

Capítulo 30

Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicadas al cultivo de tejidos

S. F. Nome*

Agradecimientos

A la Ing. Agr. Delia M. Docampo, al Dr. Bernardo Latorre y a la Biol. Graciela Laguna por la revisión crítica del manuscrito. A Juliana Prósperi por los trabajos fotográficos y a Graciela Vega por los trabajos de preparación mecanográfica.

* Instituto de Fitovirología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Córdoba, Argentina.

Conceptos Básicos

Un principio de patología vegetal señala que las especies multiplicadas vegetativamente durante muchos años se infectan sistémicamente con uno o varios patógenos, en especial virus o agentes similares (Nyland, 1968). No todos los virus producen síntomas definidos en sus hospedantes, por lo cual, en muchas circunstancias, las enfermedades pasan inadvertidas o son difíciles de evidenciar; en consecuencia, es posible que el daño económico o las pérdidas originadas por la enfermedad no sean percibidas. Una moderada reducción del número o del tamaño de frutas, raíces o tubérculos, o la disminución de la vida productiva de la planta probablemente no se notan o se atribuyen a factores culturales o ambientales, especialmente si todas las plantas del cultivo están infectadas de modo uniforme y no existen ejemplares sanos para compararlas.

Un método para controlar las virosis que afectan las especies de propagación agámica consiste en establecer programas de producción, multiplicación y distribución de material vegetal libre de virus, de sanidad controlada, o libre de patógenos específicos. Este mismo método es válido para todos los patógenos que son sistémicos en sus hospedantes, como los hongos y las bacterias que invaden los tejidos de conducción.

Las técnicas empleadas para obtener el material madre o básico libre de patógenos son, principalmente, la termoterapia, la crioterapia, la quimioterapia, y el cultivo in vitro de meristemas apicales. Estas técnicas, que se pueden emplear individualmente o en combinación, se considerarán también en los Capítulos 11 y 36.

El material regenerado mediante cualquiera de esas técnicas debe ser probado para saber si ha sido eliminado el patógeno considerado (virus, viroides, bacterias, hongos, etc). Estas pruebas han sido denominadas 'indización' (indexing, en la literatura inglesa) y son de distinta índole según la combinación hospedante-patógeno; en algunos casos son específicas, es decir, referidas a un solo patógeno, y en otros permiten la detección simultánea de diferentes patógenos. No existe, sin embargo, una técnica que permita asegurar la ausencia de todos los virus que pueden infectar las plantas; de ahí que el término 'libre de virus' debe entenderse como libre de los virus conocidos o descritos, o bien libre de aquéllos que la prueba es capaz de evidenciar. Más aún, todos los métodos empleados están diseñados para detectar la presencia de patógenos en una planta; la ausencia de 'reacción' permite suponer que esa planta no los posee, y el rigor con que se repitan las pruebas y se alternen distintos métodos establecerá el grado de garantía con que se respalde la sanidad del material obtenido.

Los métodos de detección de virus y viroides son diferentes de los empleados para bacterias y hongos sistémicos y serán considerados por separado. Los virus se identifican mediante técnicas adecuadas; en cambio, los organismos que pueden ser aislados y cultivados in vitro se identifican por medio de prácticas comunes de microbiología. Las bacterias cuyo aislamiento aún no ha sido posible, como sucede con algunos *Mollicutes* (diversos micoplasmas), se detectan con técnicas empleadas en fitovirología.

Algunas de las pruebas que se describirán a continuación pueden realizarse a partir de fragmentos del material cultivado in vitro (hojas, tallos o trozos de callo). De obtenerse un resultado negativo, se puede inferir que el cultivo estudiado y toda su descendencia producirán plantas carentes de esos patógenos; en otros casos no es posible inferirlo porque se requiere tejido en mayor cantidad o de más consistencia, y porque las pruebas deben hacerse partiendo de plantas cultivadas en macetas. Si se prueba que esas plantas están libres del patógeno, pueden emplearse como plantas madre para proceder a multiplicarlas por el método más conveniente.

