

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PRODUCCION DE ANTISUEROS PARA
EL VIRUS DEL ENROLLAMIENTO DE HOJAS DE PAPA

T E S I S

Presentada al Programa de Estudios para Graduados de
la Universidad Nacional - Instituto Colombiano Agropecuario

P o r

PEDRO J. CORZO CARRILLO

Como requisito parcial para optar al título de

MAGISTER SCIENTIAE

Bogotá, Colombia

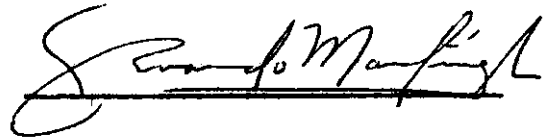
1977

TESIS APROBADA POR

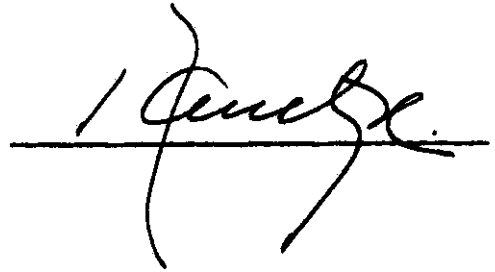
1980

COMITE CONSEJERO

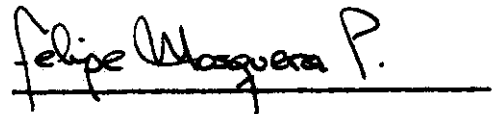
GERARDO MARTINEZ LOPEZ Ph.D.

Handwritten signature of Gerardo Martinez Lopez, written in cursive and underlined.

RAMON MONTOYA M.S.

Handwritten signature of Ramon Montoya, written in cursive and underlined.

FELIPE MOSQUERA PARIS M.S.

Handwritten signature of Felipe Mosquera Paris, written in cursive and underlined.

"El Presidente de Tesis, el Consejo de Tesis y el Consejo Examinador de grado, no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato".

(Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional)

DEDICO :

A Familiares

y

Amigos

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos al Doctor Gerardo Martínez López por la sugerencia del tema de tesis, planeación del mismo, colaboración y estímulo en el desarrollo de esta investigación y sus sugerencias en la revisión del manuscrito

a los doctores Ramón Montoya y Felipe Mosquera París por su valiosa colaboración en la revisión del manuscrito

al personal auxiliar del Laboratorio de Virología e Invernaderos por su colaboración en los trabajos de la presente investigación

a la señora Magdalena de García por su valiosa colaboración en los trabajos de mecanografía

a todas las personas que en una u otra forma contribuyeron a la culminación de la presente tesis.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Propiedades fisico - químicas	5
2.2. Síntomas en papa	5
2.2.1. Síntomas primarios	5
2.2.2. Síntomas secundarios	6
2.2.3. Síntomas en <u>Solanum andigena</u>	6
2.3. Razas	7
2.4. Métodos de transmisión	8
2.5. Métodos de diagnóstico	11
2.6. Aislamiento y purificación	13
2.7. Producción de antisueros	14
2.8. Serología	15
3. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Establecimiento de colonias de <u>Myzus persicae</u>	17
3.2. Planta indicadora	21
3.3. Fuente de virus	21
3.4. Evaluación de métodos de clarificación y purificación	24
3.5. Producción de antisueros	27
3.6. Pruebas serológicas	28

	Página
4. RESULTADOS Y DISCUSION	31
4.1. Establecimiento de colonias de <u>Myzus persicae</u>	31
4.2. Planta indicadora	33
4.3. Fuente de virus	34
4.4. Evaluación de métodos de clarificación y purificación	38
4.5. Producción de antisueros	43
4.6. Pruebas serológicas	45
5. CONCLUSIONES	47
6. RESUMEN	48
7. SUMMARY	49
BIBLIOGRAFIA	50
APENDICES	55

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Fuente y origen de las 30 colonias de <u>Myzus persicae</u> .	18
2	Eficiencia de <u>M. persicae</u> de varias procedencias para transmitir PLRV.	32
3	Prueba biológica de diferentes diluciones de extracto de jugo clarificado de <u>P. floridana</u> infectada con PLRV con y sin paso por carbón activado.	39
4	Actividad biológica del PLRV durante el proceso de purificación.	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Cámara de crecimiento utilizada en la actividad biológica del PLRV, a temperatura constante de 25°C, 14 horas de luz y 10 de oscuridad.	22
2	<u>Myzus persicae</u> confinados en tubos de nitrato de celulosa de 70 mm de alto por 25 mm de diámetro, para el proceso de alimentación a través de membranas de parafilm.	25
3	Aspecto de la alimentación de <u>M. persicae</u> a través de membranas de parafilm.	26
4	Síntomas de PLRV en <u>P. floridana</u> .	35
5	Efecto del número de áfidos sobre la severidad de los síntomas producidos por PLRV sobre <u>P. floridana</u> inoculada a las 12 semanas de edad.	37

