

PURIFICACIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA HOJA AMARILLA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (Sugarcane Yellow Leaf *luteovirus* ScYLV) Y PRODUCCIÓN DE ANTISUERO*

Juan Carlos Angel Sánchez¹, Mavir Carolina Avellaneda Barbosa¹, Jorge Ignacio Victoria Kafure¹, Mónica Betancourt Vásquez², Cristina Díaz-Granados³, José Alejandro Arroyave Posada⁴ y Mauricio Castaño Jaramillo⁴

¹Centro de Investigación de la caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA, jcangel@cenicana.org, ²Universidad de Caldas. Manizales monbe@hotmail.com, ³Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, cristinad57@latinmail.com, ⁴Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT Apartado Aéreo 6713 Cali

*Trabajo realizado con recursos del proyecto cofinanciado por COLCIENCIAS-CENICAÑA "Diagnóstico de enfermedades virales, endémicas y exóticas de la caña de azúcar en Colombia. Código 2214-07.023-97. Galardonado con el Premio Nacional de Fitopatología Rafael Obregón Auspiciado por BAYER S.A. y Otorgado por ASCOLFI en el XXIII Congreso de la Asociación, Bogotá, Julio 3-6 de 2002

RESUMEN

Plantas de la variedad SP 71-6163 afectadas por el virus del síndrome de la hoja amarilla de la caña de azúcar (ScYLV), se sembraron en condiciones de invernadero para purificar el agente causal y producir anticuerpos específicos. La metodología de purificación utilizada fue la de Lockhart (1999) modificada, agregando la enzima Celluclast 1,5 L a la solución de extracción. Las preparaciones parcialmente purificadas fueron evaluadas por microscopía electrónica en el laboratorio de la unidad de virología del CIAT para verificar la concentración de partículas virales. Una vez obtenida una alta concentración el semipurificado se ultracentrifugó en un gradiente de densidad de sucrosa de 10-40% para incrementar la pureza del virus. El purificado obtenido se empleó como antígeno en la producción de inmunoglobulinas específicas inyectando conejos de la raza Nueva Zelanda durante cuatro semanas en una concentración de 1mg ScYLV/ml, para luego evaluar el antisuero mediante técnicas de microscopía electrónica y TBIA. Se encontró una alta concentración de partículas virales en semipurificados empleando Celluclast 1,5 L al 2%. La relación de absorbancia A_{260}/A_{280} fue de 1,49 y la concentración viral aproximada de 1,87 mg/ml. El anticuerpo producido se utilizará en pruebas serológicas de ISEM y tissue-blot para el diagnóstico del ScYLV en la zona azucarera del Valle del Cauca.

Palabras claves: caña de azúcar, síndrome de la hoja amarilla, antisuero.

SUMMARY

Plants of SP 71-6163 variety positive for the virus of the sugarcane yellow leaf syndrome (ScYLV) were sowed under greenhouse conditions to purify the causal agent and to produce specific antibodies. The methodology used for purification was that of Lockhart (1999) modified by CENICAÑA, adding the Celluclast 1,5 L to 2% enzyme to the extraction buffer. The purified of the obtained virus were evaluated by electronic microscopy in the laboratory of the Virology Unit at CIAT in order to verify viral particles concentration. Once obtained a high concentration of virus particles, the purified were put on a sucrose gradient with density of 10-40 % to increase the purity of the virus which was determined later in the spectrophotometer. The purified obtained was used as antigen in the production of immunoglobulin by injecting New Zealand rabbits during four weeks by a concentration of 1mg ScYLV/ml. The antiserum was evaluated by ISEM and TBIA. High concentration of virus particles was found by adding 2 % Celluclast 1,5 L. The absorbance A_{260}/A_{280} was of 1.49 and the approximate viral concentration of 1.87 mg/ml. The antibody produced will be used for serological tests of ISEM and TBIA in the diagnosis of the ScYLV in the sugarcane area of the Cauca Valley.