Los métodos señalados en la literatura han sido aplicados, generalmente, a situaciones específicas, es decir, para detectar un determinado patógeno en un hospedante. Por ello resulta inadecuado intentar una clasificación de los mismos. Parece más indicado hacer una descripción de las principales técnicas empleadas y luego dar algunos ejemplos de su empleo, referidos a diferentes especies de plantas y a patógenos de distintos tipos como virus, viroides, bacterias y hongos (Cuadro 30.1).

DetECCIÓN DE VIRUS

Los métodos de detección de virus van, en orden de complejidad, desde la simple observación de síntomas, su transmisión y el empleo de hospedantes diferenciales, al serodiagnóstico y la visualización del patógeno en el microscopio electrónico. El empleo de una u otra técnica dependerá de las posibilidades de cada laboratorio, del tipo de patógeno, y del número de plantas que sea necesario estudiar.

Selección visual

Se basa únicamente en la observación de síntomas para eliminar las plantas con manifiesta infección viral. Es un método muy impreciso e induce a frecuentes errores ya que en ocasiones se eliminan plantas que,

Cuadro 30.1. Los elementos de una prueba de detección de virus: hospedante, método, planta indicadora y patógeno.

Hospedante	Patógeno ^a	Método ^b	Planta indicadora	Referencias
<i>Citrus sinensis</i> (naranja y otros cítricos)	<i>S. citri</i>	ELISA	—	Remah et al., 1981
	CTV	ELISA	—	Clark et al., 1977a Bar-Joseph et al., 1979a
<i>Chrysanthemum morifolium</i> (crisantemo)	ChSV	IC	<i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. Blanche	
	ChMV	IC	<i>Ch. morifolium</i> cv. Fanfare	
	ChCMV	IC	<i>Ch. morifolium</i>	
	ChTAV	TM	<i>Nicotiana tabacum</i> Samsum	Ben-Jacob et al., 1973
	ChVB	ELISA TM; ME	<i>Petunia hybrida</i>	Koenig et al., 1979 Hollings, 1972
<i>Dianthus caryophyllus</i> , <i>Dianthus barbatus</i> (clavel)	CaMV	ELISA TM	-	
	CaRSV	TM; S	<i>Chenopodium quinoa</i>	Devergne et al., 1982
	CaVMV	TM	<i>Ch. amaranticolor</i>	
	CaERV	TI	<i>Dianthus caryophyllus</i> cv. Joker	Houten et al., 1968
	CaLV	TM; S	<i>Ch. amaranticolor</i> , <i>Ch. quinoa</i>	
<i>Fragaria x ananassa</i> (frutilla, fresa)	SMV	TI	<i>Fragaria vesca</i> UC-5	Frazier, 1974a y 1974b
	SMYV		<i>Fragaria vesca</i> UC-6	
	SVBV		<i>F. virginiana</i> UC-10	
	SCV		<i>F. virginiana</i> UC-11	
	SLCV		<i>F. virginiana</i> Alpine	

(Continúa)

Cuadro 30.1. Continuación.

Hospedante	Patógeno ^a	Método ^b	Planta indicadora	Referencias
<i>Ipomoea batatas</i> (batata, camote)	SPVMV	TI	<i>Ipomoea setosa</i>	Nome et al., 1980a
	SPFMV	TI	<i>I. setosa</i>	Aiconero et al., 1975
<i>Manihot esculenta</i> (yuca)	CsXV	ELISA, dsRNA	—	Notk, B. y Pineda, B. (CIAT, comunicación personal)
	CMV	TI, dsRNA	<i>M. esculenta</i>	idem
	FSD	SV, TI	<i>M. esculenta</i>	idem
	CCMV	ELISA, dsRNA	—	idem
	ACMV	TM, ELISA, HAN	<i>N. benthamiana</i>	idem
<i>Persea americana</i> (palta)	ASBV	TI	<i>Persea americana</i> cv. Collinson	Graça et al., 1981
	ASBV	HAN EGP	—	Palukaitis et al., 1981 Utermohlen et al., 1981
<i>Prunus</i> spp. (duraznero, almendro, cerezo, ciruelo, etc.)	PRSV	TI; ELISA; TM	<i>Prunus serrulata</i> cv. Shiro fugen	
	PDV	TI; TM	<i>Cucumis sativus</i>	Barbara et al., 1978
	PLPV	TI; TM	<i>Momordica balsamina</i>	Fridlund, 1976
			<i>Prunus hybridus</i> cv. Schiroplum	Nyland et al., 1976
	ChLRV	S; TM	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	Cropley et al., 1971
<i>Saccharum</i> spp. (caña de azúcar)	SucMV	S; TM	<i>Sorghum bicolor</i> cv. Atlas	Pirone, 1972