LISTA DE APENDICES

APENDICE		Página
1	Evaluación de los antisueros contra el PLRV producidos con los fuentes de antígeno.	56
2	Reacción de doble difusión en láminas de agar entre antisuero purificado o sin purificar y jugo sin diluir de dos especies vegetales.	60
3	Reacción de doble difusión en láminas de agar entre antisuero purificado y sin purificar y jugo sin diluir de varias especies vegetales.	62
4	Reacción de doble difusión en láminas de agar entre antisuero purificado o sin purificar y jugo de dos especies vegetales tratado y sin tratar con formaldehido.	64
5	Reacción de doble difusión en agar entre antisuero contra el PLRV y virus purificado a partir de <u>Physalis floridana</u> .	
6	Reacción de doble difusión en agar entre antisuero contra el PLRV y macerado de áfidos virulíferos o no virulíferos.	68

1. INTRODUCCION

El cultivo de la papa en Colombia es uno de los más importantes por la superficie cultivada, el volumen producido, el número de agricultores que participan y por ser la papa un producto básico en la alimentación del pueblo colombiano, especialmente en regiones de clima frío, por lo cual hay necesidad de estudiar los factores limitantes de la producción con el fin de determinar la forma de eliminarlos.

En Colombia, este cultivo está seriamente afectado por las que parecen ser enfermedades causadas por virus, considerándose que en la actualidad son el factor limitante para la obtención de mejores rendimientos y las causantes de la casi desaparición de algunas de las mejores variedades de papa.

Los estudios preliminares realizados hasta el presente indican que el "potato leaf roll virus" (PLRV) (virus del enrollamiento de las hojas de papa), es uno de los presentes con mayor incidencia en todas las áreas productoras en Colombia y quizá uno de los de mayor importancia económica.

El PLRV es un virus que no se transmite mecánicamente, por lo cual, la identificación de material enfermo es más difícil, ya que a pesar de ser uno de los primeros conocidos en este cultivo, no se ha logrado encontrar un método rápido de diagnóstico. Hasta el presente, la prueba más utilizada y confiable es la transmisión a través de su vector, el áfido Myzus persicae (Sulz.) a plantas indicadoras, siendo esta labor bastante demorada y laboriosa, por requerir además del tiempo necesario para la expresión de síntomas, el establecimiento y mantenimiento de colonias de áfidos con alta eficiencia de transmisión y el contar con cámaras de crecimiento con luz y temperatura especiales, para que el material inoculado exprese los síntomas característicos. Otra de las pruebas utilizadas es la tinción de cortes de tubérculos

para determinar la mayor o menor concentración de callosa en ellos y de acuerdo a los resultados probar su sanidad. Esta es una prueba de amplio uso en Europa con algunas variedades. En Colombia aún se desconoce el comportamiento de las variedades cultivadas y las condiciones de almacenamiento necesarias para el manejo correcto de la técnica, pero se están desarrollando estudios preliminares sobre su posible aplicabilidad.

Ante estas dificultades y considerando que aún no se cuenta con un antisuero apropiado para el diagnóstico rápido del PLRV, y que los métodos serológicos han tenido gran aplicabilidad práctica en el estudio rápido de muchos de los virus en plantas, se orientó este proyecto de investigación al aislamiento y purificación del PLRV y al uso de este virus purificado en la obtención de antisueros que permitan hacer uso de los métodos serológicos en diagnóstico rápido y sencillo de PLRV.

2. REVISION DE LITERATURA

Según Rozendaal (1961) y Webb et al (1952), la enfermedad conocida como enrollamiento de las hojas de papa, fué la primera en ser diferenciada de la colección de "enrollamientos" de la papa en Alemania. Estos autores y Peters (1967), indican que en 1913 Quanjér en Holanda, descubrió, que la verdadera enfermedad de enrollamiento de las hojas se caracterizaba por la necrosis del floema y en 1916 demostró mediante injerto de tallos y de tubérculos que la enfermedad era infecciosa y causada por algún virus y que Botjes en 1920, descubrió que en el campo era transmitida por el áfido Myzus persicae (Sulz). Estudios posteriores indican que el virus es transmitido por más de 10 especies de áfidos todos en manera persistente, siendo M. persicae el más eficiente y el de mayor importancia económica (Kassanis, 1952; Rozendaal, 1961; Peters, 1970; Beemster y Rozendaal, 1972).

