de la planta facilitando la purificación.

MEDIO DE EXTRACCION

Durante la extracción es muy importante que el medio de extracción entre en contacto inmediatamente con las células destruidas. Algunas de las soluciones amortiguadoras comúnmente utilizadas son las de citrato, fosfato, borato y Tris-HCl.

Para la extracción de la savia de la planta se necesitan los siguientes materiales:

- mortero y pilón (usado para extracciones a pequeña escala)
- diferentes tipos de licuadoras y extractores de jugo
- moledores

Los virus que son estables (tal como el virus del mosaico del tabaco) no necesitan de un medio de extracción complejo para la purificación. Sin embargo, muchos virus tienen requerimientos específicos de pH y de concentración de sales. También pueden necesitar otras sustancias especificas para estabilizarlos.

1. pH

La concentración de iones de hidrógeno (pH) es un factor muy importante que gobierna la solubilidad de proteínas. Las cargas en las proteínas del virus varían con el pH de la solución. La cubierta proteica del virus tiene una carga neta de cero en su punto iso-eléctrico, en el cual precipita.

La mayoría de los virus alcanzan su punto iso-eléctrico en medio ácido. Además, para que los virus permanezcan en la solución, el medio de extracción debe ser alcalino. Sin embargo, el pH no debe ser muy alto. En un pH alto, las uniones entre la proteina viral y ácido nucléico se debilitan, causando un hinchamiento de las partículas virales y haciéndolas más susceptibles a endonucleasas presentes en la savia de la planta.

2. Concentración de sales

La estabilidad de los virus también varía con las diferentes concentraciones de sales del medio de extracción. Por ejemplo, el virus del mosaico rayado de la cebada es más estable en solución amortiguadora Tris 0,1-0,2M, pH 7,0 que a concentraciones de sales más bajas o altas.

3. Efecto estabilizante de la savia

En ciertos virus el extracto crudo puede también tener un efecto estabilizante. Estos virus llegan a ser menos estables en las purificaciones puesto que las sustancias es-

tabilizantes son removidas. Además, en estos casos, el medio de extracción usado tiene que ser modificado agregando sustancias estabilizantes en varias etapas del protocolo de purificación para garantizar la estabilidad de las partículas del virus.

Si el virus es inestable, es aconsejable realizar la purificación en frío.

4. Iones metálicos y molaridad

Algunos virus requieren la presencia de iones divalentes como Ca^{++} ó Mg^{++} para conservar su infectividad o preservar la integridad de su estructura. Los requerimientos de molaridad varían de acuerdo al virus, siendo algunos estables en molaridades altas y otros en molaridades bajas. El rango de molaridad puede variar desde 0,001M hasta 0,5M. En algunos casos se agrega EDTA para minimizar la agregación causada por metales divalentes. El EDTA es un agente quelante.

5. Componentes vegetales que inactivan al virus

Generalmente, los materiales dañinos liberados durante el homogenizado o extracción pueden ser reducidos por el uso de grandes volúmenes de solución amortiguadora. También se pueden añadir productos químicos para contrarrestar ciertos tipos de componentes de la planta que causan agregación e inactivación.

La oxidación de los compuestos fenólicos puede inactivar a los virus. Esto se puede prevenir agregando agentes reductores tales como el bisulfito de sodio, hidrocloruro de cisteína, ácido tioglicólico, ácido ascórbico y mercaptoetanol. Las polifenol oxidasas, enzimas que contienen cobre, son a menudo responsables de la inactivacion de virus en extractos de plantas. La presencia de compuestos fenólicos en el extracto de la planta dificulta la purificación de los virus, ya sea precipitándolos o inactivándolos a través de sus componentes oxidados. Su acción puede ser inhibida agregando agentes quelantes del cobre tal como el DIECA-sal sódica (Dietil-ditiocarbamato de sodio) 0,01M.

Los compuestos fenólicos se pueden oxidar directamente o por acción de enzimas produciendo quinonas, las cuales son más activas que los fenoles. La formación de las quinonas se puede impedir de las siguientes formas:

- Compitiendo por el oxígeno en el extracto (2-mercaptoetanol, ácido ascórbico, ácido tioglicólico, hidrocloruro de cisteína).
- Inactivando la enzima polifenoloxidasa, que contiene cobre, con agentes quelantes del cobre (DIECA-sal sódica).

Las taninos presentes en los extractos de plantas precipitan los virus. Esto se puede evitar usando un pH alcalino, grandes volúmenes de solución amortiguadora, añadiendo alcaloides (cafeína, sulfato de nicotina), algunas proteínas (albúmina de huevo, leche en polvo) y polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona). Tanto los alcaloides como las proteínas y polímeros sintéticos compiten con los virus en la formación de agregados con los taninos.

6. Aditivos que eliminan proteínas y ribosomas de las plantas

Los ribosomas tienen un coeficiente de sedimentación muy similar al de los virus. Por esta razón se pueden eliminar haciendo uso de diversos aditivos. La selección del método depende de la estabilidad de los virus en la presencia de los aditivos usados.

El EDTA-Na 0,01M en solución amortiguadora de pH 7,4 destruye los ribosomas previniendo su co-sedimentación con el virus. Este método sólo puede ser usado para virus que no necesitan iones metálicos divalentes para su estabilidad.

En algunos casos se puede utilizar bentonita para eliminar ribosomas 18S, proteínas y restos verdes de cloroplastos.

7. Detergentes

El Tritón X-100 puede ser utilizado para asistir en la liberación del virus de los componentes celulares insolubles como membranas.

8. Enzimas

En aquellos casos en los que el virus se encuentra restringido al floema, se puede utilizar ciertas enzimas, como pectinasas y celulasas, para permitir la liberación del virus de los tejidos.

DESNATURALIZACION SELECTIVA DE COMPONENTES DEL HOSPEDERO

Existen diversos métodos para eliminar o desnaturalizar selectivamente los materiales vegetales en el extracto de virus. Los más comunes son los que se describen a continuación.

1. Congelación

Los tejidos intactos de las hojas o su extracto pueden ser congelados. Es más ventajoso congelar el extracto en vez del tejido para eliminar algunas proteínas de la planta.

La congelación y descongelación repetida es más eficiente que la congelación de los extractos por un período largo.

2. Calentamiento

Si el virus tiene un punto de inactivación termal alta, el calentamiento de los extractos a 40°C durante una hora ó a 50-60°C durante 10 minutos desnaturalizará las proteínas de la planta. Estas proteínas desnaturalizadas precipitan y pueden ser fácilmente separadas.

3. Solventes Orgánicos

Los solventes orgánicos que son parcialmente solubles en agua, tales como el cloroformo, butanol y tetracloruro de carbono, pueden ser usados para desnaturalizar proteínas de la planta. Estos compuestos orgánicos también desnaturalizan lipoproteínas. Por tal razón no deben ser usados para la purificación de virus cubiertos (Grupo 4).

4. Precipitación Selectiva usando Sales y Alcoholes

Los virus y las proteínas de las plantas pueden ser precipitadas con el uso de sales y alcoholes. Sin embargo, esta propiedad puede ser utilizada selectivamente para precipitar las proteínas de la planta dejando los virus en la solución. La mayoría de las proteínas del hospedero no se disuelven una vez que son precipitadas, probablemente porque son desnaturalizados durante el procedimiento. La concentración de las sales necesarias para precipitar proteínas depende del pH del medio.

Mientras más cercano se encuentre el pH al punto isoeléctrico, los virus y las proteínas del hospedero son más insolubles. Algunas proteínas de la planta pueden ser precipitadas bajando el pH a 5,0. Las proteínas de la planta hospedera pueden ser precipitadas selectivamente añadiendo sulfato de amonio saturado al 40%.

CLARIFICACION DEL EXTRACTO

El extracto inicial normalmente contiene fragmentos grandes de tejidos, células, cloroplastos, núcleos, mitocondrias, fragmentos de membranas, virus, proteínas y sales solubles.

El primer paso es la eliminación de las partículas que son más grandes que el virus, tales como cloroplastos, mitocondrias, etc. Esto se logra filtrando el extracto.

La filtración es un proceso muy simple, pero se debe tener cuidado en la elección del material. Una muestra filtrada puede ser procesada para eliminar tejidos grandes y células no fraccionadas, pasando los extractos

a través de algunas capas de papel de filtro o varias capas de gasa, malla fina de nylon o lana de vidrio. La filtración también puede ser hecha a través de carbón, tierra de diatomeas, bentonita, polvo de celulosa o Celite. Sin embargo, estos materiales no son comúnmente usados en la purificación de virus de papa y camote.

El uso de la lana de vidrio y gasa como un medio de filtración es solamente eficiente para filtrar membranas y pedazos grandes de tejidos. Sin embargo, el filtrado aún contiene cloroplastos, núcleos, mitocondria y otros componentes junto con los virus. Por lo tanto, una clarificación posterior por centrifugación a baja velocidad tiene que ser realizada para removerlos. Una fuerza de centrifugación de 10,000 g durante 10 minutos es generalmente suficiente. Este tratamiento produce un sedimento considerable que contiene la mayoría de los "debris" grandes de la planta, dejando en la solución virus, ciertos ribosomas, partículas más pequeñas que los virus, proteínas y sales disueltas

El extracto clarificado así obtenido, puede ser además procesado para obtener partículas de virus usando muchos métodos diferentes. Algunos de los métodos que pueden ser empleados son:

- Filtración por gel (agar, agarosa, sephadex)
- Cristalización
- Precipitación iso-eléctrica
- Electroforesis
- Cromotografía de intercambio iónico
- Sistemas de dos fases
- Ultra-centrifugación
- Centrifugación a través de gradiente de densidad
- Métodos serológicos
- Geles secos
- Microfiltros

El procedimiento deberá ser adoptado dependiendo de la estabilidad del virus y de los contaminantes presentes en el extracto clarificado.

Para los virus de papa, se utiliza comúnmente la cristalización, la precipitación iso-eléctrica, la ultracentrifugación y la centrifugación en gradientes de densidad. Sin embargo, esto no significa que los otros métodos no sean apropiados para la purificación de virus de papa. Mediante experimentos, las otras técnicas pueden ser adoptadas para la purificación de estos virus.

1. Filtración por gel (agar, agarosa, Sephadex)

Este proceso también se conoce como cromatografía de tamizado molecular y es especialmente útil para virus que se desnaturalizan durante la centrifugación a altas velocidades.

La sustancia que se va a utilizar como filtro molecular se empaca en una columna. Las moléculas más pequeñas entran al gel, mientras que las partículas o moléculas más grandes son excluidas o pasan rápidamente a través del gel. La separación depende de la porosidad del gel y del tamaño de las partículas de virus y componentes celulares de la planta ("debris"). El virus se obtiene diluido en un volumen que es el doble del volumen original, por lo que debe ser concentrado.

2. Cristalización

Por manipulación propia de la concentración de sales, particularmente añadiendo grandes cantidades de sulfato de amonio (25%), muchos virus y proteínas de plantas pueden ser precipitados o cristalizados. El precipitado así formado puede ser concentrado por filtración o por centrifugación a baja velocidad. Luego, el precipitado puede ser disuelto en un pequeño volumen de solución amortiguadora para obtener una suspensión de partículas de virus. Esta solución, sin embargo, también contendrá

un cierto porcentaje de proteínas del hospedero disueltas como contaminantes.

Durante la cristalización, la mayoría de las proteínas del hospedero cristalizadas o precipitadas son desnaturalizadas y no pueden disolverse cuando son resuspendidas en la solución amortiguadora.

Generalmente, este proceso no se utiliza en los métodos de purificación modernos debido a la sensibilidad de ciertos virus a las altas concentraciones de sales.

3. Precipitación iso-eléctrica

Se le conoce también como precipitación por acidificación o por cambio de pH. Los virus son moléculas anfotéricas (que contienen cargas positivas y negativas al mismo tiempo). Existe un valor de pH, llamado punto isoeléctrico, en el cual la carga neta de estas moléculas se vuelve cero y se produce su precipitación en la solución.

Este procedimiento para concentrar virus mediante la disminución del pH hasta el punto isoeléctrico es muy útil para virus que precipitan a un pH inferior a 4,5, ya que la mayoría del material vegetal precipita a un pH de 4,8 ó 5 y se puede, de este modo, removerlo de la preparación antes de precipitar al virus mismo.

4. Electroforesis

Este método de separación se basa en la migración de partículas cargadas o moléculas a través de un campo eléctrico. La tasa de movimiento depende, entre otros factores, de la carga neta de la partícula o molécula, el potencial de gradiente formado por el campo eléctrico y la resistencia del medio al movimiento de la partícula o molécula.

La electroforesis en geles (medio semisólido) de agarosa o agarosa/acrilamida se puede utilizar para purificar preparaciones virales ya que los virus son partículas cargadas y migran a través de un campo eléctrico (excepto en el punto isoeléctrico). Sin embargo, esta técnica no es muy utilizada para purificaciones de virus vegetales debido, en parte, a los pequeños volúmenes que deben ser utilizados.

La electroforesis con gradientes de densidad (en medio líquido) de sucrosa en una columna es más utilizada que la anterior para purificaciones de virus. Se puede procesar un volumen mucho más grande de la preparación y la recuperación del virus es más fácil. Este método es muy valioso para purificar virus inestables o virus que poseen un coeficiente de sedimentación similar al de los componentes vegetales.

5. Cromotografía de intercambio iónico

Las resinas de intercambio iónico son polímeros sintéticos que se producen en forma de esferas con cierto número de grupos ionizables. Uno de estos grupos se fija al polímero y otro queda libre para ser reemplazado o intercambiado. En resinas de intercambio catiónico, el ion fijado está cargado negativamente (anión) y el ion positivo (catión) puede ser intercambiado. En resinas de intercambio aniónico ocurre lo contrario. De acuerdo a la carga, las moléculas en la preparación de virus son retenidas o pasan libremente. A pesar de que la cromatografía por intercambio iónico es capaz de separar moléculas que tiene cargas eléctricas muy parecidas, no se usa comúnmente para purificar virus debido a que no siempre separa completamente al virus y algunas veces, éste queda unido irreversiblemente a la resina. Normalmente se utiliza para remover impurezas de las suspensión de virus.

6. Sistemas de dos fases

También se les llama cromatografía de partición. La purificación de virus utilizando dos fases líquidas ha sido utilizada hasta cierto punto. Ejemplos de estos sistemas de dos fases son: polietilenglicol-dextran y polietilenglicol-

sulfato de dextran. El proceso depende de la concentración de sales y en algunos casos el virus puede ser concentrado, total o parcialmente, en la fase de menor volumen.

7. Ultra-centrifugación

La ultra-centrifugación en un rotor de ángulo fijo es el método más utilizado para concentrar virus. Las partículas virales sedimentan contra las paredes inclinadas del tubo y se deslizan a su parte inferior para formar un "pellet". Generalmente, este proceso toma 2 horas o menos. Es muy importante centrifugar la preparación el menor tiempo posible por que la sedimentación a alta velocidad es un proceso físico muy severo que puede dañar a las partículas de virus. Inmediatamente después de terminada la centrifugación, el sobrenadante debe ser eliminado y el sedimento resuspendido en un volumen pequeño de solución amortiguadora.

8. Centrifugación en gradientes de densidad

Esta es la técnica más utilizada para finalizar la purificación de virus. Las preparaciones concentradas de virus se colocan cuidadosamente sobre la parte superior de tubos que contienen gradiente pre-formadas y se centrifugan. Durante la centrifugación, los virus y los contaminantes vegetales se mueven a través de la gradiente con tasas de migración diferentes debido a las diferencias en sus coeficientes de sedimentación. Después de la centrifugación, la capa que contiene al virus puede ser observada a través de un rayo de luz difusa como una banda densa opalescente en el tubo y puede ser colectada manualmente con una jeringa hipodérmica o utilizando un fraccionador de gradientes de densidad.