(Continúa)

Cuadro 30.1. Continuación.

Hospedante	Patógeno ^a	Método ^b	Planta indicadora	Referencias
<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	PVA, PVM	SV; S	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Salazar, 1982
	PVS, PVX	TM	<i>Physalis floridana</i>	Fernández-Valiela, 1969
	PVY, PVT	ELISA	<i>Gomphrena globosa</i>	Casper, 1977
	PLRV, APLV	TM	<i>Nicotiana debneyi</i>	Wooster, 1981
		ME	<i>N. clevelandii</i>	Jones, 1981 Stace-Smith et al., 1968 Wetter, 1972
	PSTV	TM; HAN; EG	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Salazar, 1982
<i>Vitis vinifera</i> (vid)	GFLV	TM; TI	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Hewitt et al., 1970
			<i>C. quinoa</i> ; <i>Vitis vinifera</i>	
		ELISA	<i>V. rupestris</i>	Ramsdell et al., 1979
	Nepovirus	TM	<i>Ch. quinoa</i>	Vetten, 1981
	PDB	ELISA	-	Nome et al., 1980b

a. El nombre completo del patógeno figura en el Apéndice C.

b. TI = transmisión a planta indicadora mediante injerto; TM = transmisión mecánica a plantas indicadoras; SV = observación de síntomas; HAN = hibridación de ácidos nucleicos; ME = observación al microscopio electrónico; IC = injerto de callo en planta indicadora; S = cualquier método serológico a excepción de ELISA; EG = electroforesis en gel; EGP = electroforesis en gel de poli(acrilamida); ELISA = prueba inmunoenzimática (enzyme-linked immunosorbent assay); dsRNA = prueba del ARN de doble hebra.

por efecto de tratamientos previos en el medio de cultivo o por causa del ambiente, presentan anomalías fisiológicas reversibles. A la inversa, debido a los fenómenos de enmascaramiento de síntomas o de recuperación temporal, o por acción de los llamados virus latentes, es posible conservar plantas que efectivamente estén infectadas.

Sin embargo, es éste un método de detección de patógenos empleado con éxito en algunos cultivos, cuando no se han implementado otras técnicas más refinadas. Por ejemplo, el virus del estriado amarillo del ajo (Garlic Yellow Stripe Virus) induce en ciertos cultivares de ajo síntomas conspicuos, principalmente en condiciones de baja temperatura; en casos como éste, el conocimiento de la especie, del virus, y de la enfermedad permiten asegurar cierta confiabilidad al método (Nome et al., 1981).

Empleo de hospedantes indicadores

Algunos virus pueden ser transmitidos a plantas indicadoras por medio del jugo infeccioso extraído de plantas enfermas; ésta es la prueba más simple y más fácil de realizar. La técnica se conoce como 'transmisión mecánica' y consiste en tomar un fragmento de la planta que se desea probar (de las hojas nuevas, de los elementos florales, o de las raíces) y macerarlo en un mortero agregando un tampón (buffer) adecuado (generalmente fosfato 0.01-0.05 M de pH 7.0) y otros preservativos químicos apropiados. El material macerado se filtra a través de gasa y se aplica suavemente sobre las hojas de las plantas indicadoras que han sido previamente espolvoreadas con un abrasivo como Carborundum 400-600 o Corundum. La aplicación del extracto puede hacerse con los dedos, con espátulas de vidrio, con pincel, con gasa, o con cualquier elemento apropiado.

