

APLICACION DE LA TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION EN LA DETECCION DEL VIRUS X DE LA PAPA EN YEMAS DE TUBERCULOS ¹ *

*Carlos Ramírez Martínez**
y Rodrigo Gámez ****

ABSTRACT

Application of the hemagglutination technique for the detection of PVX in potato tuber eyes. An antiserum against Potato Virus X (PVX) was obtained after bleeding a horse that was previously injected with a series of highly purified PVX preparations. The antisera was then used in the inhibition of hemagglutination technique (IHT) which was then evaluated in its capacity to detect PVX infection in eyes of potato tubers. Glutaraldehyde-preserved sheep erythrocytes were sensitized with PVX after a tannic acid treatment. An evaluation was then made comparing the detection of PVS in sprouts and eyes of the same tuber half with that of the foliage of plants derived from the other corresponding tuber halves. Results showed that IHT in eyes detected infection of the virus in only 60% of the tubers that proved to be infected through the examination of shoots (IHT) and foliage (chloroplast agglutination). For more reliability in the detection of PVX in tuber eyes, the use of a more sensitive serological technique such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is suggested. The IHT is quite reliable when sprouts are examined.

INTRODUCCION

En la producción de semilla de papa certificada se deben obtener y mantener los tubérculos libres del virus X (VXP). Una de las prácticas más exitosas para obtener tubérculos libres de virus consiste en detectar y eliminar en el campo las plantas de papa infectadas con el VXP durante dos o tres ciclos de siembra sucesivos (21). Tanto en la identificación de las plantas infectadas, como en el control rutinario de los clones de papa libres de virus, se emplean con éxito plantas indicadoras (16, 21) y técnicas serológicas (6, 11, 27). Mediante el

uso de plantas indicadoras se puede detectar con gran sensibilidad la presencia del virus pero a un costo alto, de ahí que se prefiera el uso de los métodos serológicos en los programas de producción de semilla de papa (24, 27).

Para constatar la ausencia del VXP en un porcentaje alto de los tubérculos en semilla de alta calidad, se toma una muestra, se rompe el estado de reposo y se examinan los brotes o plántulas por la presencia del VXP, tarea que dependiendo del número puede ser costosa y ardua. Esta práctica se podría sustituir por un examen de las yemas mediante un método serológico adecuado, más barato y rápido que permitiría conocer la calidad de la semilla con suficiente antelación al ciclo de siembra siguiente. Dado que la concentración del virus en las yemas es sumamente baja (3) se requiere de técnicas serológicas muy sensibles para detectar el virus, tales como la aglutinación en sus diversas modalidades.

¹ Recibido para su publicación el 28 de agosto de 1980.

* Parte de la tesis de Magister Scientae presentada por el primer autor al Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica.

** Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

*** Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.

Para utilizar la sensibilidad de la aglutinación los virus de plantas, por su tamaño, han de acoplarse artificialmente a partículas tales como eritrocitos (1, 10, 22), partículas de látex (1, 4) o bentonita (17, 23).

Los eritrocitos se han empleado en la llamada hemaglutinación pasiva y en la inhibición de la hemaglutinación. En esta última, la más sensible, se adhiere el virus por métodos químicos a la superficie del eritrocito (sensibilización). En una primera etapa de la prueba se incuban los anticuerpos (presentes en el antisuero), a una concentración adecuada para producir la aglutinación de los eritrocitos sensibilizados, con los extractos de la planta en análisis. Si hay partículas virales presentes en el extracto reaccionarán con los anticuerpos neutralizándolos en tal forma que no ocurre aglutinación de los eritrocitos sensibilizados que se agregan en un segundo paso (prueba positiva). Al contrario, si en la muestra no hay partículas virales presentes, los anticuerpos quedan libres para reaccionar con las partículas virales presentes en la superficie de los eritrocitos, y ocurre aglutinación cuando los mismos se agregan (prueba negativa).

El presente trabajo informa del empleo de este último método en la detección del VXP en yemas de tubérculos.