9. Métodos serológicos

Existen dos métodos serológicos para concentrar virus purificado y eliminar contaminantes.

El primero es la cromatografía por afinidad. En ella, la preparación viral se pasa a través de una columna con anticuerpos adsorbidos a la matriz sólida. Las partículas virales son atrapadas por los anticuerpos y permanecen en la columna, mientras que los materiales vegetales son eluidos. Las partículas virales son subsecuentemente removidas de la columna mediante la disociación del complejo virus-anticuerpo. Esta técnica ha sido exitosamente empleada en la preparación de virus altamente puros para la producción de anticuerpos.

El segundo método es la utilización de antisueros para remover los antígenos del hospedero. El antisuero se prepara inyectando en un conejo (u otro animal de sangre caliente) proteínas purificadas de la planta hospedera. El antisuero es luego purificado y la fracción de gammaglobulinas se incuba con la preparación viral. El complejo anticuerpo-proteína de hospedero es removido mediante una centrifugación a baja velocidad y la preparación viral se separa de las proteínas solubles del suero mediante centrifugación con gradientes de densidad.

10. Geles secos o adsorbentes

El fosfato de calcio es uno de los adsorbentes más comúnmente utilizados para la purificación de virus de plantas. El precipitado fresco de fosfato de calcio se obtiene mezclando $CaCl_2$ 1M y Na_2HPO_4 0,2M. Este debe ser lavado varias veces para remover las sales residuales y luego se mezcla con la preparación viral. La mezcla adsorbente-proteína es separada luego por centrifugación o filtración. El virus también puede resultar adsorbido. En ese caso, se puede eluir bajo condiciones adecuadas.

11. Microfiltros

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la purificación de virus animales. Se pueden armar sistemas de filtros con tamaños de poro diferentes de tal forma que la prefiltración (para remover las partículas más grandes que pueden obstruir los filtros de poro

pequeño) y la concentración del virus ocurra simultáneamente. Este método es adecuado para moléculas globulares y para virus abastonados flexibles como el virus del mosaico del tabaco. No es recomendable para moléculas flexibles filiformes, ya que pueden romperse por la fuerza de torsión de la filtración y sus fragmentos pueden obstruir los filtros. Otra desventaja es que los virus pueden llegar a adherirse a los filtros de pre-filtrado. Una forma de evitar la pérdida de virus es utilizar filtros con un diámetro de poro por lo menos 10 veces más grande que el tamaño del virus que va a ser filtrado.

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

6.0 PURIFICACION

Fascículo 6.2 Protocolos de Purificación de Virus de Plantas

Las preparaciones de virus purificado son necesarias para el estudio de las propiedades físicas y bioquímicas del mismo, para la producción de antisueros específicos, para la preparación de sondas o "probes" de ácidos nucleicos complementarios a la secuencia viral y para la determinación de productos finales de traducción.

Generalmente, una purificación comprende los siguientes pasos:

Extracción

Clarificación
(baja velocidad)

Sedimentación
(baja velocidad)

Clarificación
(baja velocidad)

Sedimentación
(alta velocidad)

Clarificación
(baja velocidad)

Centrifugación en gradientes de densidad
(alta velocidad)

Fraccionamiento

Sedimentación

VIRUS PURIFICADO

Una vez que se ha obtenido el virus purificado, es necesario determinar su concentración. Para ello, se debe preparar una dilución del virus (normalmente 1/20) y leer su absorbancia a OD_{260}. Esta lectura debe ser corregida por la dilución utilizada y luego dividida por el coeficiente de extinción del virus. El coeficiente de extinción es una característica propia de cada virus y representa la absorbancia de una concentración de 0,1% (1 mg/ml) del mismo con un pasaje óptico de radiación de 1 cm utilizando una longitud de onda de 260 nm. El coeficiente de extinción se representa con el siguiente símbolo:

$$E^{0,1\%}_{1\ cm,\ 260\ nm}$$

Por ejemplo, si una preparación diluida 1/20 de APLV (componente bajo, "bottom") tiene un valor de OD_{260} de 0,37 y su coeficiente de extinción es de 9,6, la concentración de virus será: $0,37 \times 20 = 7,4$

$7,4 / 9,6 = 0,77$ mg/ml

Utilizando cálculos simples se puede conocer también los mg totales en la purificación y el rendimiento de virus por kg de tejido de la planta hospedera.

Es recomendable que en cada uno de los pasos finales de la purificación, se tomen pequeñas muestras de la preparación para que sean analizadas bajo el microscopio electrónico. De esta forma, se puede saber si se está obteniendo virus cada vez más concentrado y libre de contaminantes. A continuación se describen los protocolos de purificación de los virus de papa más comunes.

Virus M de la papa (PVM)

Planta hospedera:	*Datura metel* o *Lycopersicon pimpinellifolium*.
Cosecha:	18 a 20 días después de la inoculación.
Temperatura de trabajo:	4°C o sobre hielo.

Extracción
Homogeneizar el material vegetal con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato 0,1M pH 8,0 y 0,5% de 2-mercaptoetanol

Filtrar con gasa
Agregar 10% (v/v) de tetracloruro de carbono (CCl_4) y 8% (v/v) de 1-butanol
Emulsificar durante 1 minuto

Clarificar
7 840 g durante 10 minutos

Eliminar sedimento

Procesar sobrenadante

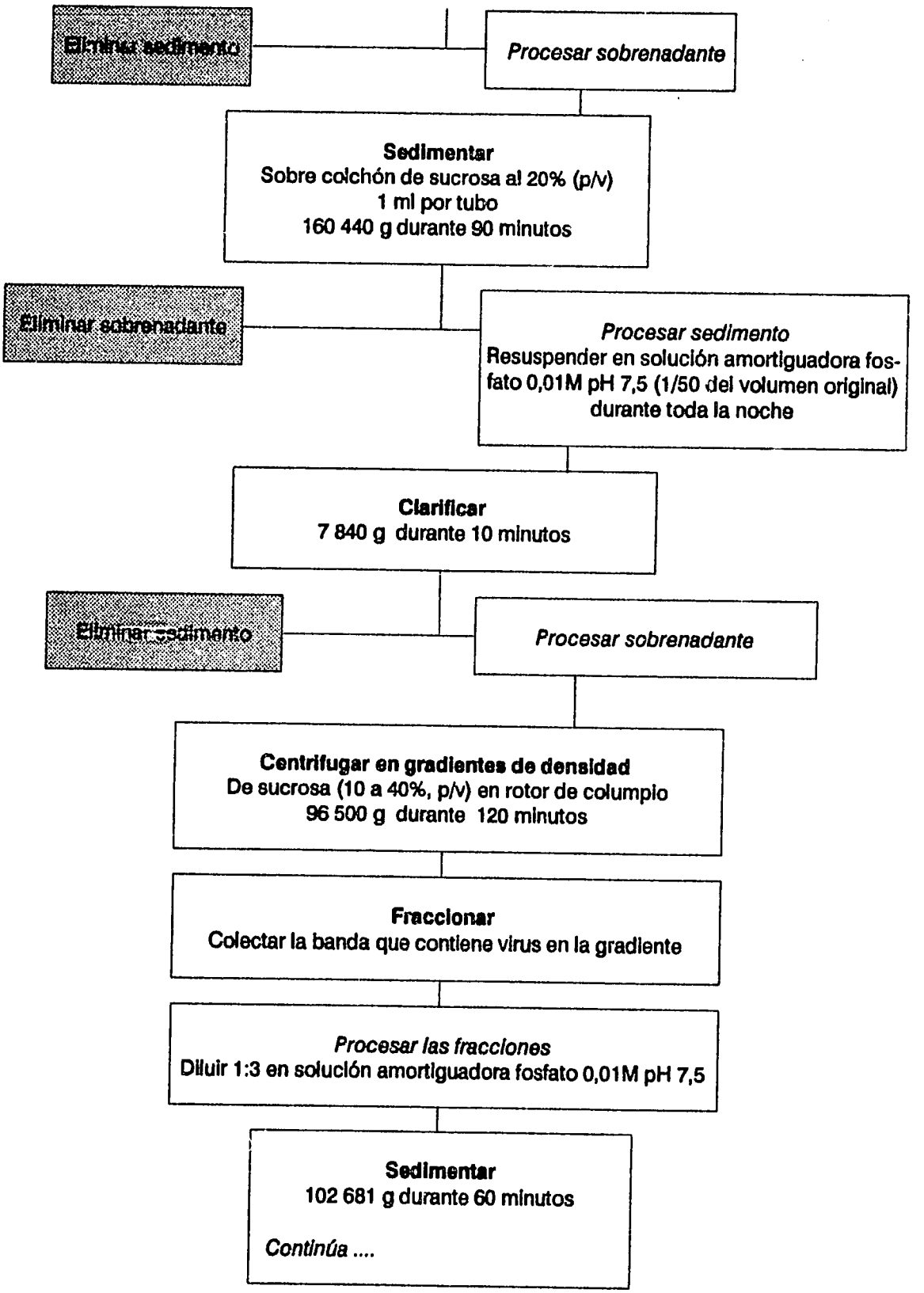
Sedimentar
72 527 g durante 90 minutos

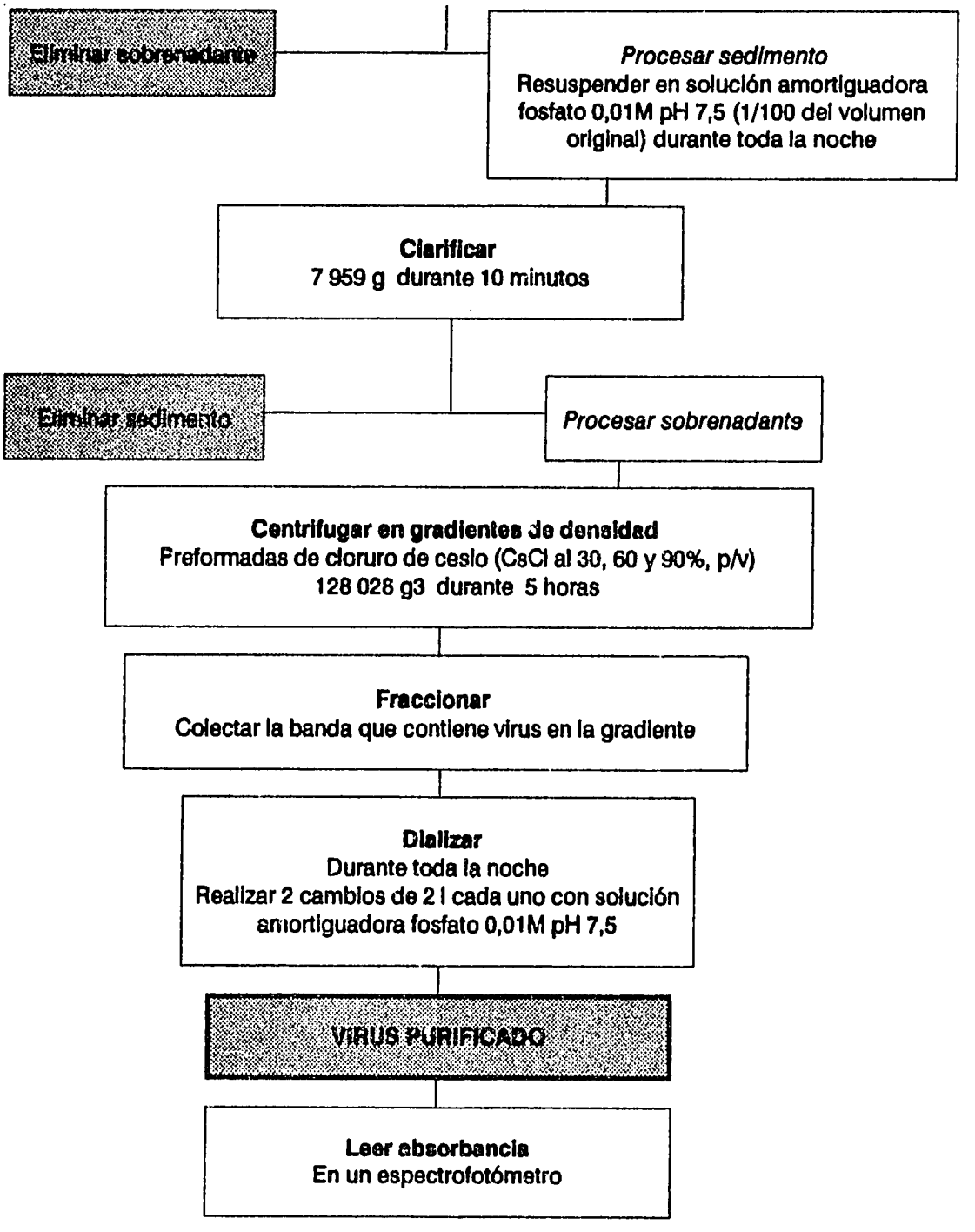
Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,5 (1/10 del volumen original) durante toda la noche

Clarificar
7 850 g durante 10 minutos

Continúa ....


Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Sedimentar
Sobre colchón de sucrosa al 20% (p/v)
1 ml por tubo
160 440 g durante 90 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,5 (1/50 del volumen original) durante toda la noche
Clarificar
7 840 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en rotor de columpio
96 500 g durante 120 minutos
Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Procesar las fracciones
Diluir 1:3 en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,5
Sedimentar
102 681 g durante 60 minutos
Continúa ....


Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,5 (1/100 del volumen original) durante toda la noche
Clarificar
7 959 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
Preformadas de cloruro de cesio (CsCl al 30, 60 y 90%, p/v)
128 028 g3 durante 5 horas
Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Dializar
Durante toda la noche
Realizar 2 cambios de 2 l cada uno con solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,5
VIRUS PURIFICADO
Leer absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus X de la papa (PVX)

Planta hospedera:	*Nicotiana glutinosa.*
Cosecha:	20 días después de la inoculación. Cosechar solamente el limbo de las hojas.