Las hojas inoculadas se lavan inmediatamente o se secan con papel filtro o con toalla de papel. La penetración del virus es instantánea en las células heridas por el abrasivo y el efecto del lavado es simplemente eliminar residuos que puedan obstaculizar la observación posterior de los síntomas. Las plantas se observan durante varios días hasta constatar la aparición de los síntomas propios de la infección viral. Cuando éstos se manifiestan como lesiones en el lugar de la inoculación, ya sea del tipo necrótico o clorótico, suelen presentarse entre los 4 y 10 días posteriores a la inoculación; cuando los síntomas esperados son del tipo sistémico (mosaico, deformaciones en las hojas, ampollas, etc.) su aparición es más lenta: suele demorar de una a varias semanas en las plantas herbáceas y de varios meses a años en las plantas leñosas. Las plantas que se usan como indicadoras

son o bien variedades muy susceptibles de la misma especie estudiada o bien otras especies que desarrollan síntomas característicos en el menor tiempo posible (Cuadro 30.1). Los síntomas inducidos en las especies indicadoras ayudan a identificar el virus involucrado (o más de uno, si los hay).

El injerto en plantas indicadoras apropiadas permite detectar virus que no son trasmisibles mecánicamente o aquéllos que son difíciles de transmitir por la presencia de inactivadores o inhibidores virales en las plantas hospedantes. Los injertos pueden hacerse entre plantas herbáceas, o entre herbáceas y leñosas, y no es necesario, aunque sí conveniente, que el injerto prenda de modo permanente. El contacto entre los tejidos del injerto y del portainjerto debe ser suficiente para permitir el paso del virus de uno a otro. Los métodos más comunes incluyen el injerto de púa, de yemas, de trozos de corteza, la aproximación de tallos con diversas formas de empalme, y en algunos casos, la aproximación de pecíolos de hojas. Las plantas indicadoras adecuadas para detectar los virus en las especies más estudiadas (papa, frutilla, batata, yuca, ornamentales, frutales, etc.) se encuentran ampliamente descritas en la literatura. No obstante, cualquier variedad o especie que exhiba buenos síntomas, según la experiencia particular de cada investigador, puede ser empleada exitosamente como indicadora.

Métodos serológicos

Una gran variedad de métodos se emplean en la detección e identificación de virus y bacterias fitopatógenos. Todos se basan en la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual un anticuerpo reconoce y se combina sólo con la porción de antígeno que le dio origen (p. ej., secuencia de aminoácidos de una proteína) o con otra muy semejante. La mayoría de los virus poseen proteínas que son inmunogénicas, es decir, que inyectadas en un animal de sangre caliente estimulan la producción de anticuerpos. El suero de la sangre que contiene anticuerpos se denomina 'antisuero' o 'suero-anti' y al mezclarlo con su antígeno respectivo produce reacciones que se pueden visualizar de diferentes maneras. Esta es la base del serodiagnóstico.

Los diferentes métodos serológicos poseen características que limitan su empleo cuando se dan determinadas condiciones. Los de más amplia aceptación —que describiremos a continuación— son los de difusión en agar, de microprecipitación, de floculación de látex sensibilizado, y los inmunoenzimáticos (ELISA). Algunas consideraciones generales, aplicables a cualquiera de ellos, se refieren a la forma de procesar la muestra que

contiene el probable antígeno (jugo de la planta infectada), al empleo de controles o testigos adecuados, y a las diluciones con que se empleen tanto el antígeno como el suero-anti (Ball, 1974; Shepard, 1972).

