

# Técnica de inmunoimpresión en membranas de nitrocelulosa: una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PVX, PVY, PVS y PLRV que infectan a la papa (*Solanum* spp.)

## Tissue printing technique in nitrocellulose membranes: a rapid detection technique for estimating incidence of PVX, PVY, PVS and PLRV viruses infecting potato (*Solanum* spp.)

Mónica Guzmán\*, Marina Caro\*\*, Yenny García.

### RESUMEN

La técnica serológica de ELISA, se ha utilizado desde los años setentas como técnica cuantitativa para la detección de diversos grupos de virus que infectan a las plantas. Más recientemente se ha implementando la técnica cualitativa de inmunoimpresión (IMI) en membrana de nitrocelulosa, en la detección de diferentes grupos virales. En el presente trabajo se adaptó la técnica de IMI para la detección de los virus PVX, PVY, PVS y PLRV que atacan los cultivos de diferentes especies y variedades de papa (*Solanum* sp.) como yema de huevo, capiro, morita, pastusa, monserrate, tuquereña, ICA Puracé, ICA Nariño. Estos cuatro virus pueden causar pérdidas entre el 30% y 60% en la producción, ya sea solos o actuando sinérgicamente, por lo cual pueden reducir sensiblemente los beneficios económicos de un país que como Colombia se caracteriza por ser un gran productor de papa, con más de 2.8 millones de toneladas al año. La técnica IMI se comparó con la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) realizada sobre las mismas muestras, lo que permitió confirmar la sensibilidad de la prueba para la detección de los virus. Sobre un total de 800 muestras analizadas por IMI procedentes de diferentes veredas del departamento de Nariño, se encontró una incidencia del 72% para PVY, 38.7%, para PVX, 85.6% para PVS y 91.1% para PLRV; estimaciones que fueron similares o superiores a las obtenidas por la técnica de ELISA. Los resultados son novedosos para Colombia tanto por la implementación de la fácil y sensible técnica IMI para la detección de estos cuatro grupos virales que infectan a la papa como por la estimación de su incidencia en Nariño, uno de los departamentos productores de papa más importantes para el país. La detección oportuna y ágil de los virus es útil para dar una respuesta efectiva para la erradicación de material contaminado, tanto en material de campo como si es necesario, proveniente de cultivo *in vitro*. Los resultados de este trabajo permiten sugerir que la implementación de la técnica IMI, puede ser muy útil para los programas de certificación de semillas de papa con amplios beneficios puesto que se mantiene la sensibilidad y la especificidad, se reducen costos y es además participativa pudiendo involucrar a técnicos y agricultores.

Palabras clave: inmunoimpresión, serología, diagnóstico viral, papa, ELISA

### ABSTRACT

The ELISA serological technique has been used since the 1970s as a quantitative technique for the detection of many groups of virus which infect plants. The immune-impression (IMI) in nitrocellulose membrane qualitative technique has been implemented more recently for the detection of different viral groups. In this work, the IMI technique has been adapted for the detection of PVX, PVY, PVS and PLRV viruses which attack different species and varieties of potato crop (*Solanum* spp.), such as Egg yolk, Capiro, Morita, Pastusa, Monserrate, Tuquerreña, ICA

---

\* Ph.D, Laboratorio Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia. E- mail: moguzman@ibun.unal.edu.co \*\* Laboratorio Cultivo de Tejidos, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia

Recibido: mayo 30 de 2002; aceptado: noviembre 1 de 2002

Puracé and ICA Nariño, all from the Nariño department. The four viruses mentioned above can cause 30% and 60% losses in production, be they acting alone or synergistically. This means that they can easily reduce the economic benefits of a country like Colombia, characterised as being a great potato producer (i.e. more than 2.8 million tons per year). The IMI technique was compared with the ELISA technique (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) using the same samples, leading to confirmation of the test's sensitivity for detecting the virus. From a total of 800 samples analyzed by IMI from different areas in the Nariño department, 72% incidence for PVY, 38.7% for PVX, 85.6% for PVS and 91.1% for PLRV was found; these estimates were similar or greater than those obtained using ELISA. These results are new for Colombia in terms of implementing the easy and sensitive IMI technique for detecting these four viral groups infecting the potato as well as estimating their incidence in Nariño, one of Colombia's most important potato-producing departments. The opportune and flexible detection of virus leads to an effective response to eradicating contaminated material, both material in the field as well as that from *in vitro* culture. Results lead to it being suggested that implementing IMI could bring wide benefits for potato seed certification programmes, as they maintain sensitivity and specificity, they reduce costs and can be participative.