MATERIALES Y METODOS

El inóculo de VXP se obtuvo de hojas de papa infectadas, colectadas en plantaciones comerciales de la zona de Cartago, cercana al Volcán Irazú, Costa Rica, determinándose la presencia del virus en ellas mediante pruebas de infectividad en *Gomphrena globosa* L. y mediante aglutinación de cloroplastos empleando antisuero específico (donado por el Dr. D. H. M. van Slogteren, Holanda).

La especie *Nicotiana tabacum* L. variedad "White Burley" fue utilizada para incrementar el virus.

Para la detección del VXP en yemas y brotes de tubérculos de papa se seleccionaron al azar 30 tubérculos que se partieron en mitades que se guardaron en bolsitas de papel debidamente identificadas. Luego fueron tratadas con ácido giberélico al 0,01% y Mertec® al 0,03% y Agrimicina® al 0,03%.

Cuando las yemas brotaron y la superficie inicialmente expuesta (al partirse el tubérculo) suberizó, un grupo de 30 mitades de tubérculo se trató con Maneb® y Timet® previo a su siembra en lote localizado en los predios de la Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, en una hilera y separadas 50 cm entre sí. Al mes de la siembra y cuando el follaje estaba aún pequeño se tomaron muestras foliares para las pruebas de aglutinación de cloroplastos (26). Con el otro grupo de 30 mitades de tubérculo se procedió como sigue. Con un sacabocados se obtuvieron las yemas de cada mitad, con o sin brote y se guardaron a -25 C en bolsas de plástico debidamente identificadas. Al efectuarse las pruebas de hemaglutinación se separaron las yemas sin brotar y las yemas con brote de cada mitad de tubérculo. Las yemas no brotadas se cortaron con 1 cm de tejido de tubérculo y de las yemas brotadas se dejó solamente el brote. El conjunto de yemas no brotadas y brotes de cada mitad de tubérculo se maceraron por separado en morteros estériles, agregando agua destilada en una relación aproximada de 3 partes de agua a una de tejido a macerar. El extracto obtenido se pasó a tubos de 13 x 100 mm que se calentaron a 60 C por 10 min y se centrifugaron a 10.000 g por 10 min. El extracto clarificado se recogió con pipetas Pasteur, se pasó a otros tubos para ser utilizado luego en las pruebas de inhibición de la hemaglutinación descritas más adelante.

El virus se purificó de acuerdo con los métodos utilizados por Shepard (25) y por Otsuki *et al* (20).

Para la preparación del antisuero contra el virus X se empleó un caballo. Su inmunización se inició con una dosis de 40 mg de virus purificado y emulsionado en coadyuvante de Freund completo (19), repartida en cuatro sitios diferentes mediante inyección subcutánea en los flancos. Mes y medio después se aplicó una dosis de refuerzo de 150 mg de virus emulsificado en alginato de sodio, la cual fue seguida de una segunda dosis de 15 mg.

Los eritrocitos se preservaron con glutaraldehído de acuerdo al método descrito por Bing *et al* (5) y seguidamente se trataron con ácido tánico según el método descrito por Daniel *et al* (12). El tratamiento con ácido tánico hace posible la adherencia de las partículas virales a la membrana del eritrocito (sensibilización).

Para sensibilizar con el VXP a las células tratadas con glutaraldehído se siguió la técnica descrita por Hirata y Brandriss(14). Los eritrocitos tratados con ácido tánico, se empaclaron y resuspendieron al 1% en soluciones tamponadas de acetato-salina 1:4, volumen/volumen (acetato de sodio 0,2 M, ácido acético glacial 0,2 M) a los pH de 4,0 y 5,0. A cada 10 ml de suspensión de células al 1% se añadió 1 ml de VXP purificado a las concentraciones de 1 y 0,5 mg/ml. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por una h y se lavó 5 veces con solución salina y finalmente se resuspendió al 1% en salina pH 7,2 con azida de sodio al 0,01%.

