

Capítulo 38

Detección de viroides y virus con técnicas de ADN recombinante

L. F. Salazar*

* Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

Introducción

Aun cuando las técnicas inmunológicas (e.g., ELISA) han demostrado alta sensibilidad para el diagnóstico de virus en las plantas, no son aplicables a la detección de viroides o de ciertos virus cuya entidad infectiva ocurre naturalmente como ácido nucleico desprovisto de la cubierta proteínica. Asimismo, la dificultad de producir antisueros para algunos virus —ya sea por la inestabilidad de sus partículas, por su íntima asociación con ciertos tejidos u orgánulos del huésped, o por su baja concentración— limitan el valor de la serología en esos casos.

Recientemente, los avances logrados en la investigación de los ácidos nucleicos han mejorado las técnicas de hibridación de moléculas complementarias ADN-ADN y ARN-ADN. La capacidad de hibridación de los ácidos nucleicos complementarios es la base para desarrollar métodos de diagnóstico de viroides y virus. Para facilitar la aplicación del método, el ácido nucleico que debe detectarse se fija a un soporte sólido (filtro o membrana) para que la sonda ('probe') en solución pueda hibridarse sobre ese ácido nucleico ya fijado en la membrana. Por esta razón la técnica se conoce también como gota adsorbida ('dot blot'). El desarrollo y la aplicación de esta técnica se describen en el presente trabajo.

Detección del PSTV por Hibridación de Ácidos Nucleicos

La detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV) mediante ensayos de infectividad en tomate (Raymer y O'Brien, 1962) o por electroforesis (Morris y Wright, 1975) en geles de poliacrilamida es muy laboriosa, poco sensitiva y costosa; por consiguiente, el diagnóstico del PSTV constituye un ejemplo de la necesidad de aplicar las nuevas técnicas del ADN recombinante. Estas técnicas son de especial valor cuando se aplican a plántulas provenientes del cultivo de tejidos. La técnica, en general, está basada en la hibridación de un ADN complementario del PSTV (PSTVcADN) estando el PSTV adherido a un soporte sólido. Cuando el PSTVcADN es altamente radioactivo, los híbridos ADN-ARN pueden detectarse por autoradiografía (Owens y Diener, 1981). Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar un 'marcador' no radioactivo (Langer et al., 1981), aunque los intentos iniciales de usarlo en el CIP no han sido del todo satisfactorios (CIP, 1983).

Construcción de sondas PSTVcADN y clonamiento molecular

El clonamiento molecular y la caracterización del PSTVcADN de doble cadena (ds) se hizo más fácil cuando se conoció la secuencia del ARN del PSTV (Gross et al., 1978). Posteriormente, un dsPSTVcADN fue sintetizado e insertado en el sitio específico para la endonucleasa Pst I del plásmido pBR322. Todos los clones recombinantes obtenidos por este sistema contenían una copia incompleta del PSTV (Owens y Cress, 1980). Los análisis en que se empleaban enzimas de restricción sugirieron que dos clones (pDC 22 y pDC 29) tenían secuencias parcialmente traslapadas; por ello fueron combinados para intentar la construcción de un clon que tuviese la longitud total del PSTV. El nuevo fragmento fue clonado en el plásmido pBR322 y los clones resultantes demostraron (Diener et al., 1982) que contenían la longitud y la secuencia del PSTV (dsPSTVcADN). Este ADN se mantiene en el plásmido pBR322, y después de purificarlo de la bacteria *E. coli*, se marca con ^{32}P y se utiliza para detectar el PSTV.

Diagnóstico del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos

El procedimiento para el diagnóstico del PSTV en tejido vegetal (Sala-zar et al., 1983) se ha esquematizado en la Figura 38.1.

Reactivos y materiales. Se necesitan los siguientes elementos:

1. Sonda PSTVcADN marcada con ^{32}P mediante síntesis de reparación; los detalles para la extracción y el marcado de la sonda están ampliamente difundidos (Maniatis et al., 1982).
2. Membranas de nitrocelulosa; ej: BA85 (Schleicher & Schuell, New Hampshire, USA).
3. Reactivos indicados en el procedimiento.
4. Materiales para autoradiografía.