- El jugo de la planta se obtiene por maceración del fragmento vegetal en mortero o por medio de cualquier prensa adecuada. Se denomina 'jugo crudo' si tan sólo se filtra el macerado en una gasa. Este jugo contiene restos de pared celular, epidermis, cloroplastos, etc. En cambio, se dice que el extracto está 'clarificado' si se eliminan esos elementos por centrifugación (3,000g a 10,000g) durante 5 a 15 minutos. De los métodos aquí señalados, sólo el de microprecipitación requiere el empleo de jugo clarificado, que es optativo para el de floculación de látex.
- En todas las pruebas es imprescindible incluir como testigos extractos de plantas enfermas y sanas de la misma especie, obtenidos en forma idéntica que los de las muestras que se estudian. Estos dos testigos permiten establecer los límites de las reacciones positivas y negativas. Además, conviene incluir un control adicional correspondiente al 'suero normal', es decir, sueros sin anticuerpos específicos del antígeno que se está probando, obtenidos de un animal antes de inmunizarlo. Estos controles están destinados a evitar confusiones frente a reacciones no específicas, como las que ocurrirían con proteínas normales de la planta o con otros componentes del suero.
- Las reacciones en que ocurre una precipitación necesitan que tanto el antígeno como el anticuerpo se encuentren en proporciones equivalentes. Si éstas no se han determinado, conviene considerar más de una reacción por elemento reaccionante. El título de un antisuero es la máxima dilución del mismo que permite obtener reacciones frente a un antígeno determinado; la 'dilución de empleo' es aquella que permite obtener reacciones fuertemente positivas en el menor tiempo posible. Ambas suelen indicarse en los antisueros que se comercializan o que se tipifican para un trabajo determinado.

Doble difusión en agar. Si se colocan el antígeno y el antisuero homólogo en celdillas enfrentadas hechas en un medio agarizado, se difunden en el medio a una velocidad determinada tanto por la concentración, la densidad, y la composición del agar como por ciertas propiedades de los elementos reaccionantes, como el tamaño y la forma del antígeno.

Cuando el antígeno y el anticuerpo se encuentran en proporciones equivalentes en el agar, se producen zonas de precipitación en forma de bandas o líneas. La prueba es aplicable a la identificación de virus, partiendo de savia cruda o clarificada o de virus purificado. No hay inconveniente en el empleo de antisueros que reaccionen con proteínas normales

de la planta dado que, en general, las líneas de precipitación que producen no coinciden con las del virus.

El medio para realizar la prueba se obtiene fundiendo agar en una solución salina (NaCl 0.85%) o en cualquier tampón apropiado (TRIS, PBS) con pH cercano a la neutralidad, que además contenga azida sódica al 0.2% como biocida. El agar debe ser de extrema pureza por lo cual se suele emplear Oxoid Ionoagar no. 2 o Agarosa en concentraciones de 0.5% a 0.9%. Una vez fundido el agar, ya sea en autoclave durante 15 minutos (Ionoagar) o en un plato caliente (Agarosa), se vierte en una caja Petri de plástico la cantidad suficiente para formar una capa de 2 mm de espesor (aproximadamente 12 ml para una caja de 100 mm de diámetro) y se deja solidificar sobre una superficie plana. Si no hay cajas de plástico, se emplean las de vidrio teniendo la precaución de recubrir su fondo con una sustancia hidrofóbica como el Formvar (0.1% a 1% en cloroformo) a fin de evitar que las gotas escurran entre el agar y el vidrio (Ball, 1974).

El gel de agar forma poros de tamaño variable según la concentración y el tipo de agar empleado. En muy bajas concentraciones (0.3%) forma poros de alrededor de 780 nm (Aekers et al., 1962) que permiten la difusión de virus alargados hasta de 650 nm. En una concentración del 1%, se difunden en el gel virus poliédricos de alrededor de 30 nm. En concentraciones intermedias permiten el desplazamiento de virus de tamaños intermedios (Noordam, 1973); aquéllos de partículas mayores, como los pertenecientes al grupo de los Potyvirus, deben ser degradados a unidades menores o directamente a subunidades proteicas antes de ser probados por este método (Shepard, 1972). Organismos como las bacterias del xilema deben ser desintegrados mediante ultrasonido para permitir la difusión en agar de los diversos compuestos antigénicos que poseen.