Extracción
Homogenizar el material vegetal (50 a 60 g) con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato 0,1M pH 8,0 con 0,2% de 2-mercaptoetanol y 10% de etanol

Filtrar el extracto a través de 3 capas de gasa

Clarificar
7 840 g durante 20 minutos a 4°C

Eliminar sedimento

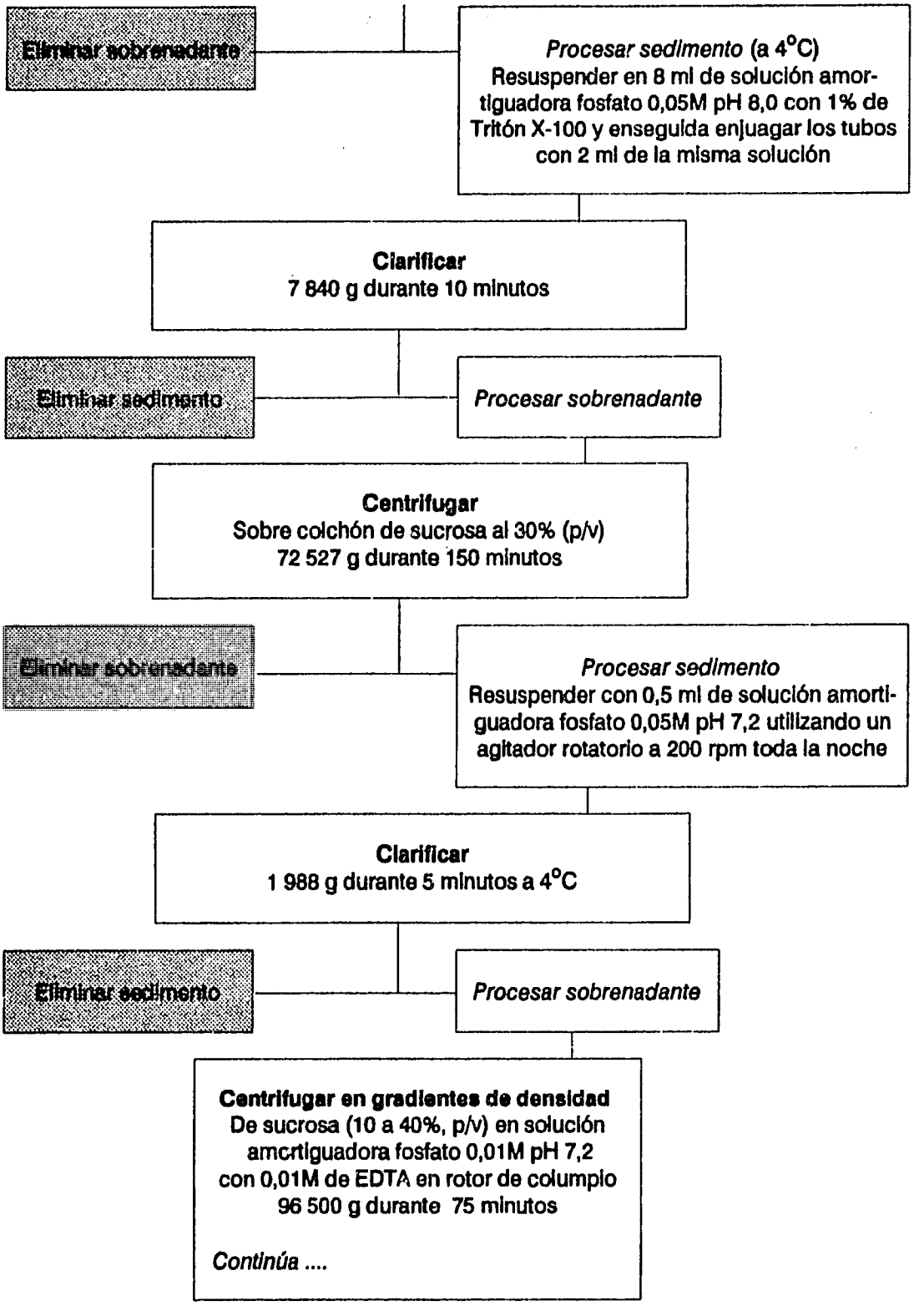
Procesar sobrenadante
Adicionar 1% de Tritón X-100
Agitar durante 1 hora a 4°C

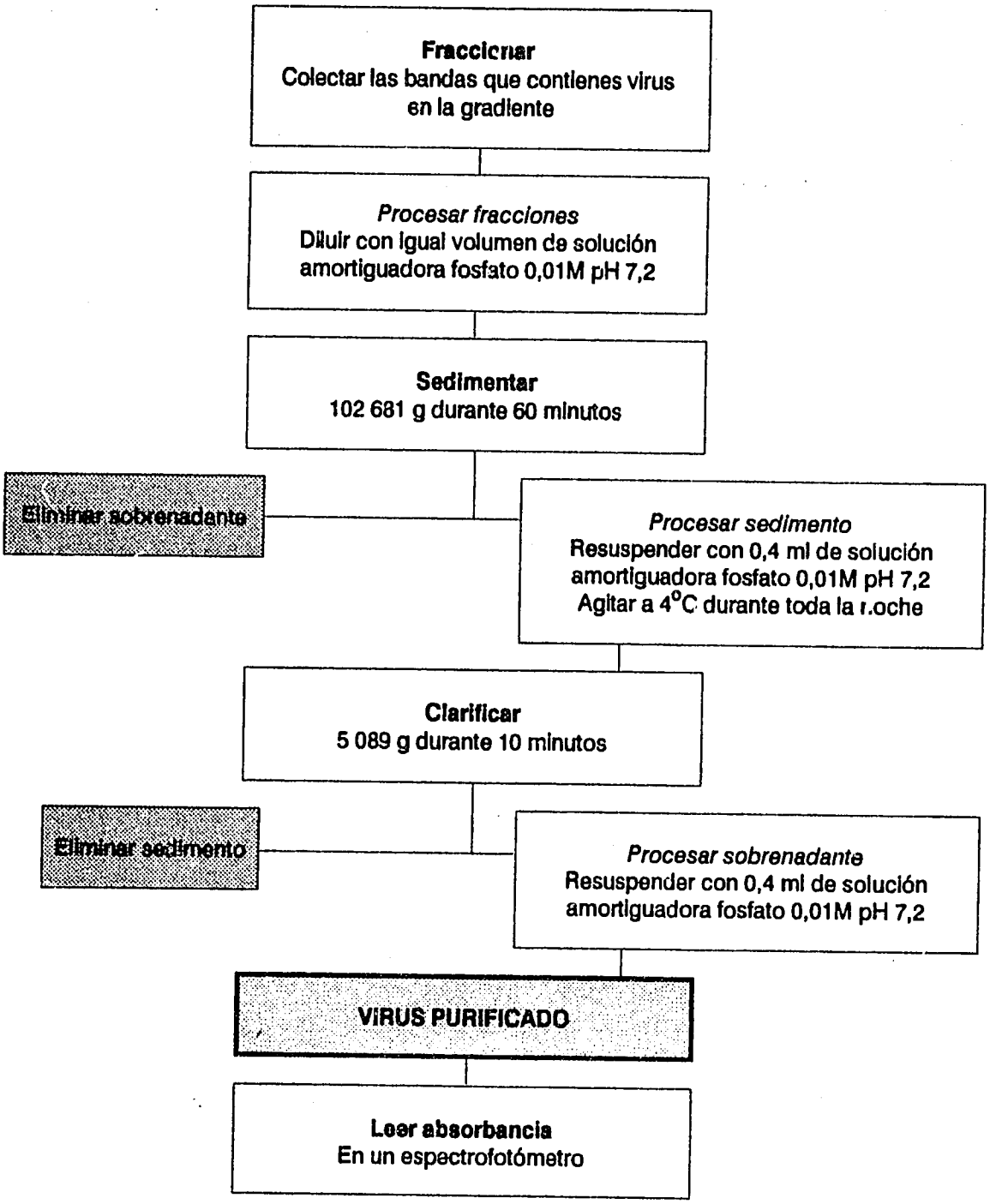
Clarificar
5 500 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

Procesar sobrenadante
Adicionar 0,2M de NaCl y 4% de PEG (PM 6 000 a 8 000)
Agitar 1 hora a 4°C
Incubar 1 hora a temperatura ambiente en reposo

Sedimentar
7 840 g durante 30 minutos
Continúa ....


Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento (a 4°C)
Resuspender en 8 ml de solución amortiguadora fosfato 0,05M pH 8,0 con 1% de Tritón X-100 y enseguida enjuagar los tubos con 2 ml de la misma solución
Clarificar
7 840 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar
Sobre colchón de sucrosa al 30% (p/v)
72 527 g durante 150 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender con 0,5 ml de solución amortiguadora fosfato 0,05M pH 7,2 utilizando un agitador rotatorio a 200 rpm toda la noche
Clarificar
1 988 g durante 5 minutos a 4°C
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,2 con 0,01M de EDTA en rotor de columpio
96 500 g durante 75 minutos
Continúa ....


Fraccionar
Colectar las bandas que contienes virus en la gradiente
Procesar fracciones
Diluir con igual volumen de solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,2
Sedimentar
102 681 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender con 0,4 ml de solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,2
Agitar a 4°C durante toda la noche
Clarificar
5 089 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Resuspender con 0,4 ml de solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,2
VIRUS PURIFICADO
Leer absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus A de la papa (PVA)

Planta hospedera:	*Nicotiana occidentalis.*
Cosecha:	18 a 20 días después de la inoculación. Cosechar solamente el limbo de las hojas.
Temperatura de trabajo:	4°C o sobre hielo.

Extracción
Homogenizar el material vegetal con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato 0,2M pH 8,0 con 0,5% de 2-mercaptoetanol, 1M de úrea y 0,01M de EDTA

Clarificar
7 840 g durante 30 minutos

Eliminar sedimento

Procesar sobrenadante
Adicionar 1% de Tritón X-100
Agitar a 4°C durante 3 horas

Clarificar
7 840 g durante 10 minutos

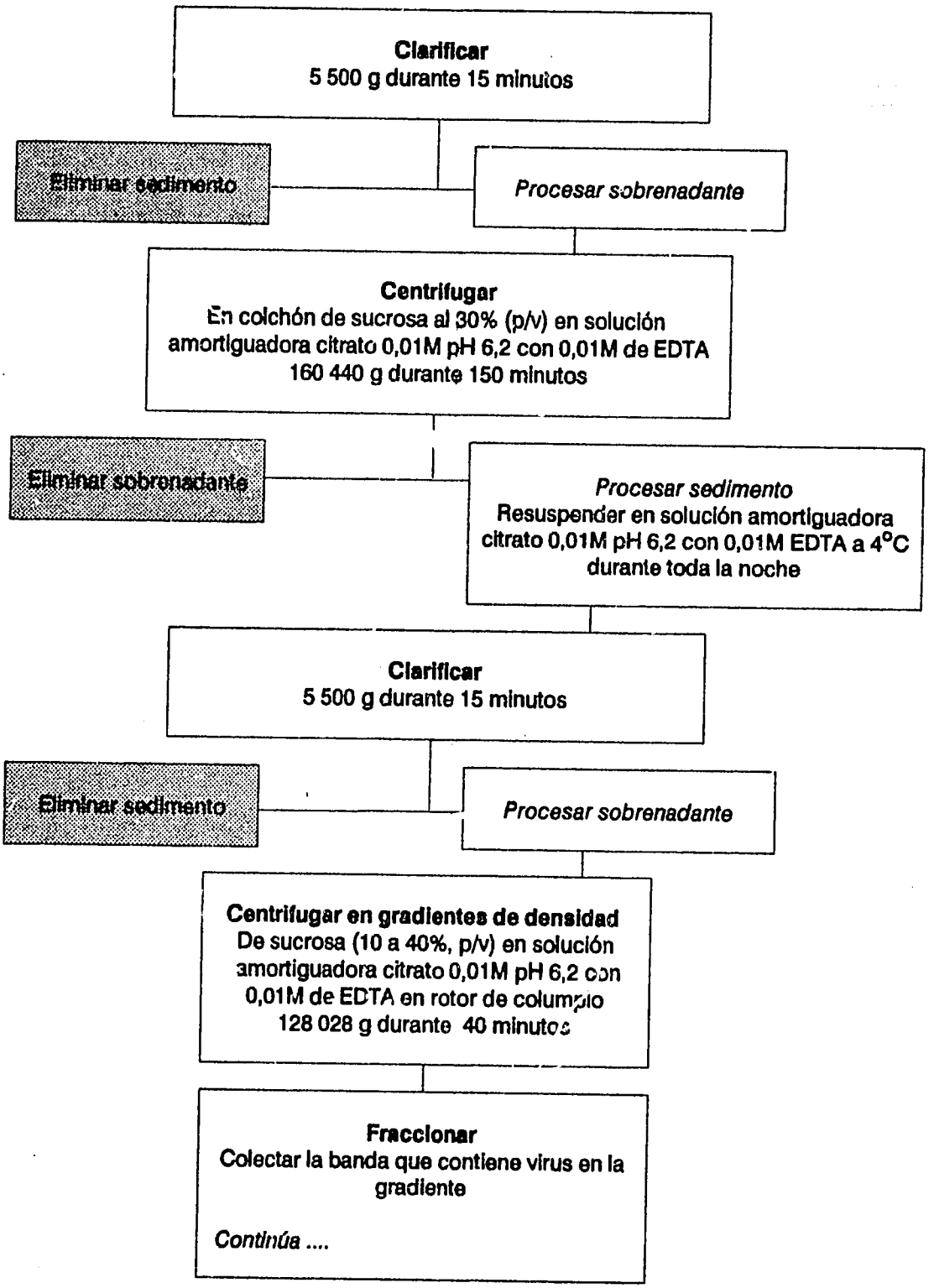
Eliminar sedimento

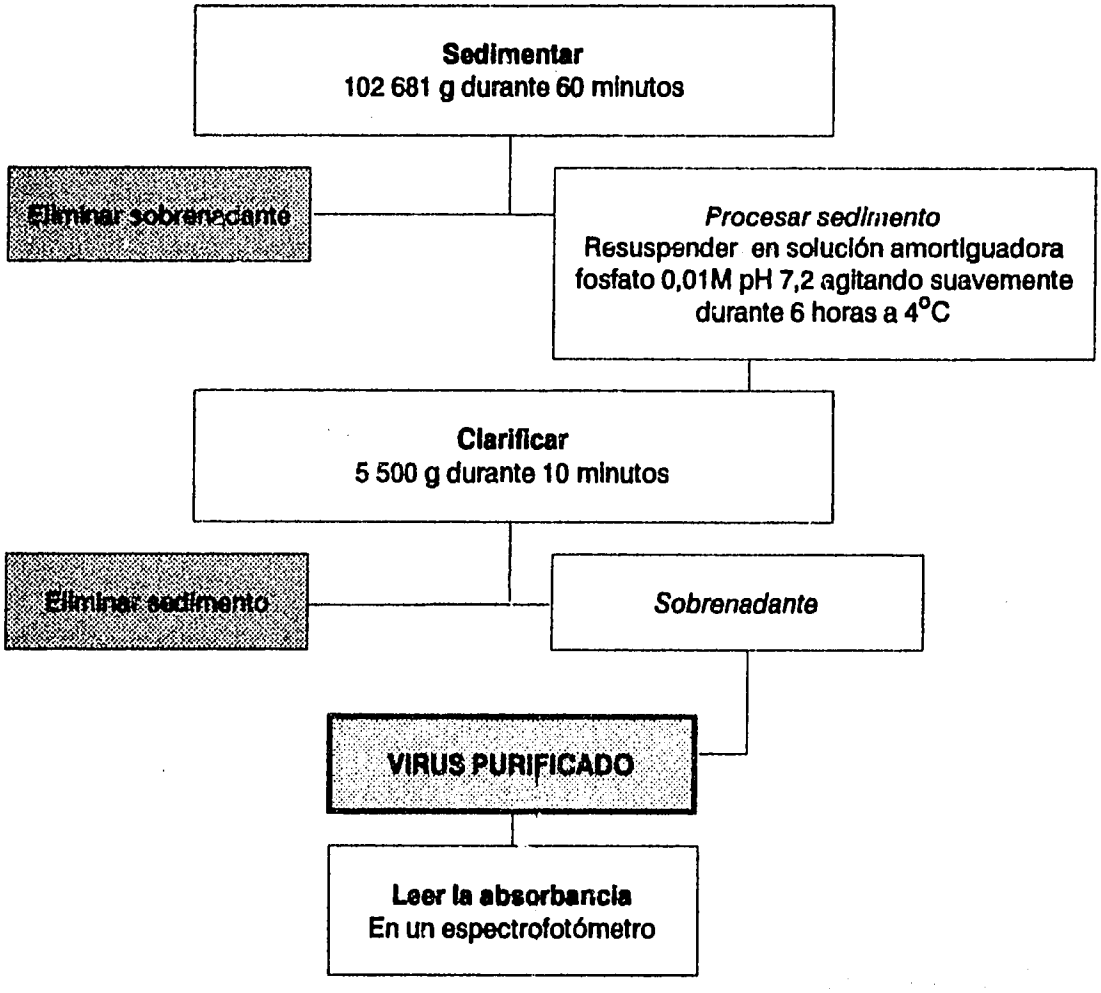
Procesar sobrenadante

Centrifugar
Sobre colchón de sucrosa al 30% (p/v) en solución amortiguadora citrato 0,05M pH 6,2 con 0,01M EDTA a 72 527 g durante 180 minutos

Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora citrato 0,05M pH 6,2 con 0,01M de EDTA y 1% de Tritón X-100; agitar a 4°C toda la noche
Continúa ....