Key words: Sugarcane, Yellow leaf syndrome, antibody

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la región azucarera del Valle del Cauca se enfrenta a una enfermedad de origen viral potencialmente importante, el síndrome de la hoja amarilla (ScYLV), el cual está infectando vertiginosamente los cultivos de caña de azúcar debido a la rápida diseminación por vectores, su difícil detección en el campo por la variabilidad de su infección y a la gran cantidad de variedades susceptibles (Victoria et al, 1998).

Entre 1990 y 1991 se observaron los primeros síntomas de amarillamiento en las plantas, en la parte sur del Brasil, específicamente en la zona productora de caña de azúcar del estado de Sao Paulo (Lima et al, 1995, Vega et al, 1997). Para 1992 el síndrome de la hoja amarilla estaba presente en la mayoría de cultivos de la variedad SP 71-6163, de la zona de Sao Paulo la cual representaba el 25% de la caña cultivada en esta zona. En esta variedad se registraron síntomas

severos, indicando la alta sensibilidad de la variedad al virus. Los síntomas en la variedad SP 71-6163, no son visibles en hojas nuevas, solamente hay evidencia de éste en las hojas maduras. Los primeros síntomas se presentan como un amarillamiento intenso de la nervadura en las hojas viejas, se observa además, una coloración rojiza en la superficie axial de la nervadura. La decoloración subsiguiente se esparce, desde de la punta hacia la base de la hoja y se desarrolla eventualmente síntomas de necrosis. Las raíces y los tallos se debilitan en su crecimiento y la producción se reduce significativamente (Vega et al, 1997).

La etiología del ScYLV, fue puesta en duda por mucho tiempo. Factores abióticos incluyendo compactación del suelo, desbalance nutricional, falta de agua y condiciones climáticas adversas fueron sugeridos como posibles causantes de la enfermedad. Sin embargo, el patrón de los síntomas y su distribución en el campo sugerían que podría ser debido a un agente biótico, opinión que fue

sustentada cuando se asociaron los síntomas con presencia de partículas virales en los tejidos. En 1994 los síntomas fueron asociados con la presencia de un *closterovirus* por medio de la prueba de de detección de dobles cadenas de ARN (Borth et al, 1994). En 1997 Vega et al, encontraron partículas de *luteovirus* en los tejidos del floema por medio de pruebas citológicas y se acercaron a los primeros estudios de purificación, basados en las metodologías para el virus del enanismo amarillo de la cebada (Barley Yellow Dwarf *luteovirus* BYDV). Dos patógenos Sugarcane Yellow Leaf Virus ScYLV (Lockhart et al, 1995, Irey et al, 1996; Vega et al, 1997) y Sugarcane Yellow Leaf Phytoplasma (ScYLP) (Cronje et al, 1997) han sido registrados y asociados a síntomas del síndrome de la hoja amarilla de la caña de azúcar.

En el 2000 Scagliusi y Lockhart, ratificaron los resultados de Vega et al., 1997, indicando que la enfermedad era causada por un *luteovirus* con partículas de 25 a 29 nm de

diámetro el cual denominaron como "Sugar-cane Yellow Leaf Virus". Sin embargo, utilizando los últimos sistemas de taxonomía se clasificó nuevamente el agente causal como un virus del género *polerovirus*, familia *luteoviridae*. (Moonan y Mirkov, 1999).

El síndrome de la hoja amarilla se registró por primera vez en Colombia en mayo de 1998, en la variedad SP 71-6163 introducida del Brasil en 1987 (Victoria et al, 1998; Victoria et al, 1999). Esta enfermedad se transmite al usar semilla vegetativa infectada y por la acción vectora de los áfidos *Melanaphis sacchari* y *Rhopalosiphum maidis* presentes en las zonas azucareras del país. Entre octubre de 1998 y marzo de 1999, la enfermedad se observó ampliamente distribuida en la región azucarera aunque con mayor incidencia en la zona sur (Victoria et al., 1998; Victoria et al., 1999). La incidencia fue mayor en la variedad CC 85-96, seguida por las variedades ICC 93-02, MZC 82-11, CC 84-75 y PR 61-632, entre otras, produciendo efectos de disminución en la producción, especialmente en las variedades susceptibles CC 84-75 y CC 85-96.