Las celdillas se marcan con un sacabocados o con moldes preparados para este propósito, y el agar sobrante se retira mediante succión con pipeta. La forma más frecuente de celdilla es la circular; en ésta, una celdilla de 4 a 8 mm de diámetro está rodeada de otras, en número variable, de igual o menor diámetro (4 a 6 mm). Generalmente, la celdilla central se emplea para colocar el antisuero y las periféricas para las muestras de antígenos. La distancia comúnmente empleada entre celdillas de antisue-ros y antígenos es de 4 a 5 mm, medida entre los bordes más cercanos de ambas. Los reactivos se colocan con jeringas provistas de agujas finas o bien con pipetas de punta fina, evitando esparcir los reaccionantes sobre el agar. La caja Petri se debe mantener en una cámara húmeda durante una o dos semanas y las observaciones se hacen diariamente. Es conveniente observar las bandas o líneas que se formen en una habitación oscura, sobre

un fondo negro, y con luz indirecta emitida desde abajo por un tubo fluorescente circular o por una lámpara puntiforme (Figura 30.1, A).

Microprecipitación. Esta prueba se realiza en cajas Petri plásticas, o en cajas de vidrio recubiertas con Formvar (0.1% a 1.0 % en cloroformo) u otra sustancia hidrofóbica; en ellas se colocan y se mezclan pequeñas gotas de antisuero y antígeno en diversas concentraciones. Las gotas se recubren totalmente con un aceite mineral liviano (p. ej., vaselina líquida) y se observan después de dos horas a temperatura ambiente —y al día siguiente, si se las mantiene a baja temperatura— para detectar la presencia de un precipitado. Debe emplearse un extracto clarificado, ya sea por centrifugación o mediante el empleo de solventes orgánicos como cloroformo, éter o butanol; en este último caso es conveniente dializar el extracto clarificado para remover cualquier residuo de solvente.

En este procedimiento es conveniente dibujar con lápiz de cera en el fondo de la caja Petri un reticulado para demarcar la ubicación de las gotas; la dimensión de los cuadrados dependerá del tamaño de la gota que se pueda obtener. En cada cuadrado se coloca una pequeña gota de antisuero en la concentración que se ha establecido previamente como óptima, y a su costado una de antígeno. Las gotas del antígeno (jugo de la planta) corresponden a una serie de diluciones efectuadas previamente. Como se indicó antes, se mezclan las gotas, se cubren con aceite mineral o vaselina líquida, y se dejan en incubación para hacer las lecturas. La observación se puede hacer al microscopio en campo oscuro con 50X o con una lupa iluminada desde abajo. Es muy importante incluir los testigos sanos y enfermos con el fin de comparar reacciones positivas y negativas. Los precipitados obtenidos por esta prueba difieren según el tipo de virus: en los de partículas alargadas, el precipitado aparece en forma de nubes; en los icosaédricos, en cambio, es granular. En algunos casos se observan precipitados no específicos, generalmente de fosfato de calcio, cuando se emplean plantas con altos contenidos de calcio; este resultado puede evitarse precipitando el calcio con un exceso de fosfato u oxalato de calcio antes de la clarificación por centrifugación (Noordam, 1973; Ball, 1974).

Floculación de látex sensibilizado. Este método es semejante al de microprecipitación con la diferencia de que emplea partículas de látex de tamaño uniforme (Látex 0.81 μ , Difco Laboratories, y Colab Laboratories Inc.) recubiertas por los anticuerpos correspondientes al virus que se determinará. La sensibilización del látex se realiza mezclándolo con la gammaglobulina purificada del antisuero. Al ponerlas en contacto con el antígeno respectivo, las partículas de látex se agregan originando precipitados visibles a simple vista o con microscopio (Figura 30.1, B). Este

método es 100 a 1000 veces más sensible que el de microprecipitación. Los detalles de su implementación se describen en el ejemplo B., en la sección **Aplicaciones** al final de este capítulo.

Pruebas inmunoenzimáticas (ELISA). La prueba inmunoenzimática ELISA ('enzyme-linked immunosorbent assay') es de gran sensibilidad y permite detectar cantidades pequeñísimas de antígeno, o de anticuerpos, en situaciones en que la mayoría de los otros métodos serológicos fracasan. Además, permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Fue desarrollada en 1971 para emplearla en medicina y adaptada en 1977 a la patología vegetal, en especial para la detección de virus en plantas.