Clarificar
5 500 g durante 15 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar
En colchón de sucrosa al 30% (p/v) en solución amortiguadora citrato 0,01M pH 6,2 con 0,01M de EDTA
160 440 g durante 150 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora citrato 0,01M pH 6,2 con 0,01M EDTA a 4°C durante toda la noche
Clarificar
5 500 g durante 15 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora citrato 0,01M pH 6,2 con 0,01M de EDTA en rotor de columpio
128 028 g durante 40 minutos
Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Continúa ....


Sedimentar
102 681 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 7,2 agitando suavemente durante 6 horas a 4°C
Clarificar
5 500 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Sobrenadante
VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus S de la papa (PVS)

Planta hospedera:	*Chenopodium quinoa.*
Cosecha:	18 a 20 días después de la inoculación. Cosechar solamente el limbo de las hojas.

Extracción
Homogeneizar el material vegetal con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfatp 0,1M pH 8,0 con 0,15% de 2-mercaptoetanol y 10% de etanol

Filtrar el extracto
A través de 3 capas de gasa

Clarificar
5 000 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

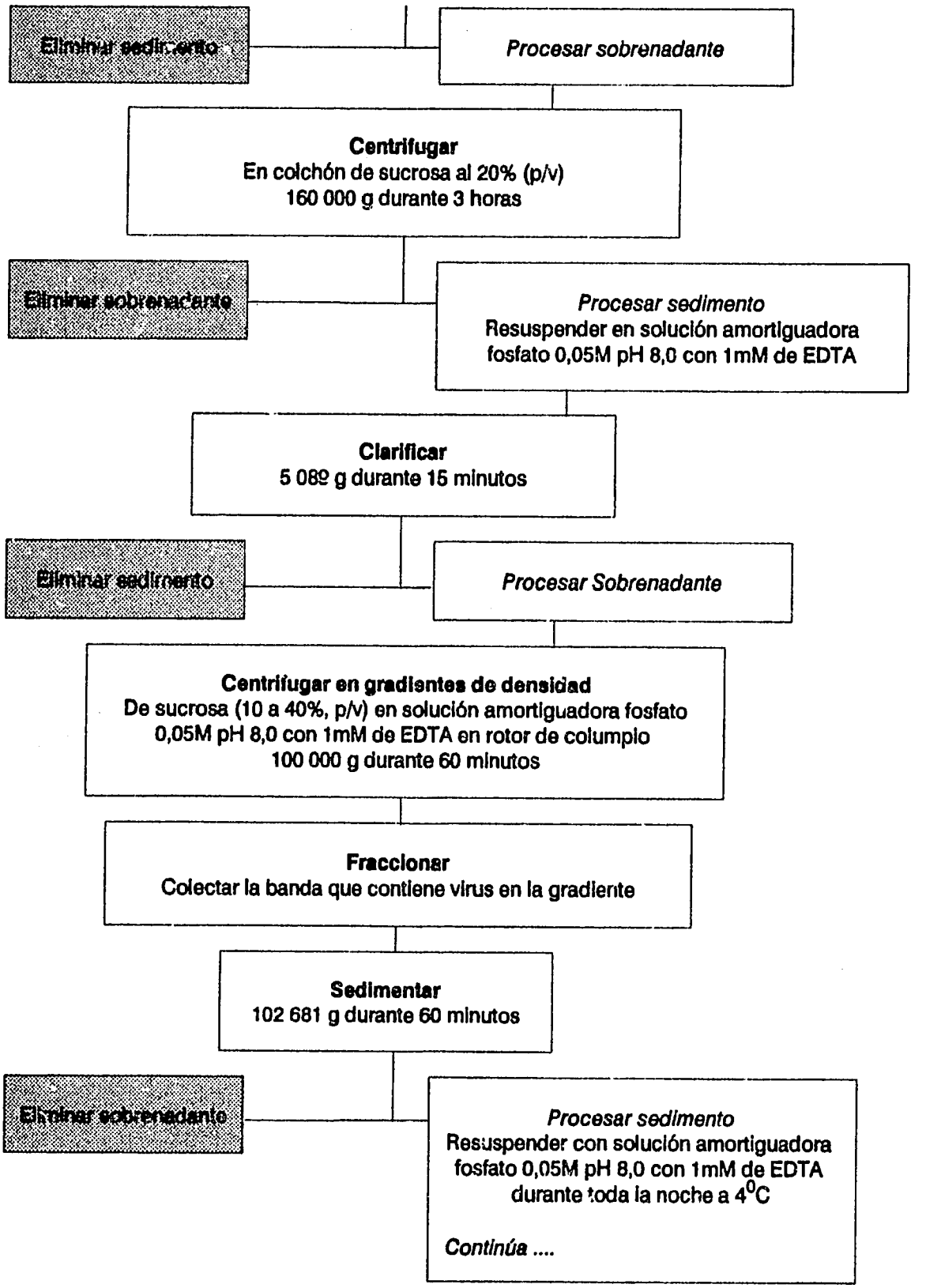
Procesar sobrenadante
Adicionar 4% de PEG (PM 8 000) y 1% de Tritón X-100
Agitar a 4°C durante 60 minutos

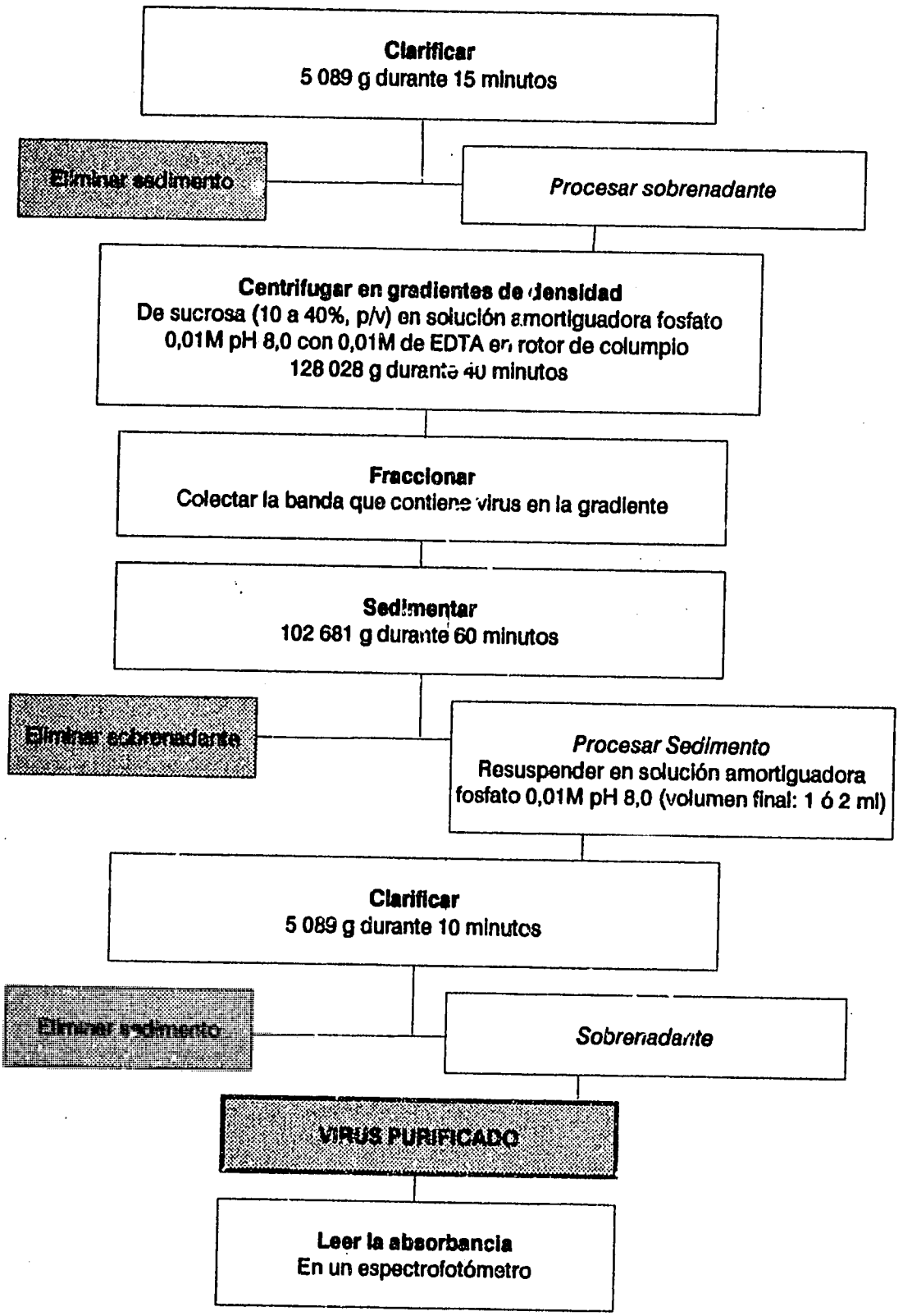
Sedimentar
5 000 g durante 10 minutos

Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender con solución amortiguadora fosfato 0,05M pH 8,0 (1/10 del volumen original) con 1mM de EDTA

Clarificar
10 000 g durante 20 minutos
Continúa ....


Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar
En colchón de sucrosa al 20% (p/v)
160 000 g durante 3 horas
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora
fosfato 0,05M pH 8,0 con 1mM de EDTA
Clarificar
5 089 g durante 15 minutos
Eliminar sedimento
Procesar Sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato
0,05M pH 8,0 con 1mM de EDTA en rotor de columpio
100 000 g durante 60 minutos
Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Sedimentar
102 681 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender con solución amortiguadora
fosfato 0,05M pH 8,0 con 1mM de EDTA
durante toda la noche a 4°C
Continúa ....


Clarificar
5 089 g durante 15 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 8,0 con 0,01M de EDTA en rotor de columpio 128 028 g durante 40 minutos
Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Sedimentar
102 681 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar Sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato 0,01M pH 8,0 (volumen final: 1 ó 2 ml)
Clarificar
5 089 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Sobrenadante
VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus Y de la papa (PVY^{o})

Planta hospedera:	*Nicotiana occidentalis.*
Cosecha:	15 a 20 días después de la inoculación. Cosechar solamente el limbo de las hojas.

Extracción
Homogeneizar el material vegetal con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato de sodio y potasio 0,2M pH 8,0 con 0,2% de 2-mercaptoetanol y 0,01M de EDTA

Filtrar el extracto
A través de 3 capas de gasa

Clarificar
7 840 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

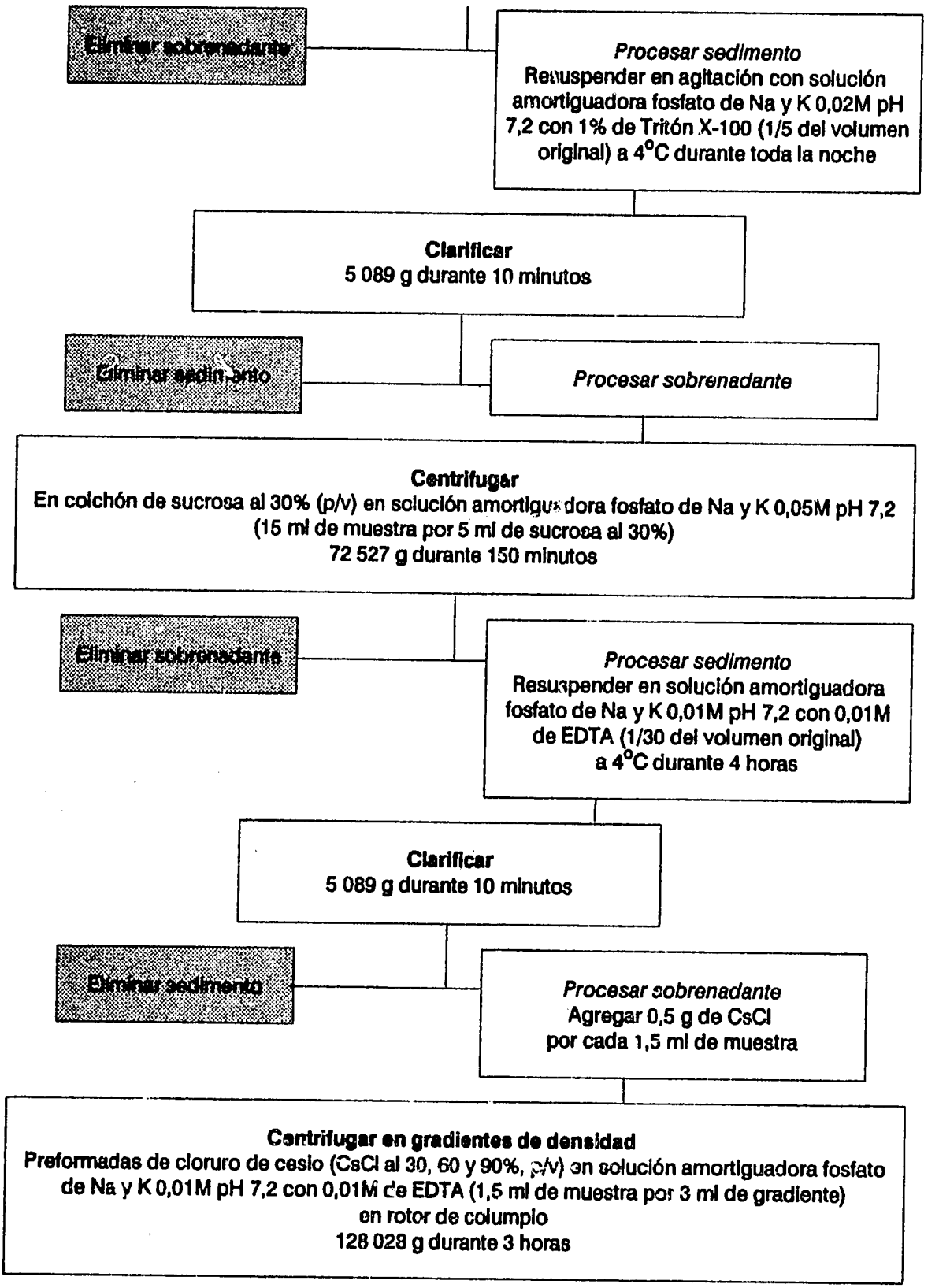
Procesar sobrenadante
Adicionar 1% de Tritón X-100
Agitar a 4°C durante 120 minutos