La enfermedad puede diagnosticarse por diferentes técnicas serológicas entre ellas ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), TBIA (Tissue-Blot ImmunoAssay), DBIA (Dot-Blot ImmunoAssay) y por la observación al microscopio electrónico de las partículas virales purificadas a partir de tejido enfermo (Schenck y Lockhart, 1997; Victoria et al, 1998; Scagliusi y Lockhart, 2000; Guzmán y Victoria, 2001). El proceso de purificación para la producción del antisuero específico se ha dificultado debido a la ubicación restringida del virus a los tejidos del floema de la planta y a la baja concentración de partículas virales en los tejidos, lo que hace más difícil su extracción; además a la ausencia de síntomas en plantas infectadas debido a las diferencias de comportamiento de las variedades de caña cultivadas y a la carencia de hospedantes alternos de rápido crecimiento (Lockhart et al, 1995; Vega et al, 1997; Scagliusi et al, 2000).

Actualmente en CENICAÑA la enfermedad del síndrome de la hoja amarilla de la caña de azúcar se diagnostica con las pruebas serológicas TBIA y DBIA utilizando antisueños importados con las limitaciones que implica su adquisición. Para obviar estas dificultades se planeo en esta investigación producir localmente un antisuero específico para el diagnóstico del ScYLV, previa la purificación del agente causal del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó bajo condiciones de invernadero en la estación experimental de San Antonio de los Caballeros del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA, localizada en el municipio de Florida departamento del Valle del

Cauca, a una altura de 980 metros sobre el nivel del mar, precipitación de 1140 mm/año, temperatura promedio de 23,5 °C y humedad relativa del 76%, y en los laboratorios de fitopatología y virología de CENICAÑA y CIAT respectivamente.

Para el proceso de purificación se utilizaron plantas de la variedad SP 71-6163 afectadas por ScYLV previamente diagnosticadas como positivas por TBIA para síndrome de la hoja amarilla, las cuales se sembraron en macetas plásticas (11x14x11 cm); se empleó como substrato una mezcla de tierra y arena zarandeada estériles en proporción 2:1 respectivamente. El tratamiento que se dio al material sembrado consistió en un riego suministrado diariamente y fertilización semanal.

Purificación del virus del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV)

Debido a que el proceso de purificación del ScYLV ha presentado dificultades por su restricción a los tejidos del floema y a la variabilidad de la infección de acuerdo con la variedad afectada, se probaron tres metodologías de purificación (Tabla 1):

- Protocolo propuesto para purificación de virus en general (Lockhart, 1999)
- Protocolo para ScYLV (Scagliusi y Lockhart, 2000)
- Protocolo modificado en CENICAÑA para el ScYLV

En cada una de las metodologías se estableció un control estricto sobre los tiempos de centrifugación, concentraciones y pH de los tampones de extracción, esterilización de los materiales, cantidad y forma de picado del tejido. Todas las purificaciones realizadas en las diversas pruebas fueron observadas al microscopio electrónico en el laboratorio de virología del CIAT para determinar la concentración de partículas virales en ellas.

Una vez determinada la mejor metodología en la que se obtuvieron semipurificados limpios, sin daños de las partículas y una aceptable concentración de ellas, se desarrollaron cambios para estandarizar el proceso y mejorar los resultados del protocolo seleccionado.

Edad fisiológica y tipo de tejido para la purificación del virus

Con la metodología estandarizada, se rehicieron varios ensayos para determinar la edad de las plantas más adecuada para realizar el proceso de purificación. Se seleccionaron plantas en el campo, se marcaron varios tallos por cepa y se colectó de cada tallo seleccionado la hoja TVD (primera hoja con cuello visible); a éstas se les realizó la prueba de TBIA (Guzmán y Victoria, 2001). Los tallos que resultaron positivos para la enfermedad fueron utilizados como semilla para

sembrar sus yemas en condiciones de invernadero, se sembraron 50-100 plantas. Una vez desarrolladas las plantas se tomaron 100 gramos de tejido para purificar el virus a diferentes edad de las plantas: 15, 20, 30 y 60 días después de la siembra, las pruebas de 6 y 12 meses se desarrollaron con plantas enfermas de campo. El material fue recolectado tomando sólo la parte más joven de la planta, (hojas del cogollo hasta la hoja TVD) presumiendo allí una alta concentración de virus. También se realizaron pruebas para determinar el tipo de tejido y el más adecuado para realizar la purificación, tomando 100 g de cada tipo de tejido de plantas que previamente habían resultado positivas para ScYLV. Los tipos de tejidos utilizados fueron: hojas de cogollo, hoja TVD sin nervadura y hoja TVD con nervadura, nervaduras de hoja TVD y entrenudos de tallo.