Homogeneización de la muestra. El bófer utilizado tiene, relativamente, una alta concentración iónica que permite la liberación del PSTV-ARN del núcleo, en tanto que el dietilditiocarbamato (DIECA) y el ditiotreitól (DTT) inhiben la oxidación enzimática de los polifenoles. Hay varias alternativas para homogeneizar el tejido; se pueden utilizar homogeneizadores cónicos de vidrio, morteros, o pequeñas bolsas de plástico. Este

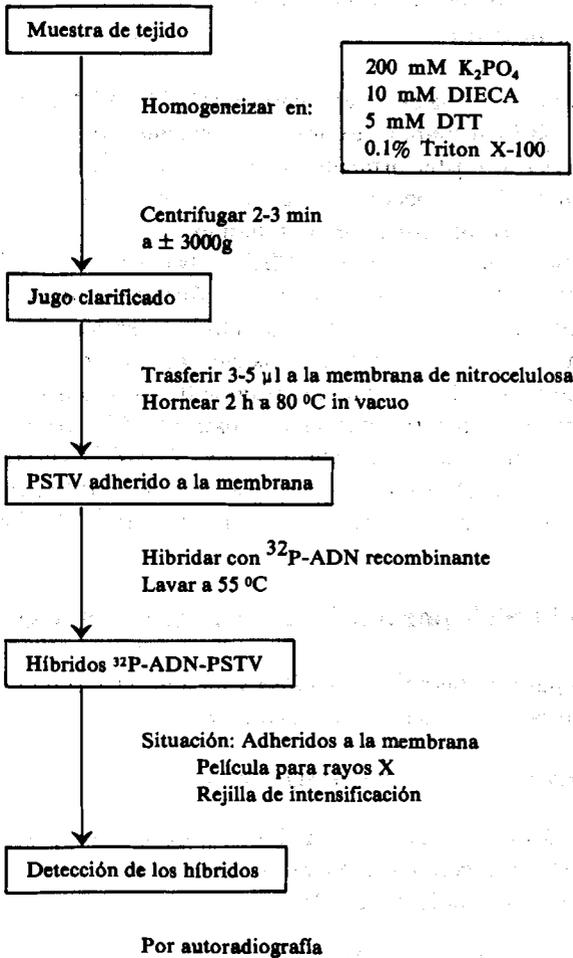


Figura 38.1. Esquema del procedimiento de detección del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos.

último recurso, bastante simple, evita el uso de gran cantidad de material de vidrio y, lo que es más importante, reduce la posibilidad de contaminar el tejido.

La cantidad de bófer que se utilizará depende del material que se prueba y de la sensibilidad del sistema, la cual se determina generalmente probando una serie de diluciones. En el CIP se utilizan de 1 a 1.5 ml de buffer

por gramo de tejido (hojas, tubérculos o brotes de tubérculos) ó 0.2 ml por cada 20 ó 30 semillas. La clarificación por centrifugación (2000-3000 rpm) es conveniente pero no absolutamente necesaria.

Trasferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa. De cada muestra, una gota de 3 a 5 μ l del extracto se coloca cuidadosamente en la membrana de nitrocelulosa. Para identificar la posición de cada muestra se toma como referencia una de las esquinas de la membrana (un pequeño corte es suficiente). Las membranas que ya contienen las muestras deben secarse en un horno, preferiblemente al vacío, a 80 °C durante 2 horas.

Hibridación. La reacción de hibridación se puede realizar como se describió anteriormente (Wahl et al., 1979). La prehibridación no parece tener un efecto marcado y puede remplazarse por un breve mojado de la membrana en el buffer de hibridación (5-10 min a 20-25 °C). El bófer de hibridación está compuesto de formamida 40% (v/v), NaCl 0.18M, cacodilato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, dodecilsulfato de sodio 0.1%, y 400 μ g/ml de ARN de trasferecia obtenido de levadura; el pH del bófer es 7.0. La hibridación tarda 24 horas a 55 °C en el bófer de hibridación que contiene 10% de sulfato de dextrano y PSTVcADN marcado con ³²P por medio de síntesis de reparación (1 a 2.5 x 10⁶ cpm/ml). La relación entre el volumen del bófer y el área de la membrana es de 1 ml por cada 35 cm². El PSTVcADN marcado se desnaturaliza por calentamiento durante 2 min a 100 °C en presencia de 50% de formamida, antes de añadirlo a la reacción de hibridación.

Autoradiografía. Las membranas se lavan a 55 °C con cinco cambios de un tampón de NaCl 0.36 M, Tris-HCl 10 μ M (pH 7.5), y dodecilsulfato de sodio 0.1%. Dos lavados adicionales con el mismo tampón diluido 10 veces son también necesarios.