La enfermedad se presenta en todas las áreas de cultivos de papa en el mundo, causando grandes pérdidas (Webb et al, 1952; Beemster y Rozendaal, 1972), dependiendo la reducción en rendimientos de las condiciones ambientales, la variedad de papa y la raza del virus presente (Beemster y Rozendaal, 1972).

En los primeros reconocimientos sobre la presencia de PLRV en Colombia, Silberschmidt (1947), encontró los síntomas característicos que produce la enfermedad, en todos los sitios visitados, aunque en muy bajo porcentaje. Fernow y Garcés (1949), también mencionan que la mayor parte de los campos examinados visualmente parecen estar libres de ésta enfermedad, o casi libres. Solamente cinco campos de 100 visitados, mostraron una cantidad apreciable de enrollamiento, pero ninguno pasó de un 10 por ciento. Alba (1950), confirma que el virus no se encuentra muy diseminado y que en los

cultivos donde se ha observado, se encuentra en bajos porcentajes.

A pesar de que los síntomas característicos producidos por el PLRV no eran observados con mucha frecuencia, Fernow y Garcés (1949) y Alba (1950), mencionan la existencia en el país de una enfermedad virosa en diversos cultivos de Solanum andigena Juz. et Buk., con síntomas de clorosis apical y entrenudos cortos con enanismo de la planta y que por la apariencia de las plantas infectadas denominaron "enanismo amarillo". Estos síntomas se hacen más y más frecuentes, y Guzmán y Gálvez (1967), informan sobre su gran severidad y sobre la imposibilidad para lograr su transmisión por medios mecánicos.

Martínez-López (1968 y 1969), considera éste como uno de los problemas más graves afectando cultivos de papa en Colombia, e inicia trabajos orientados a la identificación del agente causal. Nieto (1971), considera nuevamente que éste es el principal problema del cultivo en Colombia, lo considera como el responsable de la casi desaparición de algunas variedades de papa y continúa los estudios orientados a la identificación del agente causal. En éstos estudios utiliza M. persicae como posible vector y Physalis floridana Rydb., como indicadora y obtiene síntomas muy similares a los inducidos por el PLRV. Resultados similares fueron obtenidos por Corzo (1973), en investigaciones en Tibaitatá.

Rodríguez (1976), en trabajos de transmisión con M. persicae utilizando, como posible fuente de virus, variedades colombianas, concluye que lo que por muchos años se estaba denominando "enanismo amarillo", corresponde a la reacción típica de ciertas variedades de S. andigena a la infección secundaria del PLRV.

2.1. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.

A pesar de haber sido estudiado por muchos años al comparar el PLRV con otros virus de papa, se encuentra que existe poca información sobre sus propiedades fisico-químicas. Una de las razones es la falta de métodos cuantitativos eficientes para determinar sus propiedades y las dificultades que implican algunos de los estudios al no ser transmitido mecánicamente (Murayama y Kojima, 1973).

En trabajos hechos por Peters (1970), Beemster y Rozendaal (1972), Murayama y Kojima (1973) y Sarkar (1976), se han encontrado las siguientes propiedades:

Punto de inactividad térmica : 70 a 80°C.

Punto final de dilución : 10^{-3} a 10^{-4}

Longevidad in vitro : 4 a 5 días

Estructura de la partícula : partículas isométricas de 24 nm de diámetro

Composición : Cadena doble de DNA

2.2. SINTOMAS EN PAPA.

2.2.1. Síntomas Primarios.

Por lo general, cada variedad de papa reacciona de modo particular a ese virus, pero se considera que en plantas sanas infectadas durante la época del desarrollo, los síntomas predominantes son el enrollamiento de las hojas superiores. En algunas variedades solo se observa un leve enrollamiento secundario y predomina más el aspecto rígido, crecimiento erecto y coloración clorótica de las hojas superiores. Las hojas inferiores son coriáceas y se presenta una necrosis de los bordes de los folíolos. En general las hojas de plantas enfermas presentan un color más claro que las plantas sanas. La severidad de todos éstos síntomas se halla influenciada

por la virulencia de la raza del virus que se encuentre presente. En algunas variedades es común un color púrpura en el borde de las hojas enrolladas (Rozendaal, 1961; Beemster y Rozendaal, 1972).