Key words: Immune-impression, serology, viral diagnosis, potato, ELISA.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia, el cultivo de papa (*Solanum spp.*) ocupa el quinto lugar en importancia y se hacen intensos esfuerzos por mejorar la calidad y certificación de la semilla. Al igual que otros cultivos vegetales las variedades de papa son atacadas por diversos fitopatógenos, entre ellos los virus PVY, PVX, PLRV y PVS, cuyo efecto sobre los cultivos, solos o en sinergismo, puede reducir la producción entre un 30% y un 60% (Salazar, 1995). El diagnóstico de las enfermedades virales se ha realizado en plantas a través de la sintomatología y principalmente por la técnica serológica cuantitativa de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) descrita por Clark y Adams (1977). Más recientemente, se han desarrollado otras técnicas de detección de virus por PCR, hibridación por "dot-blot" (Varveri *et al.* 1987; Wetzel *et al.* 1991; Adams *et al.* 1999) que se han adaptado con éxito para detección de virus en diferentes cultivos (Nolasco *et al.* 1993; Guzmán *et al.* 2001) que son sensibles pero a la vez costosas y requieren de una alta capacitación.

A partir de la década de los noventa, se ha venido implementado con éxito la técnica de inmunopresión (IMI) o "tissue printing", para la detección de diferentes virus fitopatógenos, como el virus del mosaico del cocombro (CMV), el virus del mosaico amarillo del zucchini (ZYMV) (Lin *et al.* 1990; Polston *et al.* 1991), el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Gamsey *et al.* 1993; Guzmán, 1998) y en plantas transformadas con virus del enrollamiento de hoja de la papa (PLRV) (Baker *et al.* 2000). También se ha utilizado para determinar la distribución de la proteína de cápside y

ácidos nucleicos de Plum Pox Virus (PPV) (Martínez-Gómez y Dicenta, 2001).

La detección rápida y segura de agentes que causan enfermedades en vegetales es esencial para certificar el estado de sanidad de las plantas. Teniendo en cuenta que la técnica IMI es sensible, sencilla y de bajo costo, el presente trabajo tuvo como objetivo adaptar e implementar la técnica IMI para la detección de cuatro virus (PVY, PVX, PLRV, PVS) que infectan a diferentes especies y variedades de papa, y estimar la incidencia a partir de algunas veredas del departamento de Nariño.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### La muestra

Se tomaron diferentes muestras de campo con síntomas característicos para PVX, PVY, PVS y PLRV como son las lesiones cloróticas o necróticas, mosaico rugoso, enrollamiento de hojas. Las muestras se recolectaron en la Calera (Cundinamarca) y en diferentes municipios del departamento de Nariño localizadas entre los 2700 y 3200 msnm. Para la recolección del material infectado se contó con la asesoría de expertos CORPOICA. En la Calera se colectaron 20 muestras y en Nariño se colectaron 124 conjuntos de muestras conformados por 10 a 15 individuos de *Solanum phureja* (yema de huevo) y *Solanum tuberosum*, variedades capiro, morita, pastusa, monserrate, tuquerreña, ICA Puracé e ICA Nariño. Las muestras se mantuvieron a 4°C, durante 5 días hasta su procesamiento para las técnicas de IMI o de ELISA.

## Técnica de Inmunoimpresión

La adaptación de la técnica IMI se basó sobre el protocolo para las detección de virus de la tristeza de los cítricos propuesto por Garnsey *et al.* (1993) y Guzmán (1998). Inicialmente se realizó una adaptación de la técnica con el grupo de 20 muestras sintomáticas procedentes de la Calera.

## Mapa y relación de muestras

Cada membrana se numeró para identificar al virus y las plantas. En el borde superior se colocó la impresión de un control negativo y uno positivo. Como control negativo se utilizaron plantas *in vitro* o *ex vitro* con resultados de ELISA negativos y los controles positivos y negativos del kit (AGDIA). En un papel aparte se realizó la plantilla de numeración para identificación de cada membrana, muestra y virus.