La prueba se basa en que tanto el antígeno como el anticuerpo pueden acoplarse (conjugarse) a una enzima sin que pierdan antigenicidad o capacidad de reacción enzimática. Existen varias versiones de la prueba, pero la más común en fitopatología, en especial tratándose de virus de plantas, es la llamada 'sandwich de anticuerpos' (Clark et al., 1977b). La prueba se realiza sobre soportes sólidos de diversos tipos siendo los más empleados las placas o cajas de plástico de microtitulación que, en un modelo común, poseen 96 celdillas con fondo plano o en forma de U. El primer paso consiste en recubrir (sensibilizar) la superficie de las celdillas del plato con una capa de anticuerpos; para ello, en cada una se coloca una alícuota de gammaglobulina purificada de un determinado suero. El plástico adsorbe pasivamente los anticuerpos en forma irreversible; para eliminar el exceso no adsorbido, se lava el plato con un bófer de fosfato salino (PBS) que contiene además un detergente no iónico. Se procede, en una segunda etapa, a colocar la muestra problema (el antígeno) que en este caso es el jugo de planta que se analiza; si en este jugo existe el antígeno específico que originó los anticuerpos adsorbidos, se producirá la unión antígeno-anticuerpo. Se lava nuevamente el plato para eliminar el exceso de jugo y de antígenos y se procede, en una tercera etapa, a agregar los mismos anticuerpos usados en la primera pero conjugados con una enzima; si el antígeno ha sido fijado, el conjugado se le unirá completando el 'sandwich' de anticuerpos. Las enzimas que se emplean con más frecuencia en esta prueba son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa.

La última etapa de la prueba consiste en la adición del sustrato. Cuando en las etapas anteriores se ha logrado establecer la cadena 'anticuerpo-antígeno-conjugado', la enzima del conjugado actuará sobre el sustrato modificando su color y señalando una reacción positiva. En el caso de la fosfatasa alcalina, el sustrato usado es p-nitrofenilfosfato que, por hidrólisis, da un compuesto de color amarillo que presenta un pico de absorción en 405 nm. La intensidad del color es un índice de la cantidad de antígeno

presente en la muestra; la lectura final se puede realizar a simple vista o midiendo la absorbancia en un fotómetro calibrado a 405 nm (Figura 30.1, C). Como se ha recomendado para otros métodos, es importante incluir una muestra con el antígeno o control positivo (virus o antígeno purificado, jugo de la planta enferma) y un testigo correspondiente al jugo de la planta sana o control negativo. Estos testigos permiten seguir la marcha de la reacción y detectar las anomalías que pudiesen presentarse.

Las enzimas que se empleen deben ser suficientemente estables, de gran capacidad de reacción, y fáciles de conseguir; además, deben actuar sobre un sustrato de características parecidas, que dé origen a un producto final de color diferente. La gran sensibilidad del método se basa, justamente, en el efecto amplificador de estas enzimas que en pequeñas cantidades son capaces de modificar una gran cantidad de sustrato.

Considerando que ELISA es un método cuantitativo, técnicamente todas las muestras que den una coloración más intensa que el control negativo debieran ser positivas; sin embargo, se considera también que hay variación en los valores de absorbancia de los controles negativos, y por ello se han hecho varias sugerencias para establecer el límite entre negativo y positivo. En una de ellas se propone emplear el doble de la desviación estándar de los controles sanos; en otra, emplear el doble del promedio de estos controles o bien agregar 0.05 a ese promedio.

Teniendo en cuenta que este método es uno de los de mayor valor en la detección de virus de plantas, los detalles de su manejo se indican en la sección **Aplicaciones** de este capítulo.

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica constituye un recurso valiosísimo en la detección de virus y *Mollicutes* (*Micoplasmas* y *Syproplasma*s) en plantas. Se puede emplear en cualquier etapa del cultivo in vitro de tejidos, desde el incipiente desarrollo de un explante hasta la planta desarrollada fuera del medio de cultivo.

Las técnicas en uso y su grado de complejidad son variados; por tanto, su elección estará directamente condicionada por las posibilidades técnicas del laboratorio. La ausencia de un microscopio electrónico en el sitio de trabajo no es un factor limitativo porque los 'preparados' se pueden enviar a otro centro que posea el microscopio.