2.2.2. Síntomas secundarios.

Los síntomas secundarios son los manifestados por las plantas provenientes de tubérculos madres infectados. Estos por lo general son más severos que los síntomas primarios aunque menos pronunciados en el ápice. Se caracterizan por el enrollamiento de los folíolos de las hojas inferiores. Con frecuencia las plantas infectadas presentan hábito de crecimiento erecto, menor tamaño que las plantas sanas y con frecuencia una coloración más clara del follaje (Beemster y Rozendaal, 1972). El enrollamiento en las hojas de plantas infectadas con el PLRV es una consecuencia de la presencia de cantidades anormales de almidón en ellas, lo que causa una destrucción del parénquima (Smith, 1972).

2.2.3. Síntomas en Solanum andigena.

Rodríguez (1976), encontró que la reacción de algunas variedades de S. andigena a la infección secundaria de PLRV, es clorosis intervenal de las hojas y falta de crecimiento de la planta, reacción que ha sido conocida como "enanismo amarillo". Esta sintomatología difiere de la conocida en variedades de S. tuberosum, en las que el síntoma predominante es el enrollamiento de las hojas inferiores de la planta. En el mismo estudio Rodríguez (1976), encontró que en material de S. tuberosum x S. andigena los síntomas secundarios de PLRV, siempre incluyeron enrollamiento marcado de las hojas inferiores y en algunas variedades, se presentaba además clorosis marginal e intervenal de las hojas superiores.

2.2.4. Factores que influncian la aparición de los síntomas.

Nishimura et al citados por Rodríguez (1976), han demostrado que los síntomas en las plantas infectadas con PLRV, dependen de la temperatura, fertilización nitrogenada y la acumulación de carbohidratos. En cultivos sembrados en suelos con altos niveles de nitrógeno, los síntomas tienden a enmascarse; en cambio con aplicaciones de fósforo o potasio, a pesar de que los síntomas se reducen inicialmente, luego se intensifican y aumentan la necrosis del floema (Wilson, 1955; Wright y MacCarthy, 1963; MacCarthy, 1963).

En general, los síntomas dependen de la raza del virus, de la variedad de papa, estado vegetativo de la planta atacada y de las condiciones ambientales (Wright y MacCarthy, 1963; Peters, 1970; Beemster y Rozendaal, 1972).

2.3. RAZAS.

Las razas del virus han sido diferenciadas especialmente por la reacción que presenta P. floridana al ser inoculada con los diferentes aislamientos (Peters, 1970; Smith, 1972), pero también se han registrado diferencias en la sintomatología en la variedad de papa Majestic inoculada con diferentes razas de PLRV, los cuales permanecieron constantes en dos años de observación (Kassanis, 1952).

Weeb et al (1952), pudieron reconocer cuatro razas del virus, a las cuales designaron como 1, 2, 3 y 4 en orden de severidad de los síntomas presentados en P. floridana y Weeb (1955), reconoció una quinta raza parecida en los síntomas a la raza 1, pero diferente en la velocidad en hacerse sistémica y en el grado de severidad de los síntomas en otros hospederos.

MacCarthy (1963), logró transmitir el virus a partir de las plantas de papa con síntomas suaves, medios y severos, por medio de M. persicae. Los síntomas presentados en P. floridana fueron, suaves, medios, severos y muy severos, representando a cuatro razas diferentes. Sin embargo, Wright y MacCarthy (1963), observaron que a pesar de que algunos aislamientos producían síntomas muy suaves, suaves, moderados o severos en seis variedades de papa, permaneciendo inmodificables por tres años de observación, éstos fueron inestables al ser transmitidos a P. floridana por medio de áfidos.

2.4. METODOS DE TRANSMISION.

Desde que Botjes en 1920 probó que M. persicae era el agente transmisor del PLRV y Kasai en 1922 reportó la transmisión del virus por medio de áfidos y de injerto (Murayama y Kojima, 1973), se han hecho numerosos estudios sobre transmisión por áfidos y se han tratado de encontrar los períodos mínimos requeridos para que el insecto adquiriera el virus en una planta y esté en capacidad de transmitirlo (Kirkpatrick y Ross, 1952; Smith, 1972), encontrando también que el virus es adquirido por el áfido al alimentarse del floema de plantas infectadas con PLRV (Watson y Plumb, citados por Espinoza, 1975).

Webb et al (1952), encontraron que seis horas de alimentación sobre una planta enferma, fueron suficientes para que los áfidos adquirieran el virus, luego del cual necesitaron de un período de incubación del virus en el insecto de 30 horas, antes de tener la capacidad de transmitirlo. Una vez los áfidos llegaron a ser virulíferos, necesitaron solo de dos horas para inocular el virus al alimentarse en plantas sanas. Sin embargo, Kirkpatrick y Ross (1952), investigaron el número óptimo de áfidos que deben usarse para obtener una transmisión eficiente en plantas indicadoras y encontraron

que los áfidos adultos de M. persicae no fueron transmisores eficientes con periodos de adquisición de ocho horas o menos, pero en cambio fueron muy eficientes cuando fueron mantenidos en adquisición por cerca de 24 horas.