La titulación del antisuero mediante la prueba de hemaglutinación se llevó a cabo en placas de microtítulo con reservorios en U (Microtiter, Cooke Engineering Co., Alexandria, Virginia, USA). Se hicieron diluciones de 1:200 hasta 1:409.600 quedando en cada reservorio una gota de 0,05 ml de cada dilución del antisuero. Se empleó como diluyente salina tamponada con fosfatos a pH 7,2 (0,15 M) más suero normal de caballo al 1%. Seguidamente se agregó una gota de eritrocitos sensibilizados al 0,75% a cada una de las diluciones. Al mismo tiempo se probaron los siguientes testigos: antisuero y eritrocitos tratados con ácido tánico, suero normal y eritrocitos sensibilizados. La lectura se hizo a las 3 h buscando patrones de sedimentación.

La inhibición de la hemaglutinación se llevó a cabo de la manera siguiente: se hicieron diluciones de los extractos de yemas y brotes desde 1:200 hasta 1:409.600, quedando 0,025 ml de cada dilución en cada reservorio de la placa de microtítulo. Seguidamente se añadió a cada reservorio una gota del antisuero a una dilución cuatro veces menor del título máximo de hemaglutinación del mismo, lo que aseguró un número suficiente de anticuerpos para glutinar los eritrocitos sensibilizados. La mezcla se incubó 2 h a 37 C y durante un día a 4 C. Luego se agregaron eritrocitos sensibilizados, al 0,75%. Estas placas se agitaron por un min en un agitador orbital antes de incubarlas por 3 h a 37 C. En cada placa se probó un testigo del título hemaglutinante del antisuero, y un testigo del título inhibidor de la hemaglutinación del virus purificado.

RESULTADOS

Los eritrocitos tratados con glutaraldehído presentaron características deseables tales como es-

tabilidad en agua destilada, resistencia a la congelación y poca tendencia a adherirse entre sí.

Las condiciones óptimas de sensibilización para los eritrocitos tratados con glutaraldehído, fueron las siguientes: ácido tánico 1:10.000; pH 4,0 y virus a una concentración de 1 mg/ml. El antisuero probado con eritrocitos así preparados dio un título aglutinante de 1:25.600. El virus purificado dio un título inhibidor de la hemaglutinación de 1:12.800, cuando se incubó con una dilución del antisuero de 1:5.000.

Las pruebas de inhibición de la buena hemaglutinación en extractos de brotes y yemas de tubérculos arrojó los siguientes resultados que se resumen en el Cuadro 1. Algunas de las muestras de

Cuadro 1. Detección del virus X de la papa en yemas y brotes de tubérculos de papa mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación.

Técnica de detección	Tipo de muestra	Número de tubérculos*	
		Positivos	Negativos
Aglutinación de cloroplastos**	Hojas	21	9
Inhibición de la hemaglutinación**	Brotes	21	9
	Yemas	15	15

* Número de tubérculos positivos o negativos de un total de 30 examinados.

** Cada tubérculo fue dividido en mitades; cada mitad fue examinada separadamente para las pruebas de aglutinación de cloroplastos en hojas, o inhibición de la hemaglutinación con extractos de brotes o yemas.

brotes presentaron reacciones no específicas hasta la dilución de 1:8. Del grupo de 30 tubérculos, 21 resultaron infectados de acuerdo a la prueba de inhibición de la hemaglutinación. En brotes, el título de inhibición de la hemaglutinación de las 21 muestras positivas varió desde 1:64 a 1:4.048 y correspondieron a los 21 que habían resultado positivos mediante la aglutinación de cloroplastos con muestras de follaje. Cuando se utilizaron extractos de yemas, algunos mostraron reacciones no específicas hasta un título de 1:16 y del total de 30 muestras de yemas examinadas, 15 resultaron positivas para el VXP con títulos inhibidores de la hemaglutinación entre 1:32 y 1:1.024. En seis de los tubérculos que habían resultado positivos mediante la aglutinación de cloroplastos e inhibición de la hemaglutinación en los brotes, no se detectó el VXP.