## Impresión de la muestra

Se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Marca Hybond C Amersham) de 0.45  $\mu\text{m}$  con diámetro de 8 cm, como soporte para las impresiones. Utilizando guantes de látex se realizaron cortes transversales a pecíolos y tallos, y se imprimieron suavemente sobre las membranas. Se hicieron entre dos y cinco impresiones por muestra, cada una de ellas por duplicado. Las membranas de nitrocelulosa se dejaron secar y se procesaron inmediatamente o se conservaron en una bolsa sellada por varias semanas o meses a temperatura ambiente (figura 1).

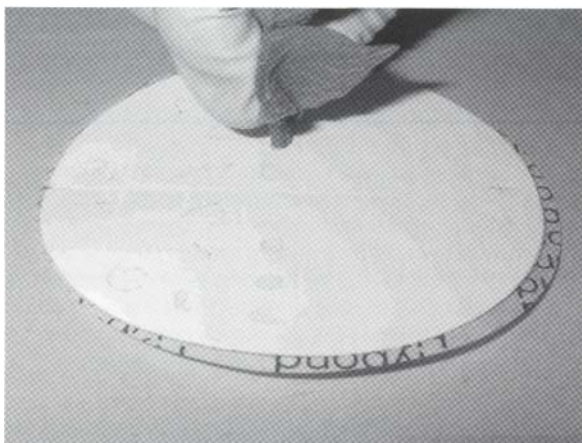


Figura 1: Impresión de pecíolos en corte transversal

## Bloqueo de sitios inespecíficos

Para cada caja de petri (10 cm de diámetro), las soluciones utilizadas se ajustaron a un volumen de 8 ml lo que garantiza una buena homogenización de las soluciones en las membranas. La membrana se colocó suavemente en la caja de petri que contenía una solución de TBS más leche descremada (2%). Se agitó suavemente de 1 a 3 horas a temperatura ambiente o se dejó toda la noche a 4°C.

## Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti PVY o PLRV o PVX o PVS y sus respectivos conjugados con la fosfatasa alcalina en las diluciones propuestas por la casa comercial (AGDIA). El anticuerpo primario que reconoce cada virus se diluyó (1:200) en buffer TBS (Tris 0.02M; NaCl 0.5M) con Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 0.5% o leche descremada al 3%. La solución se adicionó a la caja de petri y después la membrana se sumergió suavemente y se dejó en agitación suave a 37°C por un espacio de 3 horas a temperatura ambiente.

## Lavado

La membrana se lavó con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos en agitación suave. Transcurrido este tiempo el buffer se descartó y el proceso de lavado se repitió nuevamente por 3 a 5 veces

## Conjugado

El anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina se diluyó 1: 200 de igual forma que como se realizó con el anticuerpo primario. Se incubó 1 hora a 37°C en agitación suave. Tras la incubación la membrana se sometió al proceso de lavado con PBS-Tween.

## Substrato

La solución de revelado se preparó minutos antes de ser usada. Se debe utilizar guantes. Cuidadosamente se adicionó una solución de Nitro Blue Tetrasodium NBT (0.1 mg/ml) y Bromo Cloro Indol Fosfato BCIP (0.05mgr/ml) en buffer citrato (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pH 9.5) y se tapó la caja de petri con papel aluminio para evitar la fotosensibilidad del sustrato. Se dejó actuar durante 5 a 20 minutos, sin dejar que el fondo de la membrana cambie de coloración, solamente hasta que el control posi-

vo presente una coloración violeta. La enzima fosfatasa alcalina hidroliza el sustrato y se produce un precipitado color violeta en la membrana, en los sitios virus positivos. La coloración púrpura varía de intensidad dependiendo de la concentración viral. Las impresiones de muestras de controles negativos permanecen verdes o amarillas claras. Una vez se completa el proceso, la solución reveladora se recoge en botellas para desechos y la reacción se detiene con agua destilada.

**Observación**

La membrana se observa inmediatamente bajo estereoscopio o directamente, o se puede almacenar entre 2 papeles absorbentes hasta su lectura (Ver Figura 2).