La autoradiografía se genera en un lapso de 24 a 48 hr a -70 °C utilizando película apropiada para autoradiografía, por ejemplo Kodak X-Omat, y rejillas de intensificación como las Dupont Cronex Lightning-Plus. El proceso es muy simple: sólo requiere asegurar la membrana, la rejilla de intensificación y la película, y envolver el conjunto con papel de aluminio.

Lectura e interpretación de los resultados. Los resultados son observables normalmente a simple vista; sin embargo, las muestras que contienen una baja concentración del viroide reaccionan muy levemente. Estas reacciones son más fácilmente distinguibles si se observan los negativos ligeramente inclinados o sobre una mesa iluminada con fondo claro. Bajo las

condiciones del CIP y de Beltsville, Estados Unidos, este proceso es altamente sensitivo: hasta 10 veces más, por lo regular, que la electroforesis en geles de poliacrilamida.

En la Figura 38.2 se observa una serie de extractos de semillas infectadas y sanas en las cuales el PSTV ha sido diagnosticado por hibridación de ácidos nucleicos.



Figura 38.2. Resultados de una prueba típica para la detección del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos. S = muestra de semilla botánica de papa libre de PSTV (20 semillas en 0.2 ml de bófer). I = siete lotes de semilla botánica de papa infectada con el PSTV.

Otros Usos Posibles del Método de Hibridación

Este método sería muy útil para diagnosticar, además de los viroides, los virus convencionales para los cuales las pruebas inmunológicas no sean prácticas. Asimismo, los virus con partículas lábiles o aquéllos cuyas cubiertas proteínicas son muy poco antigénicas podrían detectarse fácilmente con este sistema. Evidentemente, no se requiere de una sonda que contenga la secuencia completa del virus que se diagnostica, sino de una que sea suficientemente específica y alcance, por lo menos, la sensibilidad de detección de métodos inmunológicos como ELISA. La ventaja de la aplicación de esta técnica ha sido demostrada con el 'tobacco rattle virus', el cual ocurre a menudo como ácido nucleico sin cubierta proteínica (Harrison y Robinson, 1982). En otros virus, a los cuales los métodos inmunológicos son fácilmente aplicables (Palukaitis y Symons, 1980), este método parece tener un gran valor para identificarlos y para determinar relaciones entre ellos y sus cepas. Sin embargo, no se ha demostrado aún su aceptación como criterio de diferenciación.

La aplicación de esta técnica para evaluar plántulas que posean resistencia a los virus ya ha sido mencionada¹ aunque los detalles del proceso no

1. Flavell, R. B. Trabajo presentado en 'IARC's and Biotechnology', International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas, abril 1984.

han sido revelados. Puesto que el método sólo requiere pequeñas cantidades del tejido que se debe probar, la hibridación de ácidos nucleicos es de un valor incalculable para la detección de viroides y virus en plántulas provenientes del cultivo de tejidos. Es ella especialmente valiosa en el diagnóstico del PSTV tanto antes y después de cortar los meristemas como en plántulas provenientes de ellos durante el proceso de eliminación del viroide por tratamiento en frío (Lizárraga et al., 1980).

La eliminación del PSTV es muy difícil y laboriosa y requiere de un método como el antes descrito, que permita una detección temprana; ahorra también mucho tiempo, y reduce la posibilidad de contaminar tejidos sanos porque facilita la eliminación temprana del material afectado. Su sensibilidad asegura que el material seleccionado no contiene el viroide ni siquiera en concentración baja, condición en que es imposible detectarlo por métodos tradicionales como las plantas indicadoras (el tomate) o la electroforesis.

Diagnóstico de Virus por Determinación de Ácidos Nucleicos Virales

El método anteriormente descrito es aplicable a aquellos virus que pueden diagnosticarse construyendo —o de preferencia, clonando— una sonda específica y marcada. El clonamiento es un requisito indispensable para mantener una sonda de dsADN estable y en cantidades ilimitadas.

Hasta hace muy poco tiempo, en el diagnóstico de virus de plantas no se había estudiado el posible valor de los segmentos homogéneos de ARN de doble cadena (dsARN) que corresponden al doble del tamaño del genoma viral (ARN de una sola cadena, ssARN) y que siempre están presentes en plantas infectadas (Jordan y Dodds, 1983). Este dsARN, así como otros de menor tamaño cuya secuencia es homóloga a la del dsARN, son formas replicativas (RF) en el proceso de infección viral (Morris et al., 1983). Estos tipos de dsARN son altamente específicos y, además, no existe en las plantas sanas ningún otro dsARN de alto peso molecular; por tanto, aquéllos resultan de gran valor en el diagnóstico viral.