Cuantificación de la concentración viral

Las preparaciones obtenidas en cada metodología probada se analizaron en la Unidad de Virología del CIAT por medio de microscopía electrónica evaluando concentración viral (número de partículas por campo). A partir de los semipurificados con presencia de una alta concentración de partículas virales se seleccionaron las muestras aptas para ser sometidas a un gradiente de densidad de sucrosa de 10-40 %, para de esta forma obtener un virus más purificado. Posteriormente se analizó la suspensión final del virus de la mejor metodología diluida (1/100) en un espectrofotómetro, dentro de un rango de longitud de onda comprendida entre 220 y 320 nm (Rango luz ultravioleta). La pureza y la concentración (mg ScYLV por mL) se determinaron midiendo la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} y utilizando la fórmula: $A_{260} \times \text{dilución} / \text{coeficiente de extinción del virus}$.

Método de inmunización para obtener antisuero

El método de inmunización utilizado consistió en inyectar el purificado del virus de la mejor metodología en los cojinetes de las patas traseras de un conejo de la raza Nueva Zelandia de 3 meses de edad. La inmunización se basó en la aplicación de cuatro inyecciones de 0,3 mL de la suspensión viral (1mg/mL), los cuales previamente habían sido mezclados con un volumen igual de coadyuvante de Freund completo para la primera inyección e incompleto para las siguientes.

Las inyecciones se administraron con una semana de intervalo. La sangre se comenzó a colectar un mes después de la primera inyección y se continuó semanalmente hasta doce semanas después, teniendo cuidado de privarlo de comida por lo menos 18 horas antes de cada sangría. La sangre (5-10 mL) se colectó de la oreja de los conejos inmunizados en tubos de centrifuga y se llevó luego a un baño

Tabla 1. Comparación de los protocolos usados para la purificación del virus del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV).