DISCUSION

El VXP se identificó satisfactoriamente en los extractos de plantas de papa que se emplearon como fuente del inóculo, por medios serológicos y pruebas de infectividad llevadas a cabo en *G. globosa* (30) y *C. album* (28), las cuales presentaron las lesiones locales típicas de la infección por el VXP. En la preparación viral purificada la presencia del VXP se confirmó en pruebas de infectividad, serología, espectro de adsorción a la luz ultravioleta, punto de inactivación termal y microscopía electrónica.

Para producir semilla de papa libre de virus, los tubérculos obtenidos de plantas no infectadas deben sembrarse en el invernadero con el objeto de prevenir la reinfección de las plantas y para verificar la ausencia del virus en ellas. Tales medidas, aunque efectivas, requieren tiempo e instalaciones costosas. La detección directa del virus en los tubérculos o en yemas o brotes del mismo, podría reducir costos y dar información más rápida sobre la calidad de la semilla con suficiente antelación a la siguiente siembra.

Ciertos aspectos de la técnica de hemaglutinación pasiva fueron investigados. Los eritrocitos frescos, cuando se sensibilizan con un antígeno, tienen un período de utilidad limitado de 2 ó 3 días, lo que, asociado a lo laborioso del método de sensibilización, limita su empleo. Por esta razón los eritrocitos se trataron con glutaraldehído, fijador que al estabilizar la membrana del eritrocito, prolonga el período de utilidad de los mismos. Seguidamente estos eritrocitos se trataron con ácido tánico para unir el virus a su superficie.

Los eritrocitos tratados con glutaraldehído, por ser de más simple manipulación, son más recomendables para este tipo de trabajo.

La sensibilidad de cualquier método de inhibición de la hemaglutinación depende de la sensibilización óptima de los eritrocitos con el antígeno en cuestión. La sensibilización óptima depende principalmente de la concentración del antígeno y del pH de sensibilización. La cantidad óptima de virus que se une al eritrocito no corresponde a la unión máxima de viriones a la membrana del mismo, sino más bien aquella en que en presencia de un mínimo de antisuero ocurre la reacción visible de hemaglutinación. Al utilizarse una gran dilución

del antisuero en la primera fase de la reacción (pocos anticuerpos), basta una pequeña cantidad de virus en la muestra para neutralizarlos e inhibir de esta manera la hemaglutinación. Así, en el presente trabajo se detectaron cantidades de virus de 0,0075 μg de proteína (cantidad en una gota de 0,05 de una dilución 1:12.800 de virus purificado a una concentración de 4 mg/ml), resultados que concuerden con los obtenidos por Cunningham *et al.* (10) con el TMV y los de Saito e Iwata (22) con el "White Clover Mosaic Virus", usando la misma técnica.

La técnica de inhibición de la hemaglutinación con extractos de brotes y yemas fue comparada con la de aglutinación de cloroplastos. De 30 tubérculos empleados, 21 mostraron infección en las pruebas de aglutinación de cloroplastos. Las pruebas de inhibición de hemaglutinación realizadas con extractos de brote de las correspondientes otras 30 mitades, arrojaron también 21 tubérculos infectados, los mismos positivos de las pruebas en la hoja. Las pruebas llevadas a cabo con extractos de yemas, arrojaron solamente 15 tubérculos positivos. En esta forma, no fue posible detectar el VXP en seis de las muestras, posiblemente debido a la baja concentración del virus en las yemas (2, 18) o a la distribución desigual del virus en el tubérculo (3). En los brotes, la intensa actividad metabólica de sus células permite o estimula la replicación viral (3), hecho que no ocurre en las yemas sin germinar, cuya concentración viral depende del virus que haya sido translocado del follaje al tubérculo (3). Estos resultados coinciden con los de Shepard (24) que mediante inmunodifusión radial, con una sensibilidad de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de virus no detectó en forma consistente el virus en yemas. En el presente trabajo, sin embargo, el sistema de muestreo difiere del empleado por ese autor. El extracto analizado correspondió a todas las yemas de la mitad del tubérculo y no a una sola. Por otra parte, estos resultados no coinciden con los obtenidos por Kahn *et al.* (17), los cuales, mediante la aglutinación de la bentonita, con una sensibilidad semejante a la obtenida en el presente trabajo con la inhibición de la aglutinación, 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, informan del empleo de una sola yema por tubérculo para obtener un 96% de correspondencia con los resultados obtenidos en el follaje. Llamen la atención los títulos aglutinantes de 1:64.000 que parecieran excesivamente altos, dado el bajo contenido del virus en las yemas.