Las afirmaciones anteriores están en desacuerdo con Kassanis (1952), quién comprobó que en ocasiones el M. persicae podía adquirir el virus después de solo dos horas de alimentación sobre plantas enfermas, necesitando dos días más para transmitirlo y además menciona que el período de incubación es muy variable y depende del período de adquisición, el número de áfidos usados por planta de prueba, la concentración del virus en la fuente infectada y la susceptibilidad de la planta a la infección, lo cual concuerda con Day (1955), quien afirma que cuando el vector se alimenta sobre plantas con baja concentración de virus, tiene generalmente un período de incubación de aproximadamente 20 horas a 25°C y cuando se alimentan sobre fuente de alta concentración de virus, la transmisión se obtiene en periodos de adquisición e inoculación de aproximadamente dos horas cada uno. Además menciona que estos períodos pueden variar dependiendo de la raza del vector y las condiciones ambientales. Smith (1972), también encontró que las ninfas transmiten más eficientemente que los adultos, siendo esta transmisión óptima con ninfas de nueve días de nacidas. Berrocal, et al citados por Espinoza (1975), afirman que el PLRV puede ser transmitido por un solo áfido infectivo.

Day (1955), aplicó el sistema de alimentación de áfidos a través de membranas de plástico en solución purificada de P. floridana infectada con PLRV, pero sin obtener infección, sugiriendo que esa inhabilidad aparente de los áfidos para adquirir el virus fué debida a la muy baja concentración

del virus presente en la solución para lograr infectar los áfidos, mientras Rochow (1960), usando el mismo método de transmisión con "barley yellow dwarf virus" (BYDV) (enanismo amarillo de la cebada), utilizando áfidos que se alimentaron a través de membranas con extractos de jugo que contenía el virus, encontró un 54% de infección en las plantas inoculadas, cuando usó un período de adquisición de 16 a 18 horas seguido de tres de inoculación a 15°C, observando que los áfidos se alimentaron mejor sobre extractos que contenían aproximadamente 10% de sucrosa.

Peters (1967), para probar la infectividad de la preparación de virus, aplicando otro método de transmisión usado por otros investigadores, inyectó pequeñas porciones de la preparación a los áfidos, por medio de microinyecciones abdominales, obteniendo hasta un 70% de infección en las plantas inoculadas de P. floridana.

Otro método de transmisión usado por muchos años en trabajos con virus es el injerto, habiendo sido descritas muchas variaciones de él (Bawden, 1964; Bos, 1967). El injerto es esencialmente una forma de propagación vegetativa y en virus como el PLRV que está restringido al floema, la transmisión solo es posible cuando los tejidos vasculares se han unido y el éxito de la transmisión depende de las propiedades del virus y de la unión del injerto (De Bokx, 1972; Bawden, 1964; Matthews, 1960).

Las primeras evidencias de transmisión del PLRV por medio de injerto de tubérculo fué hecha por Kasai en 1922 (Murayama y Kojima, 1973), y puede ser recomendable para determinar la ocurrencia del virus en muestras procedentes de lotes de semilla, constituyendo un buen método de detección y habiendo sido usado para detectar el virus en base a injertos de tallos de papa en Datura stramonium L. en Brasil, con resultados satisfactorios (Cupertino y Costa, citado por Rodríguez, 1976).

2.5. METODOS DE DIAGNOSTICO.

Entre los métodos empleados en diagnóstico el más común es el de transmisión por medio de áfidos a plantas indicadoras. Kirkpatrick (1948), al considerar que la planta ideal para transmisión de virus transmitidos por insectos en forma circulativa, como el PLRV, debe desarrollar síntomas distintivos e inconfundibles en un tiempo corto, debe propagarse por semilla verdadera, debe germinar sin tener latencia prolongada, debe ser posible su utilización en estado de plántula que permita su uso en materas pequeñas y debe constituir alimento favorable para el insecto vector, encontró que la papa no es satisfactoria como planta de prueba para éste virus pero en cambio en estudio con rango de hospederos encontró que P. floridana era una planta muy susceptible al virus y desarrollaba los síntomas muy rápido después de la infección. Esta planta se ha encontrado como la más apropiada para determinar la presencia del virus y por esto ha sido la más usada en trabajos de diagnóstico (Dykstra, 1933; Kirkpatrick, 1948; Webb et al, 1952; Wright y MacCarthy, 1963; Espinoza, 1975), y la que provee mejor fuente de virus, en comparación con otros hospedantes, incluyendo papa (Kirkpatrick y Ross, 1952; Mackinnon, 1967).