Protocolo general para purificación de virus (Lockhart, 1999)	Protocolo para ScYLV (Scagliusi y Lockhart, 2000)	Protocolo para ScYLV modificado CENICAÑA
1. Colectar 100 g de tejido enfermo y picar en pequeños pedazos.	1. Colectar 100 grs. De tejido infectado, picar en pequeños pedazos y congelar a -90°C.	1. Colectar 100 gramos de hojas enfermas, cortarlas en pequeños pedazos, congelarlas con Nitrógeno líquido y pulverizarlas con hielo seco en un molidor de café. Adicionar, Celluclast 1,5 L al 2 % (Novo Nordisk Biochemich North America, Inc., Franklinton), solución fosfato 250 mM, pH 6,0 (2,5 volúmenes p/v) y 0,2% de 2-Mercaptoethanol y dejar mezclando a temperatura ambiente tres a cuatro horas
2. Adicionar 250 ml tampón fosfato 250 mM pH 6,0 más 0.5% de 2-mercaptoethanol	2. Moler o pulverizar con un molidor de café con ayuda de hielo seco.	2. Homogenizar en licuadora.
3. Homogenizar y filtrar a través de gasa.	3. Mezclar con 3 volúmenes (v/v) (100g / 300 ml) de tampón fosfato pH 6,0, 250 mM, conteniendo 0.2% (v/v) de 2-mercaptoethanol, 2% (v/v) de Celluclast 1.5 L (Novo Nordisk Biochemich North America, Inc., Franklinton).	3. Filtrar con una malla de 200 mesh de nylon.
4. Agregar 2,5 mL de tritón X-100 al 33% y agitar por una hora.	4. Agitar por 4 horas a temperatura ambiente.	4. Adicionar 2.5 ml de tritón X-100, al 33% y agitar a 4°C por una hora.
5. Centrifugar de 10.000 a 12.500 r.p.m. por 10 minutos	5. Filtrar a través de gasa.	5. Centrifugar a baja velocidad 10000 r.p.m. por 10 minutos.
6. Colectar el sobrenadante y colocarlo sobre 5 ml de un colchón de Sucrosa 30% en tampón fosfato 100 mM, pH 7.0 y centrifugar a 42.000 r.p.m. por una hora.	6. La fibra se re-extrae con 1 volumen de tampón de extracción sin celluclast, 1,5 L.	6. Filtrar el sobrenadante a través de gasa.
7. Resuspender el precipitado en tampón fosfato 100 mM pH 7,0 y agregar un volumen igual de cloroformo.	7. Mezclar los filtrados y adicionar tritón X-100 con una concentración de 0,8% (v/v).	7. Centrifugar a 42000 r.p.m. por una hora a 4°C sobre un colchón de Sucrosa al 30% en tampón fosfato 100 mM pH 7,0.
8. Centrifugar a 12.500 r.p.m. por 10 minutos.	8. Agitar por toda la noche a 4°C.	8. Resuspender el precipitado toda la noche en 100 mM pH 7,0
9. Colectar el sobrenadante, que contendrá el semipurificado parcial	9. Clarificar por extracción con un volumen igual de cloroformo-n-butanol, (1:1 v/v), y centrifugar 10.000 r.p.m. por 15 minutos	9. Clarificar con un volumen igual de cloroformo (1:1) y agitar en vortex.
10. Evaluar por microscopía electrónica	10. Colectar la fase acuosa y concentrar el virus adicionando 10% de PEG (PM 10.000) y 2% (v/v) de NaCl.	10. Centrifugar a baja velocidad (10000 r.p.m. por 10 minutos).
11. Colocar en gradiente de Cloruro de Cesio (10-30%) y centrifugar a 42.000 r.p.m. por 3 horas	11. Centrifugar a 10000 r.p.m. por 20 minutos.	11. Recolectar el sobrenadante.
12. Colectar la banda del virus purificado.	12. Resuspender el precipitado en tampón fosfato 100 mM pH 7,0, conteniendo 0,65% (v/v) de Tritón X-100.	12. Centrifugar a 42000 por una hora con o sin colchón de sucrosa al 30%.
13. Evaluar al microscopio electrónico.	13. Clarificar por centrifugación a 13000 r.p.m. por 15 minutos	13. Resuspender el precipitado en 100 mM de tampón Fosfato pH 7,0 por toda la noche.
	14. Ultracentrifugar a 42000 r.p.m./90 minutos, sobre un colchón de sucrosa al 30 % en tampón fosfato pH 7,0.	14. Centrifugar a 5.000 r.p.m. por 5 minutos y recoger el sobrenadante.
	15. Resuspender el precipitado en tampón fosfato 100 mM PH 7,0. y evalúa por Microscopía electrónica.	15. Observar al microscopio electrónico.
		16. Pasar por un gradiente de sucrosa del 10-40 % si es necesario

maría a 37 °C durante 60 minutos, se centrifugó luego a 2750 r.p.m. durante 15 minutos, se recolectó el sobrenadante y se sometió nuevamente a centrifugación éste por cinco minutos a 3500 r.p.m. para eliminar completamente los glóbulos rojos. Los antisueros obtenidos de cada una de las sangrías se marcaron y se transfirieron a tubos pequeños (1mL) congelándose a -20 °C.