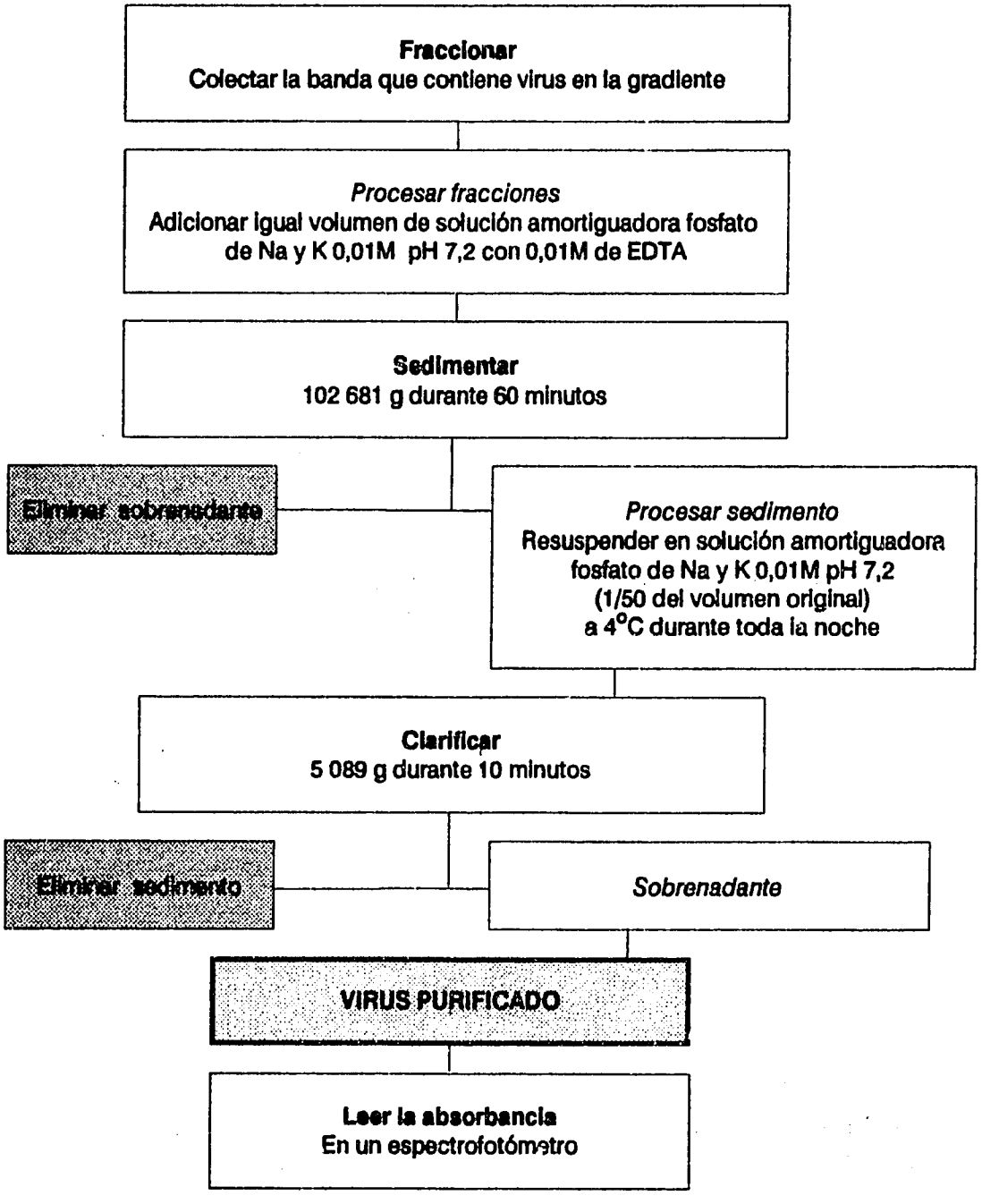
Clarificar
7 840 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

Procesar sobrenadante
Adicionar 4% de PEG (PM 6 000 a 8 000) y 0,2M de NaCl
Agitar a 4°C durante 60 minutos e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos

Sedimentar
7 840 g durante 20 minutos
Continúa ....


Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en agitación con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,02M pH 7,2 con 1% de Tritón X-100 (1/5 del volumen original) a 4°C durante toda la noche
Clarificar
5 089 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar
En colchón de sucrosa al 30% (p/v) en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 7,2
(15 ml de muestra por 5 ml de sucrosa al 30%)
72 527 g durante 150 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,01M pH 7,2 con 0,01M de EDTA (1/30 del volumen original) a 4°C durante 4 horas
Clarificar
5 089 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Agregar 0,5 g de CsCl por cada 1,5 ml de muestra
Centrifugar en gradientes de densidad
Preformadas de cloruro de cesio (CsCl al 30, 60 y 90%, p/v) en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,01M pH 7,2 con 0,01M de EDTA (1,5 ml de muestra por 3 ml de gradiente)
en rotor de columpio
128 028 g durante 3 horas


Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Procesar fracciones
Adicionar igual volumen de solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,01M pH 7,2 con 0,01M de EDTA
Sedimentar
102 681 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,01M pH 7,2 (1/50 del volumen original) a 4°C durante toda la noche
Clarificar
5 089 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Sobrenadante
VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus andino del moteado de la papa (APMV)

Planta hospedera:	Híbrido *Nicotiana clevelandii* X *Nicotiana bigelovii*
Cosecha:	18 a 20 días después de la inoculación.

Extracción
Homogeneizar el material vegetal con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato de sodio y potasio 0,2M pH 8,0 con 0,2% de 2-mercaptoetanol y 5mM de $MgCl_2$

Filtrar
A través de 3 capas de gasa
Emulsificar con cloroformo al 20% (v/v)

Clarificar
5 500 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

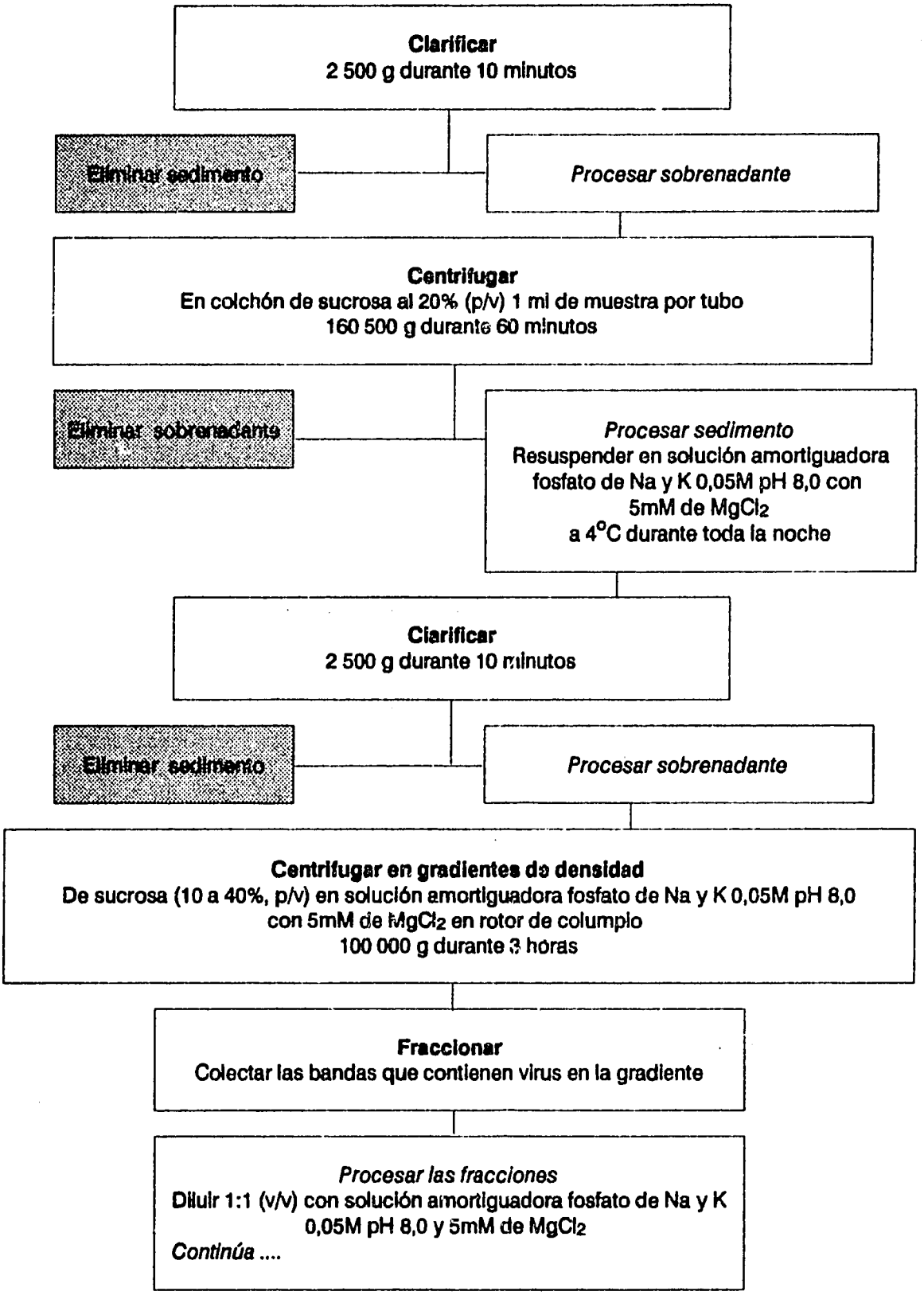
Procesar sobrenadante
Añadir 0,2M de NaCl y 6% (p/v) de PEG (PM 6 000 - 8 000), mezclar e incubar a 4°C durante 120 minutos

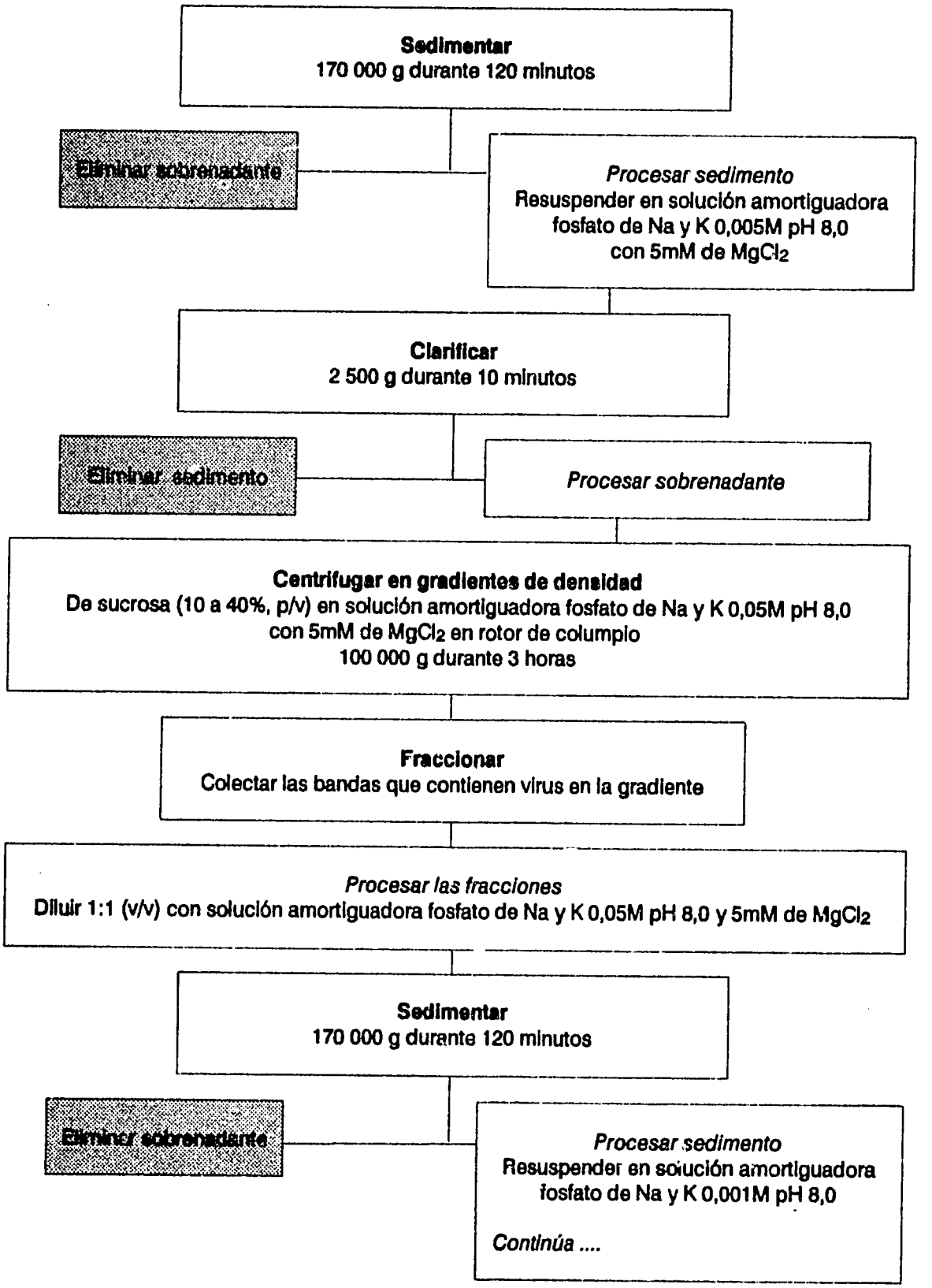
Sedimentar
5 500 g durante 30 minutos

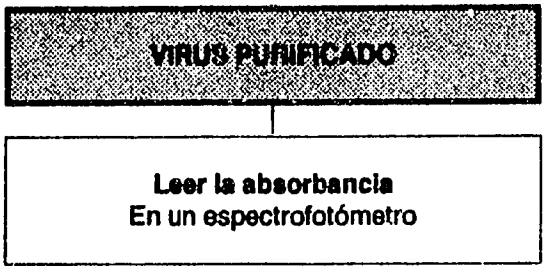
Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de $MgCl_2$ (40% del volumen original)
Agitando durante 120 minutos

Continúa ....


Clarificar
2 500 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar
En colchón de sucrosa al 20% (p/v) 1 ml de muestra por tubo
160 500 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de MgCl2
a 4°C durante toda la noche
Clarificar
2 500 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de MgCl2 en rotor de columpio
100 000 g durante 3 horas
Fraccionar
Colectar las bandas que contienen virus en la gradiente
Procesar las fracciones
Diluir 1:1 (v/v) con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 y 5mM de MgCl2
Continúa ....


Sedimentar
170 000 g durante 120 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,005M pH 8,0 con 5mM de MgCl2
Clarificar
2 500 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de MgCl2 en rotor de columpio
100 000 g durante 3 horas
Fraccionar
Colectar las bandas que contienen virus en la gradiente
Procesar las fracciones
Diluir 1:1 (v/v) con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 y 5mM de MgCl2
Sedimentar
170 000 g durante 120 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,001M pH 8,0
Continúa ....


VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus de la mancha anillada del tomate (TRSV)

Planta hospedera:	*Nicotiana hybrido.*
Cosecha:	28 días después de la inoculación.