Los síntomas mostrados por P. floridana infectada con PLRV son epinastia, falta de desarrollo de la planta, entrenudos cortos, clorosis intervenal, hojas más pequeñas que en las plantas normales y algunas veces enrollamiento de hojas (Kirkpatrick, 1948; Beemster y Rozendaal, 1972). La manifestación de sus síntomas varía de acuerdo a la edad de la planta, la cual debe inocularse en estado cotiledonal, antes de que aparezca el primer par de hojas verdaderas, pues en las inoculaciones en estado más avanzado de desarrollo de la planta, los síntomas son confusos (Kirkpatrick, 1948;

Webb et al, 1952; MacCarthy, 1963; 1967).

Para una buena expresión de síntomas, MacCarthy (1963; 1967), recomienda mantener las plantas a probar en cámara de crecimiento a 24°C y 85% de humedad relativa, con un fotoperíodo de 16 horas luz diarias y luminosidad de 1.000 bujías pié. En éstas condiciones, MacCarthy (1963; 1967); Webb et al (1952) y Espinoza (1975), han observado síntomas típicos entre los seis y diez días después de la inoculación.

La serología, técnica muy usada en le diagnóstico de virus, ha tenido ciertas limitaciones con el PLRV. Kojima y Maruyama (1972a) y Murayama y Kojima (1973; 1974), han aplicado algunos métodos serológicos reportando resultados positivos en las pruebas de precipitación en anillo, pero nó en doble difusión en agar, lo cual lo consideran es debido a un bajo título en el antisuero como resultado de muy baja concentración del antígeno usado.

La reacción de calosa, es también otro método de diagnóstico que tiene su mayor aplicación en Europa. De Bokx (1972), indica que la reacción se basa en la coloración de calosa formada en los basos del floema de tallos o tubérculos con una solución de resorcina azul, como consecuencia de la infección con PLRV. La ventaja de la aplicación de éste método es la rapidez con que se puede desarrollar para un examen de gran número de tubérculos en relativamente corto tiempo. El método ha sido aplicado con buenos resultados por Espinoza (1975), a pesar de que De Bokx (1967; 1972), considera que la cantidad de calosa producida difiere entre las diferentes variedades de papa, existiendo algunas que producen tanta calosa en tubérculos sanos, que no es posible diferenciar entre éstos y los enfermos, lo que resulta un factor limitante para la aplicación de la prueba.

2.6. AISLAMIENTO Y PURIFICACION.

Los primeros intentos de purificación del PLRV son los utilizados por Day y Zaitlin (1958), quienes clarificaron parcialmente un extracto de hojas de P. floridana infectada con el virus, mediante un ciclo de centrifugación diferencial, sin embargo, no lograron determinar las características de las partículas al microscopio electrónico. Más tarde Peters (1967), describe un procedimiento de purificación del virus a partir del vector M. persicae y Peters (1970), cita el procedimiento de purificación de Kojima et al (1969), a partir de P. floridana. En éste último, el extracto de hojas enfermas se mezcla con cloroformo y n-butanol, se clarifica, se concentra el virus por centrifugación a alta velocidad para luego suspenderlo en solución tampón de fosfato de potasio 0,01 M, se emulsifica, con fluorocarbón (Daifron S-3), se concentra nuevamente a alta velocidad y el precipitado se suspende en solución tampón y se lleva a gradientes de densidad para una purificación mayor.

Kojima y Murayama (1972b), y Murayama y Kojima (1973), describen una modificación del método anterior, en la cual se precipita el virus con polietileno glicol 6.000 (PEG). Con éste procedimiento el tejido congelado de P. floridana cosechado entre 10 y 16 días después de la inoculación se homogenizan con solución tampón de fosfato, pH 7,4, se trata con una mezcla (1:1) de cloroformo más n-butanol y se clarifica por centrifugación a baja velocidad. Al sobrenadante se le agrega PEG al 8% (p/v), agitando por una hora y dejando en reposo una hora más. Luego se precipita el virus por centrifugación a 4.500 g, por 15 minutos. El precipitado se levanta en solución tampón de fosfato 0,01M, pH 7,4 y se clarifica con fluorocarbón (Daifron S-3), en cuarto frío. El sobrenadante de éste paso es luego puri-

ficado por dos ciclos de centrifugación diferencial y el virus concentrado es llevado a gradientes de densidad.