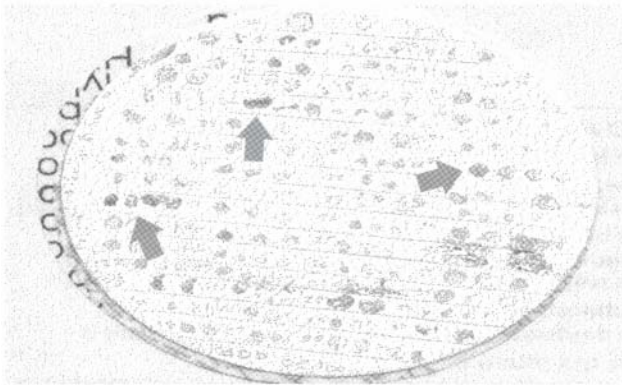


Figura 2: Impresiones de pecíolos de papa. Las marcas indicadas por las flechas corresponden a muestras infectadas por virus.

**Técnica de ELISA - DAS**

La técnica serológica cuantitativa de ELISA-DAS (Clark y Adams, 1977) se realizó según lo indicado en el protocolo de anticuerpos de la casa comercial AGDIA. En síntesis se cubrió la placa de ELISA (NUNC - Immunot M plate) con 100 µL de anticuerpo específico y se incubó durante 4 horas a 37°C, la placa se lavó con buffer TBS-Tween durante 5 minutos por 3 veces y se adicionó 100 µL de muestra (dilución 1:10 en buffer de extracción) en cada pozo con un duplicado para cada muestra. Como blanco se utilizó TBS o buffer de extracción, y para comparación un control positivo y un control negativo. La muestra se incubó toda la noche a 4°C. Se lavó como en el paso anterior. Se agregó 100 µL de conjugado a la fosfatasa alcalina y se incubó 1 hora en cámara húmeda. La placa se lavó con TBS-Tween, 3 veces

por 5 minutos. Antes de realizar el último lavado se preparó la solución p-nitro fenil fosfato (PNP) a 1 µg/ml, en buffer de sustrato, en un frasco ámbar. Se adicionaron 100 µL de esta solución a cada pozo después del último lavado. Transcurridos 60 minutos a temperatura ambiente y 12 horas a 4° C, se realizó la lectura en un lector de ELISA (BIORAD) con filtro de 405 nm. Se tomó como positivo aquellas muestras que tuvieran una densidad óptica (DO) 2 veces superior al promedio de la DO del control negativo.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las membranas de nitrocelulosa procesadas se leyeron en estereoscopio entre 1 y 30 días después de realizarse el procedimiento teniendo buena calidad en los resultados (figura 2) . Para efectos de cuantificación de la cantidad de precipitación viral presente en cada muestra procesada por la técnica IMI se asignó de manera arbitraria una cruz dependiendo de la intensidad de precipitado violeta (Tabla 1).

Tabla 1. Estimación de la presencia viral

Lectura	Cuantificación
Muy poco	+
Poco	++
Moderado	+++
Alto	++++
Muy alto	+++++
Negativo	- sin virus

**Negativo(-)** Sin precipitación violeta evidente; **Muy poco (+)** Algunas precipitaciones violeta en muy pocos sitios; **Poco (++)** Escasas precipitaciones en varios lugares de la muestra; **Moderado (+++)** Varios puntos con mayor concentración de carga viral; **Alto(++++)** Precipitación y puntos grandes muy evidentes incluso a simple observación sin ayuda de estereoscopio; **Muy Alto (+++++)** intensa precipitación en toda la muestra.

En la figura 3 se ilustran los diferentes niveles de infección viral observados por medio de la técnica IMI. Las zonas más oscuras corresponden a la presencia de virus positivas.