Extracción
Homogeneizar el material vegetal con 1 volumen (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato 0,07M pH 7,0 con 0,01M de EDTA y 0,1% de ácido tioglicólico

Filtrar el extracto
A través de 3 capas de gasa
Emulsificar con 1 volumen de cloroformo

Procesar el extracto
Agitar bien y dejar en reposo 1 hora
Colectar la fase acuosa

Clarificar
8 000 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

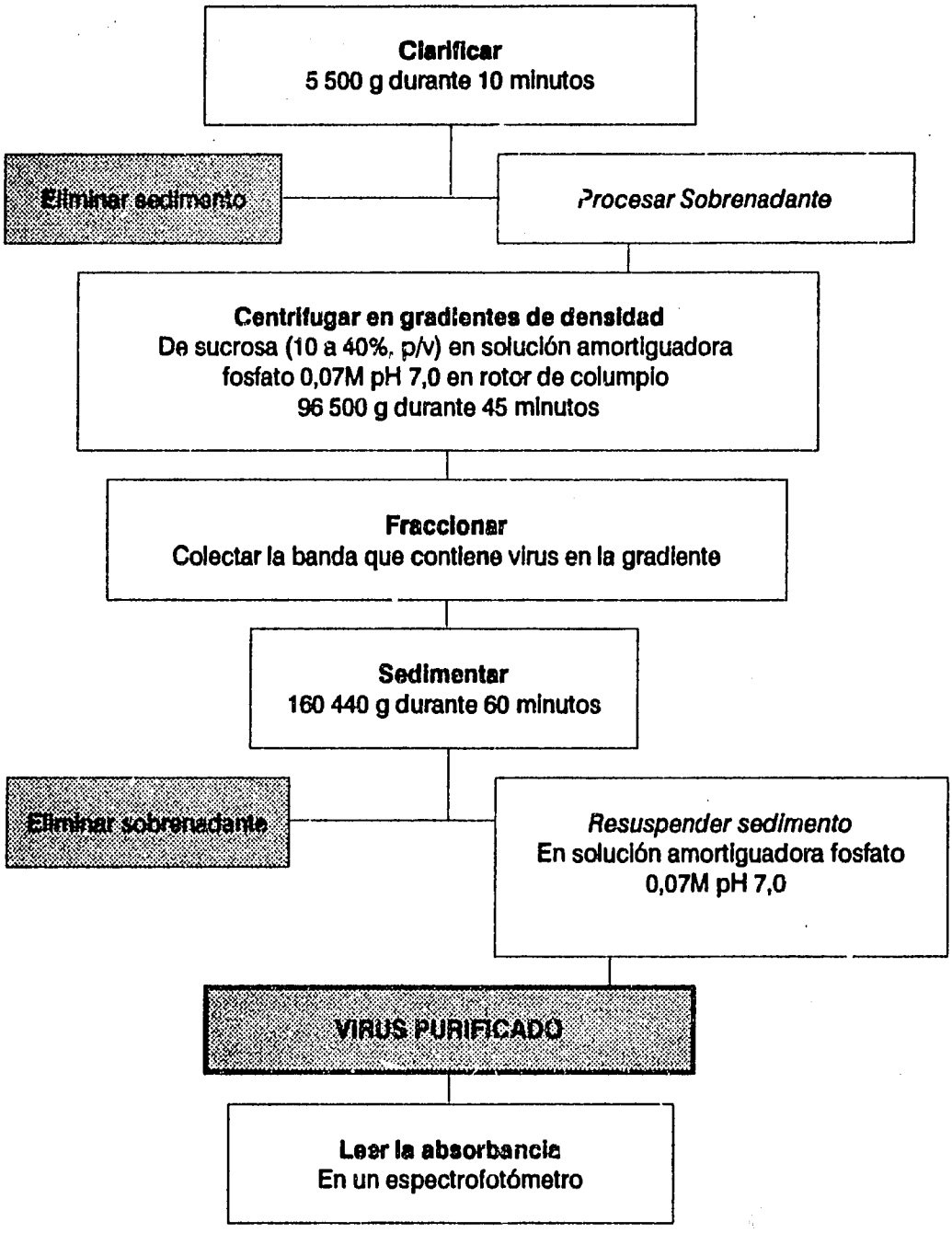
Procesar Sobrenadante
Precipitar con 6% de PEG (PM 8 000) y 0,3M de NaCl
Agitar durante 1 hora a 4°C

Sedimentar
9 600 g durante 20 minutos

Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender con 10% de solución amortiguadora fosfato 0,07M pH 7,0 con 0,01M de EDTA durante 3 horas

Continúa ....


Clarificar
5 500 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar Sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora
fosfato 0,07M pH 7,0 en rotor de columpio
96 500 g durante 45 minutos
Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Sedimentar
160 440 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Resuspender sedimento
En solución amortiguadora fosfato
0,07M pH 7,0
VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV)

Planta hospedera:	*Datura stramonium* o *Solanum tuberosum*.
Cosecha:	20 días después de la inoculación. Almacenar las hojas a -70°C un día antes de la purificación.

Extracción
Pulverizar el material vegetal congelado con nitrógeno líquido y agregar 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora citrato de sodio 0,1M pH 6,0 con 10 mM de EDTA, 1,5% de *celluclast* y 0,1% de ácido tioglicólico
Agitar a temperatura ambiente durante toda la noche

Homogenizar
La preparación en una licuadora

Filtrar el extracto
A través de tres capas de gasa
Emulsificar con igual volumen de cloroformo y de butanol

Clarificar
9 600 g durante 35 minutos

Eliminar sedimento

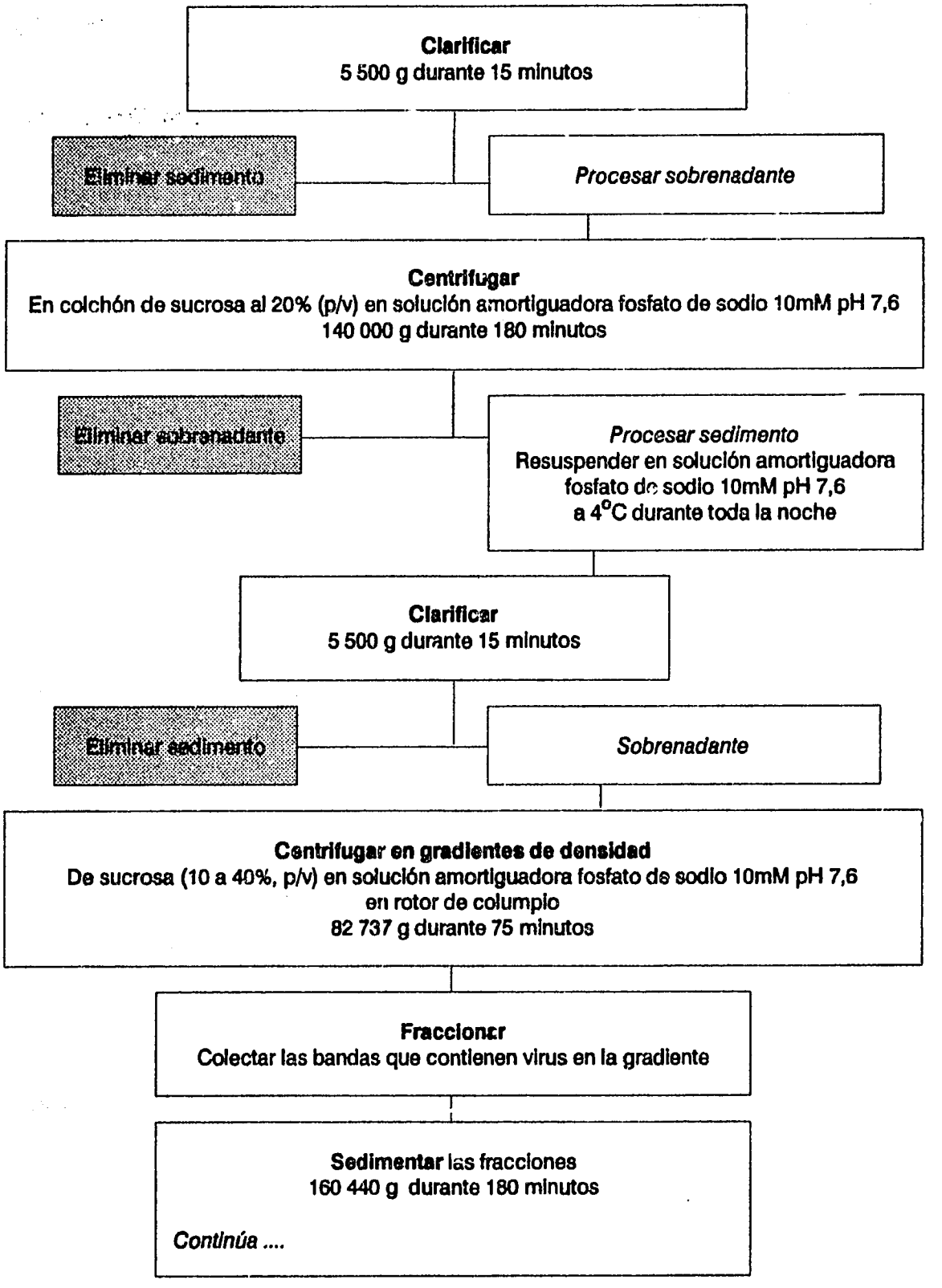
Procesar sobrenadante
Agregar 0,4M de NaCl y 8% de PEG (PM 6 000 a 8 000)
Agitar a 4°C durante 2 horas

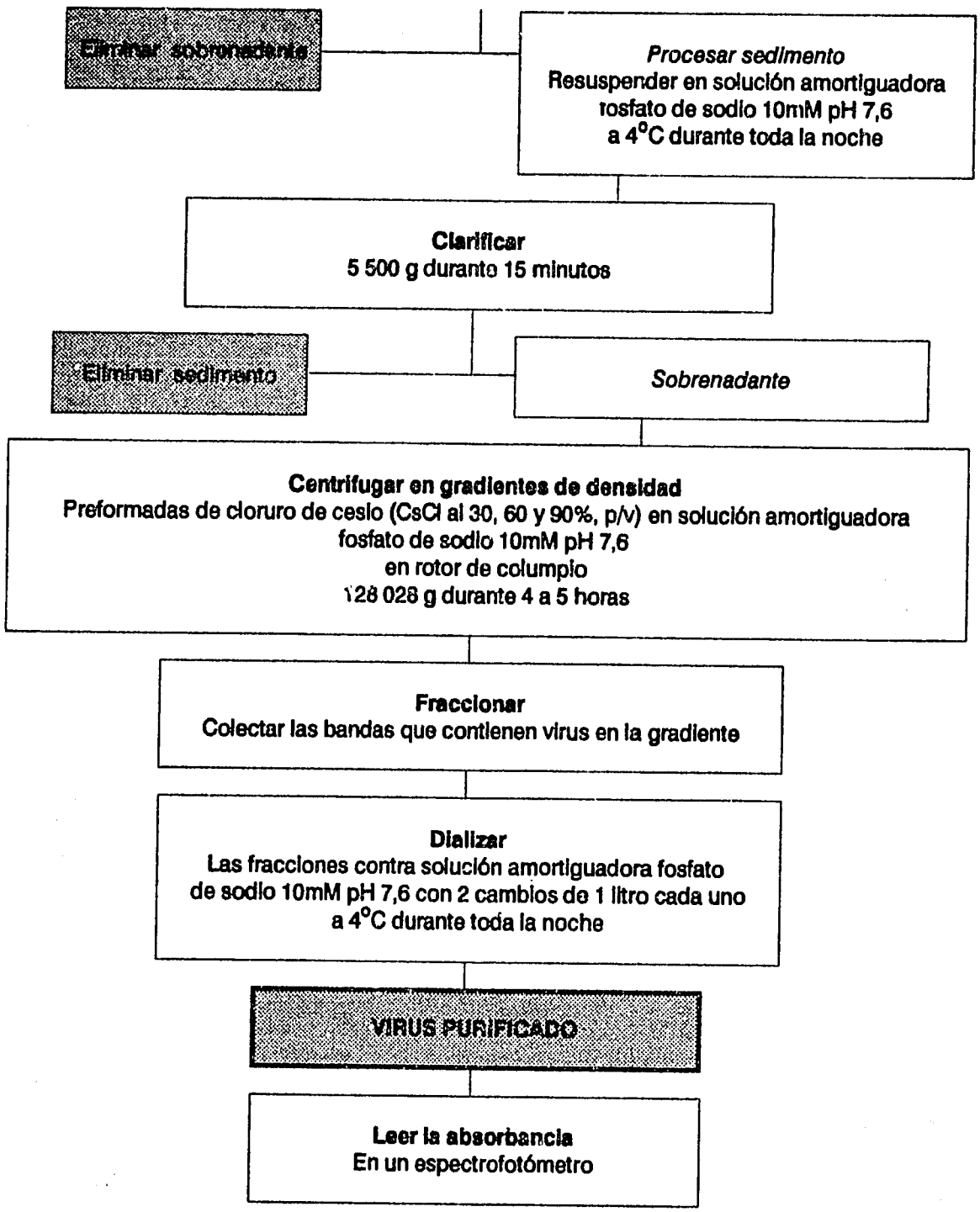
Sedimentar
9 600 g durante 40 minutos

Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de sodio 0,02M pH 7,6
Agitar a 4°C toda la noche

Continúa ....


Clarificar
5 500 g durante 15 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar
En colchón de sucrosa al 20% (p/v) en solución amortiguadora fosfato de sodio 10mM pH 7,6
140 000 g durante 180 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora
fosfato de sodio 10mM pH 7,6
a 4°C durante toda la noche
Clarificar
5 500 g durante 15 minutos
Eliminar sedimento
Sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato de sodio 10mM pH 7,6
en rotor de columpio
82 737 g durante 75 minutos
Fraccionar
Colectar las bandas que contienen virus en la gradiente
Sedimentar las fracciones
160 440 g durante 180 minutos
Continúa ....


Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora
fosfato de sodio 10mM pH 7,6
a 4°C durante toda la noche
Clarificar
5 500 g durante 15 minutos
Eliminar sedimento
Sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
Preformadas de cloruro de cesio (CsCl al 30, 60 y 90%, p/v) en solución amortiguadora
fosfato de sodio 10mM pH 7,6
en rotor de columpio
128 028 g durante 4 a 5 horas
Fraccionar
Colectar las bandas que contienen virus en la gradiente
Dializar
Las fracciones contra solución amortiguadora fosfato
de sodio 10mM pH 7,6 con 2 cambios de 1 litro cada uno
a 4°C durante toda la noche
VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus T de la papa (PVT)

Planta hospedera:	*Chenopodium quinoa.*
Cosecha:	15 a 20 días después de la inoculación.