Este procedimiento de purificación fue el utilizado por Sarkar (1976), en Alemania, en sus estudios sobre el tipo de ácido nucleico del PLRV, según los cuales el virus está compuesto de una doble cadena de DNA.

Kojima y Tamada (1976), trabajando en purificación y serología con "Soybean Dwarf Virus" (SDV), aplicando una modificación del método de purificación descrito por Kojima y Murayama (1972a) usado para PLRV, encontraron dificultades en su purificación y comentan que los virus pertenecientes a este grupo como el PLRV y BYDV, son difíciles de purificar por su muy baja concentración del virus en la planta.

2.7. PRODUCCION DE ANTISUEROS.

Los métodos serológicos son de mucho valor para la identificación y diagnosis rápida tanto en laboratorio como en el campo. Para su aplicación se necesita de la disponibilidad de antisueros contra el virus a identificar. La producción de antisueros se basa en que cuando un animal de sangre caliente es inyectado con un agente extraño y de alto peso molecular, como es el caso de virus de plantas, se origina una reacción, como mecanismo de defensa, por la cual aparecen en su sangre las proteínas del tipo de las gama globulinas, conocidas como anticuerpos, las cuales pueden combinarse específicamente con el virus que ha dado origen a ellos, lo que permite su uso en diagnóstico (Matthews, 1957; Shepard, 1972).

Con el fin de producir antisueros específicos para un determinado virus, éste debe haber sido previamente separado de los compuestos normales de la planta y se debe encontrar en concentración que permita efectuar inyecciones periódicas de alrededor de un miligramo por inyección. Son va-

rias las especies animales que se utilizan en producción de antisueros contra virus de plantas, siendo los más utilizados los conejos, por su facilidad de manejo. La vía y número de inyecciones, el intervalo entre las mismas y la cantidad de virus que debe inyectarse a un animal con el fin de obtener antisueros con alta concentración de anticuerpos es variable con cada tipo de virus y especialmente con el investigador que los está manejando (Matthew, 1957).

2.8. SEROLOGIA.

Los métodos serológicos basados en la reacción específica entre anticuerpos y antígenos, son bastante utilizados en diferentes formas y modificaciones en virus de plantas, especialmente por ofrecer resultados seguros en corto tiempo, su gran especificidad y sensibilidad (Matthews, 1957; Ball, 1961; Bawden, 1964), siendo los más frecuentemente empleados, la reacción de microprecipitación, aglutinación de cloroplastos, doble difusión en agar y difusión radial en agar.

La reacción de microprecipitación es la prueba más simple y depende de la formación de un precipitado visible como resultado de la combinación antígeno-anticuerpo, siendo más usada por algunos investigadores por su gran sensibilidad (Matthews, 1957); otra modificación de la reacción de precipitación es la aglutinación de cloroplastos en la cual una gota de antígeno se mezcla con una de antisuero para observar la aglutinación durante un período de incubación (Ball, 1961). Estos dos métodos se pueden usar con la mayoría de virus, con la desventaja que para su aplicación es necesario la clarificación del antígeno, y en el caso de aglutinación de cloroplastos es poco sensible a bajas concentraciones de virus (Ball, 1961).

La doble difusión en agar y difusión radial están siendo muy aplicadas

por su gran sensibilidad a bajas concentraciones de virus, su aplicabilidad sin clarificación previa (Ball, 1961), además de que con una sola gota de antisuero se puede probar varias muestras de antígeno.

Murayama y Kojima (1974), aplicando la prueba de precipitación en anillo y de doble difusión en agar para el PLRV encontraron que el punto de máxima dilución de virus purificado usado como del antígeno, fue de 1:4.096 en pruebas de precipitación en anillo y la concentración mínima que pudieron detectar fue cerca de 30 mg/ml en pruebas de doble difusión en agar, concentración muy alta para encontrarla normalmente en la planta.

3. MATERIALES Y METODOS

Los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Virología y en los invernaderos del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias "Tibaitatá" del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

3.1. ESTABLECIMIENTO DE COLONIAS DE Myzus persicae.

Considerando el hecho de que existen diferencias en la habilidad de distintas colonias de Myzus persicae (Sultz) para transmitir el PLRV, se siguió el procedimiento descrito por Nagaich (1970), para tratar de identificar una colonia de áfidos con buena eficiencia de transmisión. Con este fin se colectaron M. persicae en varios hospedantes de diferentes localidades en la Sabana de Bogotá, entre los 2.600 y 3.000 m.s.n.m. (Tabla 1), se llevaron al invernadero, donde se iniciaron 30 colonias de áfidos sobre hojas de la especie en que fueron colectados. Con cada una de las colonias y utilizando una modificación del procedimiento utilizado por Rochow (1959) para la obtención de áfidos libres de virus, se aisló una ninfa recién nacida por cada colonia, la que se transpasó con la ayuda de un pincel de pelo de camello #0 a una planta de Datura stramonium L., libre de virus. Esta especie se utilizó por ser buena hospedera de M. persicae y por ser además susceptible a algunos virus de plantas, entre ellos el PLRV, situación ésta que permitió confirmar la ausencia de síntomas de enfermedades virosas, a lo largo del proceso de multiplicación en esta planta hospedera.