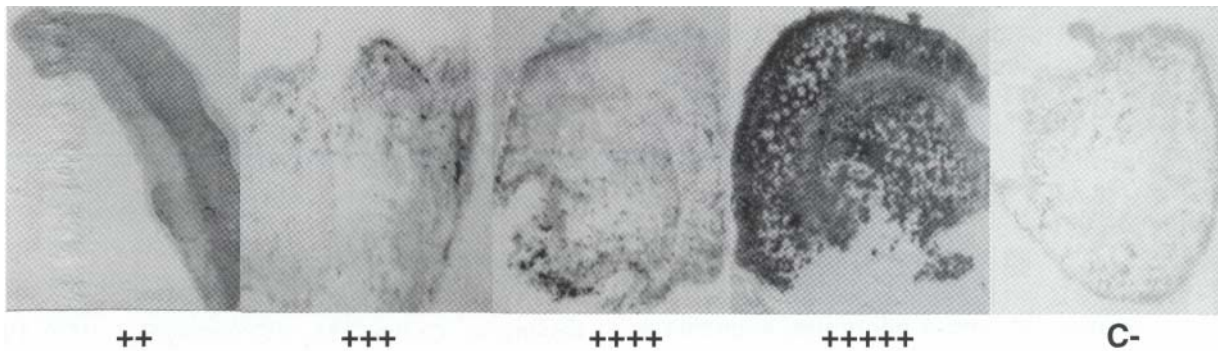


Figura 3. Ejemplo de diferentes niveles de detección viral

Paralelamente a la técnica IMI se realizó la técnica ELISA en cada uno de los conjuntos ("pooles") de muestras. La Tabla 2 presenta los porcentajes de muestras ELISA e IMI positivas para los diferentes virus. En la técnica IMI el virus con más alta incidencia fue PLRV, lo que está de acuerdo con la sintomatología observada, donde la mayoría de muestras presentaba el típico enrollamiento de las hojas.

Tabla 2. Detección viral según las técnicas de ELISA e IMI

VIRUS	Porcentaje muestras positivas	
	ELISA Total 800 muestras	IMI Total 800 muestras
PVX	35.5 %	38.7 %
PVY	34.0 %	72.0 %
PLRV	66.1 %	91.1 %
PVS	26.4 %	85.6 %

Se logró adaptar la técnica IMI para la detección de algunos virus que infectan a la papa con buena sensibilidad especialmente en muestras de pecíolo transversal. La aplicación en campo de la técnica IMI permitió establecer porcentajes nuevos de incidencia viral para cuatro virus, en algunos municipios del departamento de Marino que es considerado como uno de los departamentos colombianos de mayor peso en la producción y consumo de papa.

Comparando los resultados de IMI con los de ELISA no siempre se pudo encontrar concordancia 1 a 1 en la medida de que en IMI se observaron muestras individuales mientras que en ELISA se observaron muestras individuales o "pooles" de muestras. También se encontraron algunas muestras IMI posi-

tivas que eran ELISA negativas lo que podría explicarse por dilución extrema de una muestra positiva dentro de un "pool" de varias muestras negativas, o como debido a una mayor oxidación de las muestras en el macerado de ELISA, que en la impresión directa del tejido. Esta explicación puede ser plausible para la diferencia entre los resultados de IMI y ELISA para PVS (86% versus 26.4%) respectivamente. De otra parte, hay que tener en cuenta que la sensibilidad de la membrana a la fijación de la muestra y/o de los anticuerpos puede ser mayor que la del plato de ELISA para la detección de algunos virus, como lo plantea Lin *et al.* (1991), para el TSWV en tomate que no son detectados por ELISA en tejido asintomático de hojas de plantas infectadas, pero si por impresión de estos mismos tejidos.

Otra ventaja de IMI es que permite determinar la localización o distribución de virus en la muestra u órgano vegetal además de que también se pueden realizar rastreos virales más amplios o de mayor cobertura regional, que utilizando ELISA. De otra parte, IMI tiene la ventaja de ser menos costosa y de poderse desarrollar tanto en material *in vitro* como *ex vitro*, con posibilidades de ser una técnica participativa en la fase de impresión de muestras lo que permitiría un sondeo más amplio de la incidencia viral en los cultivos de papa del país. Con una capacitación mínima de técnicos, agrónomos y/o agricultores las impresiones se podrían realizar sobre las membranas en campo ( en una primera etapa) y posteriormente éstas se enviarían al laboratorio para el procesamiento y diagnóstico. No se puede desestimar que la técnica de ELISA tiene la ventaja de ser cuantitativa y más rápida para la detección en "pooles" de muestras.

El conjunto de resultados este trabajo permitió de una parte adaptar una técnica sencilla para la detección de algunos virus que infectan la papa y de otra, estimar la incidencia (porcentaje de infección nueva) de cuatro virus que infectan al cultivo de papa en zonas del departamento de Marino.