Para detectar infecciones virales puede aplicarse este método en varias formas:

- a. Determinando la presencia del dsARN mediante electroforesis, en geles combinados de agarosa y acrilamida, o por serología.

- b. Utilizando el dsARN como una sonda de sentido (+) o (-) para detectar el ARN de sentido opuesto (ej: el genoma viral ssARN) por hibridación in situ (en los geles).
- c. Usando sondas virales de ssARN (+) para determinar la presencia de cadenas de ARN (-).
- d. Construyendo sondas de DNA complementario empleando el dsARN como modelo.

El uso del dsARN como sonda marcada resultaría análogo al proceso de detección del PSTV y tendría gran aplicación especialmente en aquellos virus difíciles de purificar. En virus fácilmente purificables en grandes cantidades, la utilización de sondas de ssARN (viral) podría aplicarse siempre y cuando la purificación del ácido nucleico se realice cuidadosamente. En ambos casos, disponer de grandes cantidades del ácido nucleico para construir las sondas es un requisito indispensable que se puede satisfacer manteniendo hospedantes infectados con el virus que se probará.

Conclusiones

La técnica descrita en este capítulo es aplicable a cualquier situación donde sea necesario detectar agentes virales y subvirales. Por requerir sólo de pequeñas cantidades de tejido vegetal, es de un valor incalculable para eliminar patógenos en varias etapas del cultivo de tejidos.

Esta técnica se utiliza rutinariamente en algunos programas de producción de material vegetal básico libre de virus; sin embargo, las técnicas inmunológicas de uso extendido, especialmente ELISA, ofrecen alta sensibilidad y son fácilmente aplicables para detectar virus en pequeñas cantidades de tejido. Solamente en situaciones en que los virus que se deben detectar no pueden diagnosticarse por serología, las técnicas del DNA recombinante o la detección viral por procedimientos relacionados deberían considerarse y, eventualmente, implementarse.

Referencias

- CIP (Centro Internacional de la Papa). 1983. Annual report. Lima, Perú. 164 p.
- Diener, T. O.; Salazar, L. F.; Owens, R. A. y Cress, D. E. 1982. New potato spindle tuber test: Implications for the future. Proceedings of the International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 71-76.

- Gross, H. J.; Domdey, H.; Lossow, C.; Jank, P.; Raba, M.; Alberty, H. y Sanger, H. L. 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature (Londres)* 273:203-208.
- Harrison, B. D. y Robinson, D. J. 1982. Use of complementary DNA to detect tobacco rattle virus in potato foliage. *Proceedings of the International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.* p. 93-94.
- Jordan, R. L. y Dodds, J. A. 1983. Hybridization of 5'-end-labelled RNA to plant viral RNA in agarose and acrylamide gels. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:31-37.
- Langer, P. R.; Waldrop, A. A. y Ward, D. C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 78:6633-6637.
- Lizárraga, R. L.; Salazar, L. F.; Roca, W. M. y Schilde-Rentschler, L. 1980. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture. *Phytopathology* 70:754-755.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. 545 p.
- Morris, y T. J. Wright, N.S. 1975. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Am. Potato J.* 52:57-63.
- et al. 1983. Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:27-30.
- Owens, R. A. y Cress, D. E. 1980. Molecular cloning and characterization of potato spindle tuber viroid cDNA sequences. *Proc. Ntl. Acad. Sci. (E.U.)* 77:5302-5306.
- y Diener, T. O. 1981. Sensitive acid rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213:670-672.
- Palukaitis, P. y Symons, R. M. 1980. Nucleotide sequence homology of thirteen tobamovirus RNAs as determined by hybridization analysis with complementary DNA. *Virology* 107:354-361.
- Raymer, W. B. y O'Brien, M. J. 1962. Transmission of potato spindle tuber viroid to tomato. *Am. Potato J.* 39:401-408.
- Salazar, L. F.; Owens, R. A.; Smith, D. R. y Diener, T. O. 1983. Detection of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization: Evaluation with tuber sprouts and true potato seed. *Am. Potato J.* 60:587-597.
- Wahl, G. M.; Stern, J. y Stark, G. R. 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl paper and rapid hybridization using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 76:3683-3687.