Para el confinamiento de los áfidos se usaron jaulas cilíndricas de nitrato de celulosa de 20 cm de alto por cinco de diámetro, con ventanas laterales y la parte superior cubiertas con nylon para permitir la aireación. Las jaulas se colocaron cubriendo las plantas y fijándolas en su extremo

TABLA 1. Fuente y origen de las 30 colonias de Myzus persicae.

Clones No.	Hospedero	Localidad
1	<u>Solanum tuberosum</u> L.	La Caro
2	<u>S. tuberosum</u>	La Caro
3	<u>S. tuberosum</u>	Tabio
4	<u>S. tuberosum</u>	Tabio
5	<u>S. tuberosum</u>	Cogua
6	<u>S. tuberosum</u>	Cogua
7	<u>S. tuberosum</u>	Tibaitatá
8	<u>Poligonum segetum</u> H.B.K.	Tibaitatá
9	<u>S. tuberosum</u>	Tibaitatá
10	<u>S. tuberosum</u>	Tibaitatá
11	<u>D. stramonium</u> L.	Tibaitatá
12	<u>S. tuberosum</u>	Marengo
13	<u>S. tuberosum</u>	Marengo
14	<u>S. tuberosum</u>	Facatativá
15	<u>S. tuberosum</u>	Facatativá
16	<u>S. tuberosum</u>	Subachoque
17	<u>S. phureja</u> L.	Subachoque
18	<u>S. tuberosum</u>	Tenjo
19	<u>Apium graveolens</u> L.	Tenjo
20	<u>A. graveolens</u>	Tibaitatá
21	<u>Brassica</u> spp.	Tibaitatá

TABLA 1. (Continuación)

Clones No.	Hospedero	Localidad
22	<u>S. tuberosum</u>	Tibaitatá
23	<u>S. tuberosum</u>	San Jorge
24	<u>S. tuberosum</u>	San Jorge
25	<u>S. phureja</u>	San Jorge
26	<u>S. tuberosum</u>	San Jorge
27	<u>S. tuberosum</u>	Usme
28	<u>S. tuberosum</u>	Usme
29	<u>S. tuberosum</u>	La Calera
30	<u>S. tuberosum</u>	La Calera

inferior con tierra del matero. Mientras se hicieron las pruebas de eficiencia de transmisión de PLRV las colonias de M. persicae se mantuvieron sobre D. stramonium por aproximadamente tres meses.

La habilidad para transmitir el PLRV de las 30 colonias de M. persicae establecidas, se determinó tomando insectos provenientes de cada una de ellas, alimentándolos sobre plantas de papa infectadas con PLRV por un período de 24 horas, seguido de un período de ayuno en cajas de Petri de 24 horas con el fin de eliminar algunos de los virus no persistentes transmitidos por M. persicae y que estuvieran presentes en las plantas utilizadas. Pasado este período los áfidos fueron transferidos a plántulas de Physalis floridana Rydb. en estado cotiledonal para un período de inoculación de 24 horas de acuerdo a los resultados obtenidos por Berrocal citado por Espinoza (1975) y utilizando 10 áfidos por plántula y 10 plántulas por colonia, para en base al porcentaje de plantas enfermas seleccionar las colonias más eficientes. Las plántulas se mantuvieron a 25°C por 30 días para observar la aparición de síntomas característicos producidos por PLRV.

A las colonias que mostraron en esta prueba más de un 50% de plantas enfermas se les hizo una segunda prueba para seleccionar las que mostraran más de un 70% de transmisión y finalmente una tercera prueba para seleccionar las que mostraran más de un 90% de plantas enfermas.

Una vez evaluada la eficiencia de transmisión, los trabajos se continuaron con individuos de las tres colonias de M. persicae que se encontraran como más eficientes vectores del PLRV. Estos se transfirieron a plantas de repollo chino (Brasica pekinensis (Lour) Rupr.), por ser una planta que además de ser inmune a PLRV permite la obtención de colonias numerosas y vigorosas, las cuales se mantuvieron confinadas en jaulas de madera de