Se concluye que a pesar de la gran sensibilidad de la técnica de inhibición de la hemaglutinación en la detección del VXP, no es posible tener certeza de su ausencia si se analizan solamente las yemas sin brotar pero la respuesta es afirmativa si se analizan los brotes. Valdría la pena probar en los extractos de yemas, otra técnica aún más sensible que la inhibición de la hemaglutinación como la prueba inmunológica de adsorción con conjugados enzimáticos (ELISA) (8, 29).

RESUMEN

Se preparó un antisuero específico para el virus X de la papa (VXP) mediante la inyección seriada en un caballo de preparaciones altamente purificadas del VXP. Previo sangrado del caballo se obtuvo el antisuero que se empleó luego para estudiar aspectos básicos de la hemaglutinación pasiva usando eritrocitos de carnero preservados en glutaraldehído y sensibilizados con el VXP. Esto se hizo con el objeto de evaluar la eficiencia de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (TIH) en la detección del VXP en yemas no brotadas de tubérculos de papa. La evaluación se hizo comparando el hallazgo del virus en mitades de tubérculos mediante el examen (TIH) de extractos de yemas no brotadas (virus en baja concentración) y brotes (virus en alta concentración) con el hallazgo del VXP en el follaje de plántulas de papa (virus en muy alta concentración) salidas de las otras mitades de tubérculos usando la técnica de aglutinación de cloroplastos. El examen de las yemas sin brotar solo detectó la presencia del VXP en un 60% de los tubérculos que mostraron estar infectados mediante el análisis de los brotes y el follaje. Se sugiere el uso de otras técnicas más sensibles como la inmunoadsorción de conjugados enzimáticos (ELISA) en la detección del VXP en yemas no brotadas de tubérculo.

LITERATURA CITADA

1. ABU SALIH, H.S.A., MURANT, F. y DAFT, M.J.K. Comparison of the passive haemagglutination and bentonite flocculation tests for serological work with plant viruses. *Journal of General Virology* 2(1): 155-166. 1968.
2. BEEMSTER, A.B.R. Translocation of potato virus X in the potato (*Solanum tuberosum* L.) in primarily infected plants. Wageningen, H. Veenman & Zonen, 1958. 98 p.
3. BEEMSTER, A.B.R. Virus traslocation in potato plant and mature-plant resistance. In Bokx, J.A. de, *Viruses of potatoes and seedpotato production*. Wageningen Centre for Agricultural Publishing and Documentation Board, 1972. pp. 144-151.
4. BERCKS, R. y QUERFURTH, G. The use of latex for the detection of distant serological relationship among plant viruses. *Journal of General Virology* 12(1):25-32. 1971.
5. BING, D.H., WEYAND, J.G.M. y STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124(4): 1166-1170. 1967.
6. BRADLEY, R.H.E. A rapid method of testing plants in the field for potato virus X. *American Potato Journal* 29(5): 289-291. 1952.
7. BOKX, J.A. DE. Graft and mechanical transmission. In Bokx, J.A. de, ed. *Viruses of potatoes and seedpotato production*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation Board, 1972. pp. 26-35.
8. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. Técnica ELISA para la detección de virus en la papa. 1978. Circular VI (9).
9. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. Microscopio electrónico y detección del virus de la papa. 1979. Circular VII (9).
10. CUNNINGHAM, J.C., TINSLEY, T.W. y WALKER, J.M. Haemagglutination with plant and insect virus. *Journal of General Microbiology* 42(3):397-401. 1966.
11. CHASE, R.W. y THOMPSON, N.R. Selection testing and increase of premier foundation seed stocks in Michigan. *American Potato Journal* 44(4):218-223. 1967.
12. DANIEL, T.M., WEYAND, J.G.M. y STAVITSKY, A.B. Micromethods for the study of proteins and antibodies. IV. Factors involved in the preparation and use of a stable preparation of formalinized tannic acid-treated protein sensitized erythrocytes for detection of antigen and antibody. *The Journal of Immunology* 90(5): 741-750. 1963.
13. HIDDEMA, J. Inspection and quality grading of seed potatoes. In Bokx, J.A. de, ed. *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation Board. 1972. pp. 87-101.