## CONCLUSIONES

Por Primera vez en Colombia se estandarizó y validó la técnica IMI sobre diferentes especies y variedades de *Solanum* spp. para la detección de los virus PVY, PVX, PLRV y PVS que afectan a los cultivos de papa. A través de IMI y de ELISA se pudo estimar la incidencia de estos virus en veredas de Marino, uno de los departamentos más importantes en el cultivo de papa. Si se utiliza adecuadamente la técnica IMI puede abaratar los costos con relación a otras técnicas inmunológicas y puede plantearse como una técnica participativa, que involucre tanto a agricultores, semilleros, técnicos y laboratoristas. También, a través de esta técnica es posible determinar la distribución de las partículas o acumules virales dentro de la hoja y en general de la planta. Sin embargo, la técnica de ELISA tiene la ventaja de ser cuantitativa mientras que IMI es cualitativa. En cualquiera de las dos técnicas se debe anotar la importancia del uso de controles positivos y negativos para realizar las comparaciones pertinentes. En nuestra experiencia IMI fue más sensible que ELISA para la detección de cantidades ínfimas virales.

Es posible que con la técnica IMI se puedan realizar en un futuro sondeos amplios en otras regiones y departamentos del país para estimar la incidencia viral en cada una de ellas. Por lo tanto, IMI se puede constituir en una técnica de apoyo para el programa colombiano de certificación de semillas de papa, y en una buena herramienta de diagnóstico para el rastreo de virus en campo y en invernadero, potenciando su utilización para material vegetal mantenido *in vivo* o *in vitro*. Así mismo, la técnica IMI puede ser de importancia para el control de patógenos en material de introducción al país o de transporte interregional.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a CEVIPAPA, a la División de Investigaciones de la Universidad Nacional (DIB) y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo económico para la realización del presente trabajo

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A., Guise, C.M., y Crossley, S.J. 1999. Plum pox virus detection in dormant plum trees by PCR and ELISA. *Plant Pathology* 48: 240 - 244.
- Baker, H., Mayo, M.A., McGeachy, K., Franco-Lara, L., Commandeur, U and Martin, R.R. 2000. Plants transformed to express the entire genome of Potato Leafroll Virus. [www.Biology.plant Biology](http://www.Biology.plant Biology).
- Clark, M. y Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M y Henderson, C.T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza. In: Proc. 12<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV) (Moreno, P., dsGraca, J. y Timmer, L. Editors). Riverside, pp: 30-50.
- Guzmán, M., Bermudez, y Castro, C. 2001. Identificación del virus del mosaico suave el ñame (MV) en muestras colombianas de *Dioscorea alata* - Caracterización Biológica Serológica y Molecular. *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol 3(1): 72-79.
- Guzmán, M. 1998. Caracterization biologique, sérologique et moleculaire d'isolats du virus de la tristeza des agrumes (CTV) en Corsé. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux 2 Víctor Segalem, Francia.

- Lin N.S., Hsu. H and Hsu H.T .1990. Immunological Detection of Plant Viruses and a Mycoplasma-like Organism by Direct Tissue Blotting on Nitrocellulose Membranes. *Phytopathology*. (80)9:824-828
- Martínez- Gómez, P y Dicenta, F. 2001. Distribution of coat protein and nucleic acid of Plum pox Virus (PPV) in seedlings of peach rootstock GF301 and apricot cv. Real Fino. *Phytopathology. Mediterránea*, 10: 15-164.
- Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V and PONZ, F 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods*, 7: 255 - 264.
- Polston ,J., Bubrick,P. and Perring, M.T. 1991. Detection of plant virus coat proteins on whole leaf blots. *Analytical Biochemistry* 196, 267 - 270.
- Salazar, F. 1995. Los virus de la papa y su control. *Centro Internacional de la Papa (CIP)* 216p.
- Varveri, C., Ravelonandro, M y Dunez, J.1987. Construction and use of a cloned cDNA probe for detection of Plum Pox Virus in plants. *Phytopathology* 77, 1221-1224.
- Wetzel, T., Candrese,T., Ravelonandro, M. Y Dunez, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox virus detection. *Journal of Virological Methods* 33: 355-365.