Extracción
Homogeneizar el material vegetal con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato 0,06M pH 7,0

Filtrar el extracto
A través de 3 capas de gasa
Adicionar bentonita (1/20 del volumen original) y observar la formación de una granulación verde

Clarificar
10 000 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

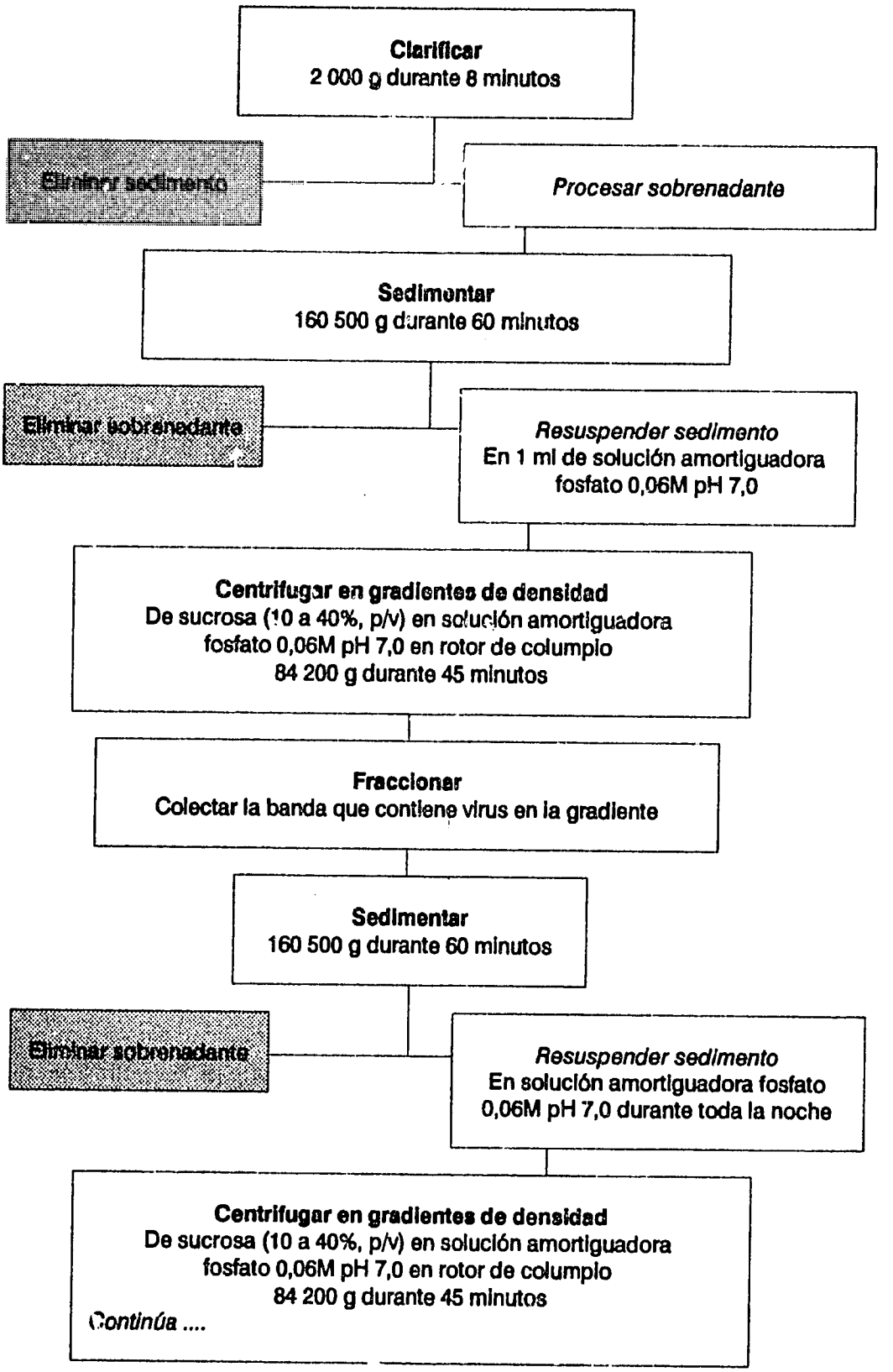
Procesar sobrenadante
Filtrar a través de fibra de vidrio
Adicionar PEG (PM 8 000, 1/20 del volumen original) y agitar durante 1 hora a 4°C
Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente

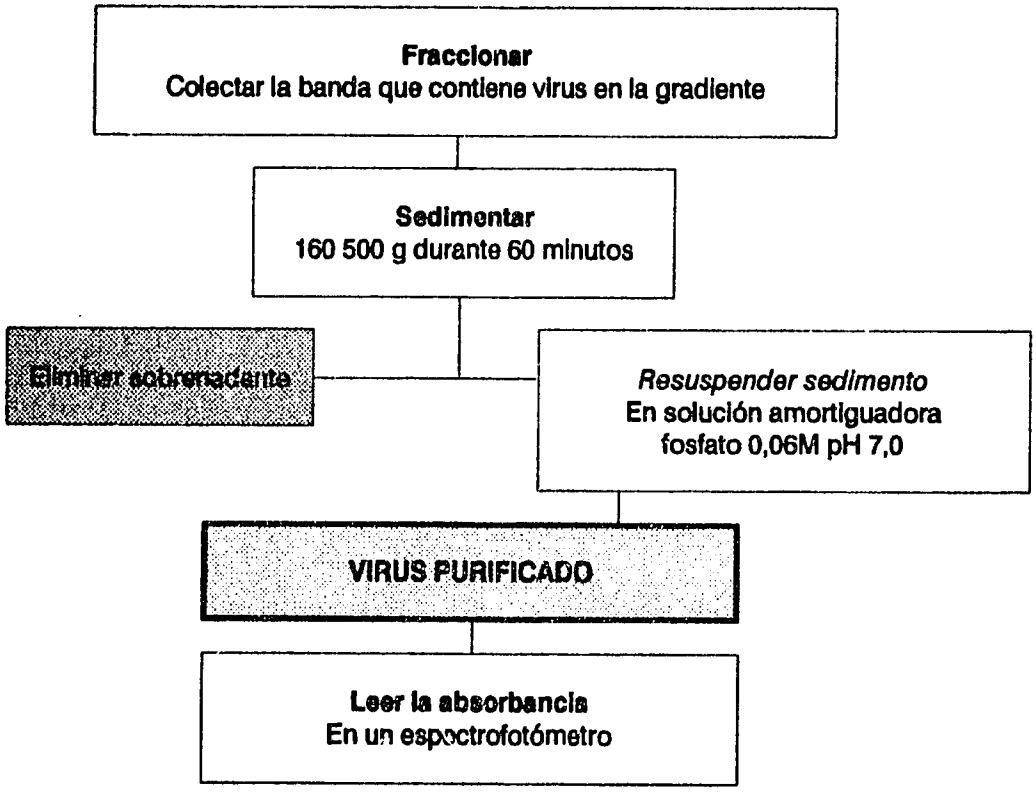
Sedimentar
10 000 g durante 20 minutos

Eliminar sobrenadante

Resuspender sedimento
En solución amortiguadora fosfato 0,06M pH 7,0 durante toda la noche

Continúa ....


Clarificar
2 000 g durante 8 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Sedimentar
160 500 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Resuspender sedimento
En 1 ml de solución amortiguadora
fosfato 0,06M pH 7,0
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora
fosfato 0,06M pH 7,0 en rotor de columpio
84 200 g durante 45 minutos
Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Sedimentar
160 500 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Resuspender sedimento
En solución amortiguadora fosfato
0,06M pH 7,0 durante toda la noche
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora
fosfato 0,06M pH 7,0 en rotor de columpio
84 200 g durante 45 minutos
Continúa ....


Fraccionar
Colectar la banda que contiene virus en la gradiente
Sedimentar
160 500 g durante 60 minutos
Eliminar sobrenadante
Resuspender sedimento
En solución amortiguadora
fosfato 0,06M pH 7,0
VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

Virus andino latente de la papa (APLV)

Planta hospedera:	Híbrido *Nicotiana clevelandii* X *Nicotiana bigelovii*
Cosecha:	18 a 20 días después de la inoculación.

Extracción
Homogeneizar el material vegetal con 2 volúmenes (por peso de hojas) de solución amortiguadora fosfato de sodio y potasio 0,2M pH 8,0 con 0,2% de 2-mercaptoetanol y 5mM de $MgCl_2$

Filtrar
A través de 3 capas de gasa
Emulsificar con cloroformo al 20% (v/v)

Clarificar
5 500 g durante 20 minutos

Eliminar sedimento

Procesar sobrenadante
Añadir 0,2M de NaCl y 6% (p/v) de PEG (PM 6 000 - 8 000), mezclar e incubar a 4°C durante 120 minutos

Sedimentar
2 500 g durante 30 minutos

Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de $MgCl_2$ (40% del volumen original)
Agitando durante 120 minutos

Continúa ....

Clarificar
2 500 g durante 10 minutos

Eliminar sedimento

Procesar sobrenadante

Centrifugar
En colchón de sucrosa al 20% (p/v) 1 ml de muestra por tubo
160 500 g durante 60 minutos

Eliminar sobrenadante

Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de $MgCl_2$
a 4°C durante toda la noche

Clarificar
2 500 g durante 10 minutos

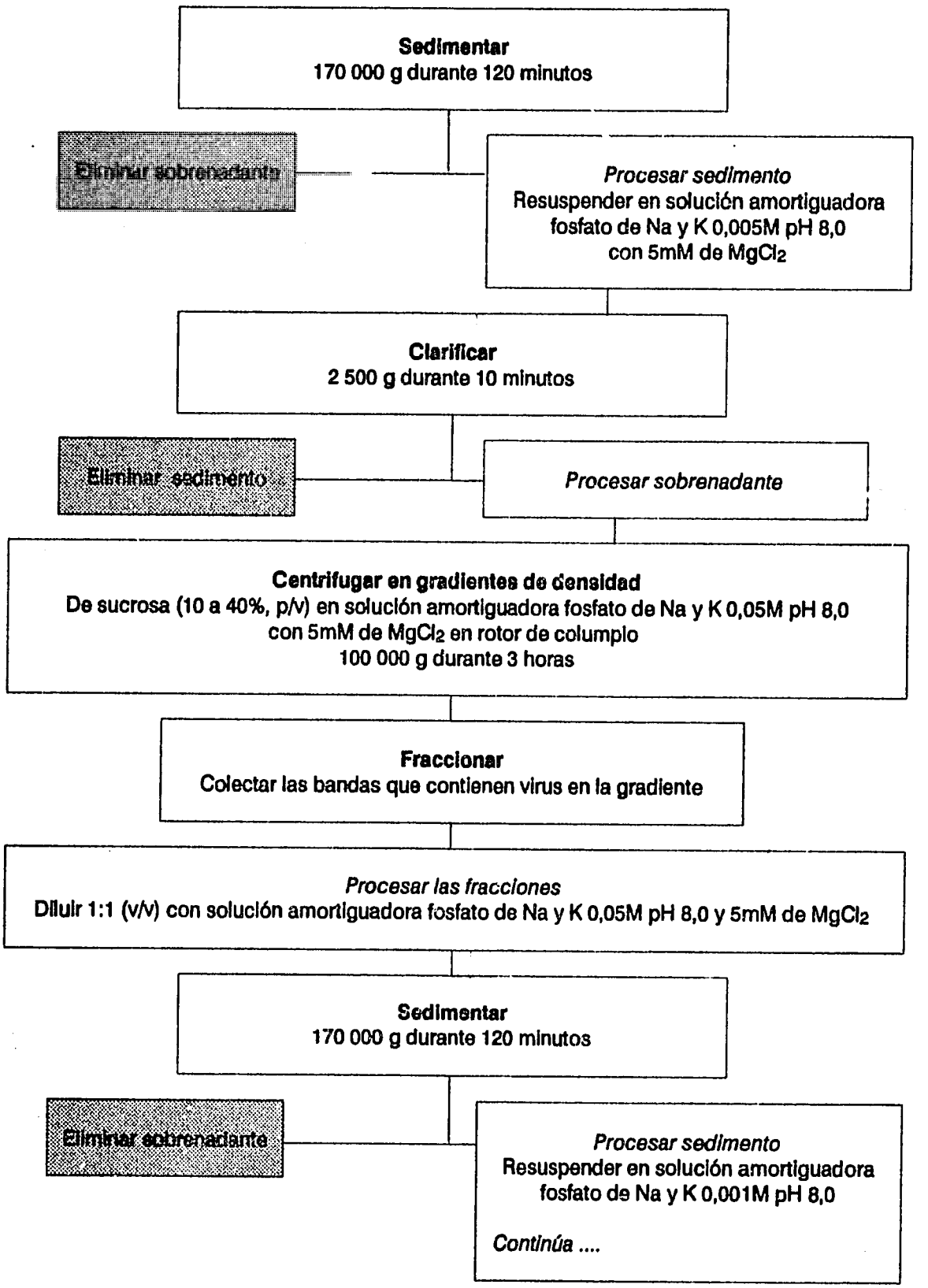
Eliminar sedimento

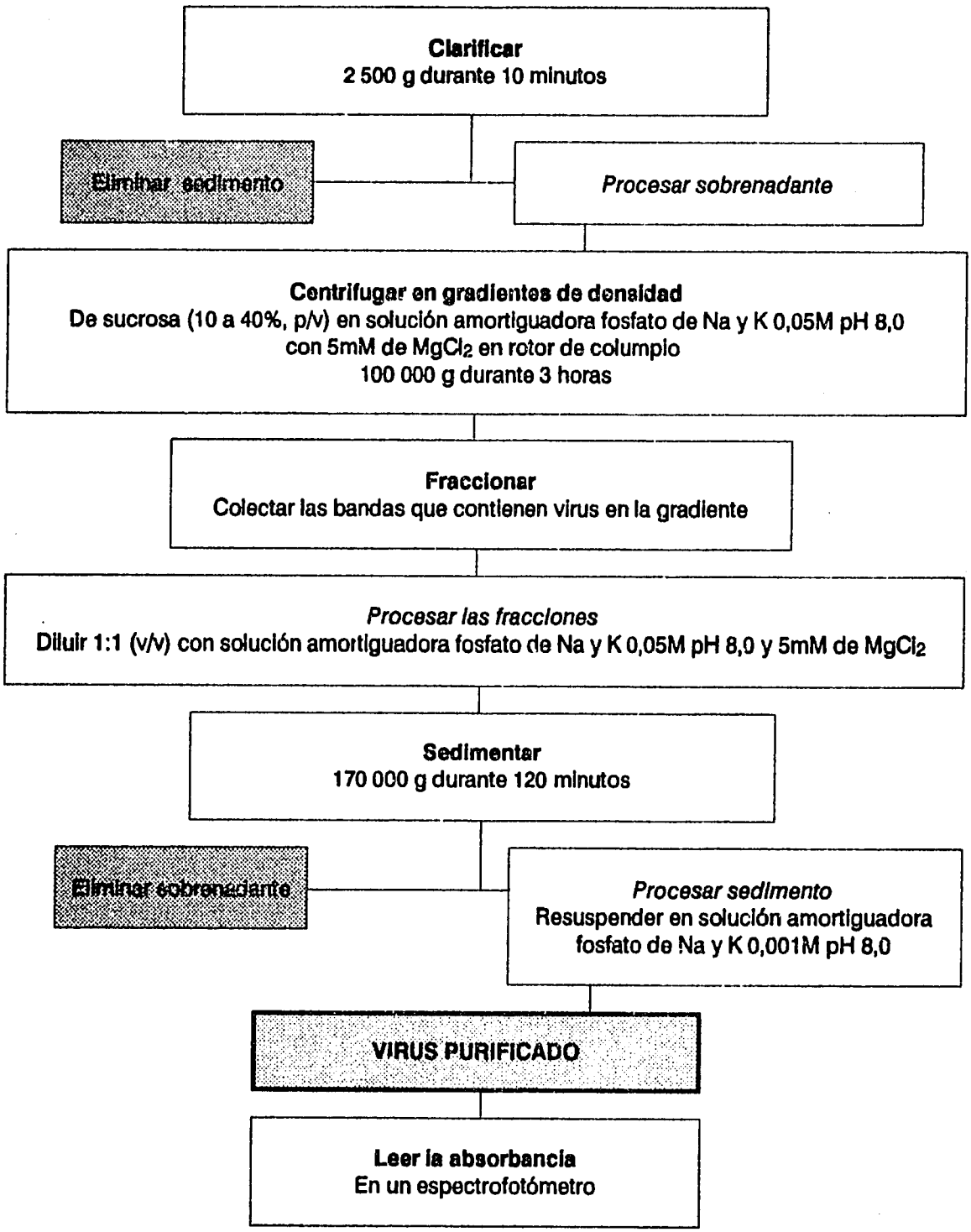
Procesar sobrenadante

Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de $MgCl_2$ en rotor de columpio
100 000 g durante 3 horas

Fraccionar
Colectar las bandas que contienen virus en la gradiente

Procesar las fracciones
Diluir 1:1 (v/v) con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 y 5mM de $MgCl_2$
Continúa ....


Sedimentar
170 000 g durante 120 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,005M pH 8,0 con 5mM de MgCl2
Clarificar
2 500 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 con 5mM de MgCl2 en rotor de columpio
100 000 g durante 3 horas
Fraccionar
Colectar las bandas que contienen virus en la gradiente
Procesar las fracciones
Diluir 1:1 (v/v) con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 y 5mM de MgCl2
Sedimentar
170 000 g durante 120 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,001M pH 8,0
Continúa ....