14. HIRATA, A.A. y BRANDRISS, M.W. Passive hemagglutination procedures for protein and polysaccharide antigens using erythrocytes stabilized by aldehydes. *The Journal of Immunology* 100(3): 641-646. 1968.
15. HOOPER, W.J., y BENSON, A.P. Time of symptom response in *Datura tatula* L. to potato virus X as a function of virus concentration. *Virology* 10(2): 245-256. 1960.
16. HOYMANN, W.G. A method of indexing potatoes for virus X by use of petiole or tuber juice. *American Potato Journal* 28(12): 713-721. 1951.
17. KAHN, R.P., SCOTT, H.A., BOZICEVICH, J. y VINCENT, M.M. Detection of potato viruses X, M and S in dormant potato tubers by the bentonite flocculation test. *Phytopathology* 57(1):61-65. 1967.
18. MAC KINNON, J.P. Distribution of virus X in chronically infected potato tubers. *American Potato Journal* 38:448-450. 1961.
19. MOORHEAD, E.L. The enhancement of antibody response by the use of adjuvants in rabbits immunized with purified plant viruses. *Virology* 13(2):249-255. 1961.
20. OUSUKI, Y., TAKEBE, I., HONDA, Y., KAJITA, S. y MATSUI, C. Infection of tobacco mesophyll protoplasts by potato virus X. *Journal of General Virology* 22(3):375-385. 1974.
21. ROBERTS, J.D. Virus tested potatoes in Scotland. *American Potato Journal* 30(4):197-204. 1953.
22. SAITO, Y. e IWATA, Y. Hemagglutination test for titration of plant virus. *Virology* 22(3):426-428. 1964.
23. SCOTT, H.A., KAHN, R.P., BOZICEVICH, J. y VINCENT, M.M. Detection of potato virus X by the bentonite flocculation test. *Phytopathology* 54(10): 1292-1293. 1964.
24. SHEPARD, J.F. Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S and M. Montana Agriculture Experiment Station. Bulletin No. 662. 1972. 72 p.
25. SHEPARD, J. D. y SHALLA, T.A. Relative antigenic specificities of two PVX strains and their D-protein oligomers. *Virology* 47(1): 54-60. 1972.
26. SLOGTEREN, D.H.M. VAN. Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil. *In Proceedings of the Second Conference on Potato Virus Diseases*, Lisse, Wageningen, 1954. pp. 51-54.
27. SLOGTEREN, D.H.M. VAN. Serology. *In Bokx, J.A. de, ed. Viruses of potatoes and seed-potato production*. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation Boards. 1972. pp. 87-101.
28. SMITH, K.N. A textbook of plant virus diseases. 3. ed. New York, Academic Press, 1972. 684 p.
29. VALLER, A., BARTLETT, BIDWELL, D.E., CLARK, M.F. y ADAMS, A.N. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* 33:165-167. 1976.
30. WILKINSON, R.E. y BLODGETT, F.M. *Gomphrena globosa*, a useful plant for qualitative and quantitative work with potato virus X. *Phytopathology* 38(1):28. 1948.