Clarificar
2 500 g durante 10 minutos
Eliminar sedimento
Procesar sobrenadante
Centrifugar en gradientes de densidad
De sucrosa (10 a 40%, p/v) en solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0
con 5mM de $MgCl_2$ en rotor de columpio
100 000 g durante 3 horas
Fraccionar
Colectar las bandas que contienen virus en la gradiente
Procesar las fracciones
Diluir 1:1 (v/v) con solución amortiguadora fosfato de Na y K 0,05M pH 8,0 y 5mM de $MgCl_2$
Sedimentar
170 000 g durante 120 minutos
Eliminar sobrenadante
Procesar sedimento
Resuspender en solución amortiguadora
fosfato de Na y K 0,001M pH 8,0
VIRUS PURIFICADO
Leer la absorbancia
En un espectrofotómetro

REFERENCIAS

MARAMOROSCH, K y H KOPROWSKI 1967. Methods in virology. Volume II. Academic Press. New York, U.S.A.

MATTHEWS, R.E.F. 1991. Plant Virology. Thrid Edition. Academic Press Inc. U.S.A.

Principles and techniques in plant virology. 1972. Edited by Kado/Agrawal. Van Nostrand Reinhold Company U.S.A.

Las Unidades Técnicas de Capacitación (TTU), constituyen materiales impresos de estudio para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.

MANUAL DE TECNICAS EN VIROLOGIA

6.0 PURIFICACION

Fascículo 6.3 Conceptos Generales sobre Centrifugación

La centrifugación, en sus diferentes formas, es un procedimiento indispensable en la investigación. Se utiliza mayormente en:

- el aislamiento de proteínas, ácidos nucleicos y virus de células,
- el aislamiento de organelos celulares,
- determinación del tamaño de macromoléculas,
- la identificación de macromoléculas por sus características de sedimentación, y,
- la resolución de mezclas de moléculas y determinación de su pureza.

En un campo de fuerza de gravedad, una partícula suspendida en medio líquido de una densidad menor tiende a migrar a través del fluido en la misma dirección que la fuerza (sedimentación). Sin embargo, si la densidad de la partícula es menor que el medio líquido, el movimiento es en dirección opuesta (flotación).

En ausencia de disturbios de convección, la tasa de migración depende del tamaño, forma y densidad de la partícula, la densidad y viscosidad del medio líquido y la intensidad del campo gravitacional.

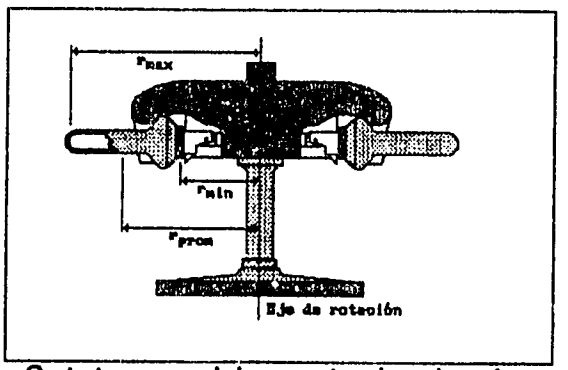
Los organelos de las células del tamaño del núcleo (que se encuentren en un medio apropiado) sedimentarán en campos gravitacionales relativamente bajos. Para poder sedimentar partículas de menor tamaño y macromoléculas, hace falta emplear fuerzas gravitacionales mayores. Existen centrífugas disponibles que pueden producir fuerzas equivalentes a más de 250 000 g. Esta fuerza es suficiente para poder sedimentar macromoléculas de peso molecular de 10 000.

A continuación se describen los tipos de rotores y centrífugas más comunes y nociones teóricas para el cálculo de algunos parámetros de centrifugación.

1. Rotores

a) Rotores de columpio

Los rotores de columpio se utilizan mayormente en centrifugación zonal de proteínas, DNA y RNA, en centrifugación diferencial de fracciones subcelulares y en separación zonal de partículas pequeñas. También se utilizan para sedimentar células animales o vegetales a baja velocidad y en purificaciones de virus, especialmente cuando se realizan gradientes de densidad de sucrosa o de cloruro de cesio y en colchones de sucrosa.



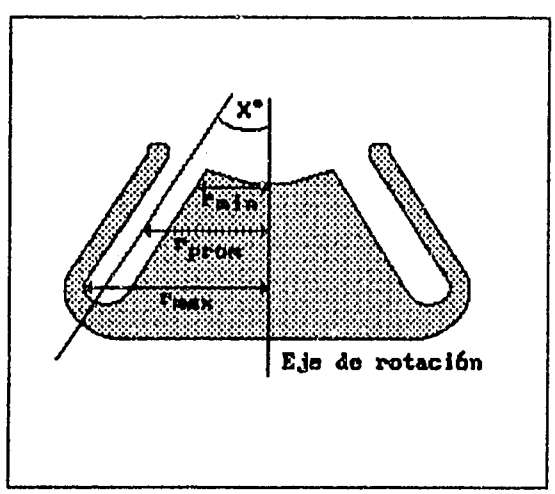
Corte transversal de un rotor de columpio

En reposo, los tubos de este tipo de rotor mantienen una posición vertical; en rotación, los tubos giran perpendicularmente al eje de rotación en posición horizontal. La distancia de sedimentación está dada por el largo del tubo.

b) Rotores de ángulo fijo

En este tipo de rotor. la distancia de sedimentación es menor que en los rotores de columpio. Las partículas chocan contra la pared interior del tubo y luego se desplazan hacia el fondo formando un sedimento o "pellet". El ángulo del rotor (X) puede ser desde 0° (rotor vertical) hasta 30° aproximadamente, dependiendo del modelo y de las necesidades del investigador.

Los rotores de ángulo fijo tienen múltiples aplicaciones. Entre ellas están la centrifugación diferencial de volúmenes grandes de fracciones subcelulares y virus, la centrifugación zonal de partículas subcelulares, lipoproteínas, DNA, etc.

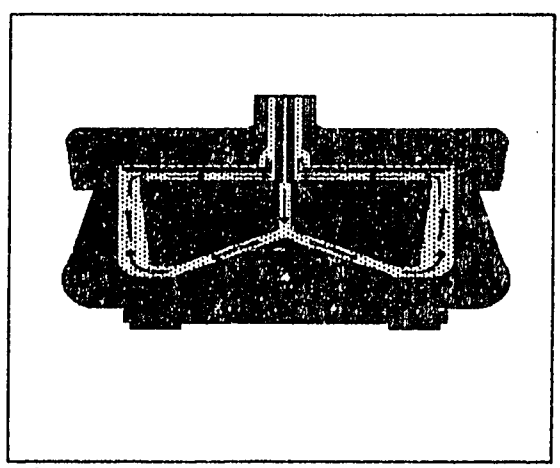


Corte transversal de un rotor de ángulo fijo (X°).

c) Rotores zonales de flujo continuo

Este tipo de rotor se utiliza para la centrifugación de tipo fluido continuo y para unas variantes especiales de gradientes de densidad, principalmente la centrifugación zonal de lipoproteínas y el bandeamiento isopícnico de virus y partículas subcelulares. No utiliza tubos de centrífuga.

La gradiente fluye hacia el rotor en movimiento por medio de tubos. La muestra se coloca después mediante el mismo sistema. Luego se desconectan los tubos, se asegura el rotor y se aumenta la velocidad de centrifugación de acuerdo al procedimiento. El flujo del líquido dentro del rotor se muestra en el diagrama. Una vez terminada la corrida, s disminuye la velocidad y se conectan nuevamente los tubos, que a su vez están conectados directamente a un fraccionador. De esta forma puede colectarse la banda deseada.



Corte transversal de un rotor zonal de fluido continuo mostrando el sentido del flujo del líquido en su interior.

d) Rotores analíticos

Estos rotores tienen células de observación de cuarzo que permiten el paso de la luz a través de la muestra. Se utilizan principalmente en las ultracentrífugas analíticas para determinar las propiedades físicas de una muestra, así como su coeficiente de sedimentación

2. Centrífugas

a) Centrífugas de baja velocidad

Alcanzan velocidades de 3 000 a 5 000 rpm y normalmente tienen rotores de tipo columpio. se utilizan para la sedimentación de células de animales o plantas.

b) Centrífugas de velocidad media

Pueden llegar hasta un a velocidad de 20 000 rpm.

c) Centrífugas de velocidad alta (ultracentrífugas)

Pueden llegar a alcanzar velocidades de hasta 80 000 rpm. Existen dos tipos básicos:

- Preparativas: el contenido de los tubos se analiza después de la corrida. Se utilizan para purificaciones.
- Analíticas: el contenido del tubo se analiza durante la corrida. Se utilizan para determinar las propiedades físicas, así como el coeficiente de sedimentación. Existen dos sistemas ópticos, el de "schlieren" y el ultravioleta. El último sistema es el más sensible.

Uso de centrífugas de velocidad media

Generalmente, los rotores deben ser previamente enfriados y el agua de condensación externa debe ser eliminada. Las cavidades del rotor deben estar limpias y secas.

Los tubos se contrapesan dos a dos y se colocan en sitios opuestos dentro del rotor.

Las empaquetaduras de la tapa del rotor deben estar bien lubricadas con grasa para vacío (lubricante silicona).

Se deben verificar los parámetros adecuados una vez que se enciende la centrífuga: seleccionar la fuerza de frenado ("brake"), la temperatura de centrifugación deseada, la temperatura máxima sobre la cual la centrífuga no debe funcionar (normalmente se utiliza una temperatura entre 4 a 30°C.) y la velocidad.

Abrir la tapa de la centrífuga y secar la humedad dentro de la cámara. Poner el rotor encima del eje teniendo cuidado que los pines del rotor encajen en el eje. Poner la tapa del rotor y ajustar con cuidado (debe estar bien asegurada, pero no debe ajustarse demasiado). Cerrar la puerta de la centrífuga.

Seleccionar el tiempo deseado de centrifugación. Esperar que se forme el vacío y empezar la corrida.

Cuando el ciclo termina , la velocidad empieza a bajar. Cuando el indicador de parada ("stop") se encienda, abrir la puerta de la centrífuga. Desajustar la tapa del rotor y sacarlo verticalmente. Nunca debe dejarse el rotor en el eje después de terminada la corrida.

Secar la cámara de la centrífuga y cerrar la puerta. Es importante que no quede hielo en la cámara. Deshelar dejando abierta la puerta con la centrífuga apagada y secar bien. Una vez que la cámara esté seca, prender la centrífuga, cerrar la puerta y apagarla. El agua en la cámara evita un buen control de temperatura.

Lavar y secar el rotor y almacenarlo en posición invertida y destapado.

Uso de ultracentrífugas

Enfriar previamente los rotores (con excepción de los rotores de columpio) y secar el agua de condensación externa. Nunca correr un rotor sin el disco de "overspeed" (base del rotor). Examinar las cavidades del rotor; deben estar limpias y secas. Contrapesar los tubos dos a dos y colocarlos en sitios opuestos dentro del rotor. Verificar que las empaquetaduras del rotor estén lubricadas con grasa para vacío (lubricante silicona). Asegurarse que la tapa del rotor está bien cerrada.

Verificar el nivel de aceite de la centrífuga y asegurarse que la corriente eléctrica sea estable, al igual que la presión del agua.

Encender la centrífuga y abrir la puerta de la cámara. Si es necesario, limpiar y secar el interior. Colocar verticalmente el rotor en la cámara. Asegurarse que los dos pines sobresalientes en la base de algunos rotores encajen perfectamente en los dos orificios del eje de la centrífuga. Cerrar la puerta de la cámara. Verificar que los indicadores aceite, balance, vacío, frenado y modo sean los adecuados.

Activar el ciclo de secado. Una vez terminado éste, seleccionar la temperatura, la velocidad y el tiempo de la corrida.

Iniciar el ciclo de corrida. El vacío se hará automáticamente. Esperar y observar que la aguja del tacómetro llegue a la velocidad deseada. Si se observa algo anormal en el funcionamiento de la centrífuga, abortar la corrida y llevar el tiempo a cero. Verificar las posibles causas, y si es necesario, llamar a un técnico especializado.

Al finalizar el tiempo de corrida, comenzará a descender la velocidad. Al lle[illegible]cero" se oirá un sonido de descenso del vac[illegible] abrir la puerta de la cámara y sacar verticalmente el rotor. Limpiar y secar la cámara. Cerrar la puerta y apagar la centrífuga.

3. Cálculo de la fuerza centrífuga relativa (RCF)

El campo de fuerza centrífuga es igual a:

$$w^2r$$

donde **w** es la velocidad angular (igual a 2pi revoluciones por segundo) y **r** la distancia del centro de rotación.

En un campo de fuerza centrífuga, la fuerza que actúa sobre una partícula de masa **m** es igual a:

$$mw^2r$$

y la razón:

$$\frac{\text{fuerza centrífuga}}{\text{fuerza gravitacional}} = \frac{mw^2r}{mg} = \frac{w^2r}{g}$$

se conoce como fuerza centrífuga relativa (RCF):

$$RCF = w^2r/g$$

donde **g** = 9 807 mm/s^2

Por ejemplo: Si se está utilizando un rotor analítico a 60 000 rpm y se considera una fuerza que actúa en un punto a 65 mm del centro de rotación, entonces:

60 000 rpm = 1 000 rps

Hay 2pi (6,29) radianes por revolución (360^0), entonces:

$w = 1\,000 \times 6{,}29$
$w = 6{,}29 \times 10^3$
$w^2 = 3{,}95 \times 10^7$
$w^2r = 3{,}95 \times 10^7 \times 65 = 2{,}57 \times 10^9$

$$RCF = \frac{w^2r}{g} = \frac{2{,}57 \times 10^9}{9\,807} = 262\,000 \times g$$

Como:

$RCF = w^2r/g$, y: $w = 2$ rps $= 2$ rpm/60

se puede derivar una fórmula más útil:

$$RCF = 1{,}12\, r\, (rpm/1\,000)^2$$

donde **r** se da en milímetros.

4. Coeficiente de sedimentación

La velocidad de sedimentación de una partícula, es decir, la tasa de migración, depende de su tamaño, forma y densidad, de la viscosidad del medio líquido y de la intensidad del campo de la fuerza centrífuga.

El coeficiente de sedimentación (S) es igual a la velocidad en cm/s en la cual una sustancia sedimentará en un campo de fuerza de una dina (1/981 g). Su valor es pequeño y se expresa en unidades "Svedberg", calculado en agua a 20°C.

$$S = \text{valor calculado} \times 10^{-13}\ S_{20,w}$$

Por ejemplo, el valor para el virus del mosaico del tabaco (TMV) es 180S

5. Uso de factores K de los rotores

Cada rotor tiene un factor propio de eficiencia de sedimentación ("clearing factor") que se calcula a sus revoluciones máximas por minuto (k). El tiempo t en el cual una partícula sedimenta será:

$$t = k/s,$$

donde t se da en horas.

Para utilizar esta fórmula a menor velocidad:

$$k' = (\text{rpm máximas/rpm de corrida})^2 k$$

Por ejemplo, para calcular el tiempo necesario para sedimentar TMV (180S) en el rotor 65:

k del rotor 65 = 45; su valor máximo de rpm es de 65 000.

$$k' = (65\,000/50\,000)^2\ 45 = 76{,}05$$

$$t = k/s = 76{,}05/180 = 0{,}42 \text{ horas.}$$

Las **Unidades Técnicas de Capacitación (TTU)**, constituyen materiales impresos de estudios para los profesionales involucrados en actividades de capacitación desarrolladas por el CIP y está constituida por una serie de fascículos susceptibles a ser actualizados.