Preparación de Inmunoglobulina (IgG) para el ScYLV

Con el fin de aumentar la especificidad del antisuero obtenido en cada sangría, éste se purificó precipitando las proteínas que aún pudiera contener, utilizando la metodología de Ball et al (1990). Esta consistió en adicionar por cada ml de antisuero, 1 mL de agua destilada estéril y 1,3 mL de sulfato de amonio saturado pH 7,0-7,2, se agitó por 30 minutos y se refrigeró toda la noche, luego se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 minutos y colectó el precipitado, éste se resuspendió en 1 ml con tampón fosfato salino PBS 0,01 M conteniendo NaCl 0,15 M. Se repitió la precipitación de proteínas adicionando 1 mL de agua destilada estéril y 1.02 ml de sulfato de amonio saturado por ml de precipitado resuspendido, se agitó por 30 minutos y se centri-

fugó nuevamente a 8000 r.p.m. por 10 minutos. El precipitado que contiene las Ig G purificadas se resuspendió en PBS con la mitad del volumen original del antisuero y se congeló a -20 °C para emplearse posteriormente en las pruebas serológicas.

Pruebas serológicas con el antisuero de ScYLV

El antisuero específico se usó en las pruebas serológicas de TBIA (Guzmán y Victoria, 2001) e ISEM (Derrick, 1973). Para el caso de TBIA se ensayaron diluciones de 1:5000, 1:6000, 1:7000, 1:8000 y 1:9000 de los antisueros de cada una de las sangrías obtenidas, como muestras positivas se utilizaron impresiones del tejido de la nervadura central de la hoja TVD proveniente de la variedad SP 71-6163 con ScYLV, las cuales se imprimieron en membranas de nitrocelulosa. Se tomó como testigo negativo, plantas sanas de la variedad MZC 74-275. El proceso de diagnóstico que se siguió fue el de Shenck et al (1997) y Guzmán y Victoria (2001).

Para la técnica de ISEM se tomó tejido enfermo de hojas del cogollo de la variedad SP 71-6163 con el cual se procedió a probar diferentes variantes a saber: 1. Macerado de tejido más Celluclast 15 L (1 hora) más anti-

sueros puro. 2. Macerado de tejido sin Celluclast 1,5 L más antisuero puro. 3. Macerado de tejido sin Celluclast 1.5 L y sin antisuero. 4. Macerado de tejido con Celluclast 1.5 L (1 hora) sin antisuero. 5. Semipurificado más antisuero puro. 6. Semipurificado sin antisuero.

El procedimiento para ISEM usado fue el de Derrick (1973) teniendo en cuenta cada una de las variaciones. Con esto se seleccionó la mejor variante de captura de las partículas vírales mediante la técnica de microscopía electrónica, evaluando concentración viral (# partículas por campo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Metodologías para la purificación del virus

En la purificación del virus del síndrome de la hoja amarilla de la caña de azúcar, utilizando la metodología general de virus propuesta por Lockhart, 1999 (Tabla 1), la cual se caracteriza por el empleo de bajos volúmenes de cloroformo y soluciones y sin el uso del Celluclast 1.5 L (Novo Nordisk Biochemich North America, Inc., Franklinton); la concentración viral se vio reducida debido a que el virus se encuentra restringido al tejido

del floema y se necesita de algún agente que lo pueda liberar.

La otra metodología que se ensayó fue la propuesta por Scagliusi y Lockhart (2000) para purificación de ScYLV. El proceso utiliza la enzima del Celluclast 1.5 L (2 %) (Novo Nordisk Biochemich North America, Inc., Franklinton) adicionado a la solución de extracción, se observó una mayor concentración viral con relación al protocolo general (Tabla 1) para purificación de virus (Lockhart, 1999), debido a que la enzima rompe las paredes celulares dejando libre las partículas vírales (Figura 1 A-D). Esta técnica utiliza cantidades altas de cloroformo y butanol que pueden resultar poco favorables para el virus ya que lo puede degradar. A pesar de todo, la concentración viral aun se mostró muy baja para inmunizar los conejos y la adición de productos como PEG al 10% y NaCl al 2%, no produjeron incremento en la concentración viral.

La metodología modificada por CENICAÑA (Tabla 1) resultó ser la más efectiva para la purificación del virus; en esta técnica a la solución de extracción le fue adicionado Celluclast 1.5 L al 2% (Novo Nordisk Biochemich North America, Inc., Franklinton). La adición de esta enzima celulolítica permitió el rompimiento de los enlaces β -glucosídicos de la celulosa de las paredes de las células y de esta manera el virus se liberó fácilmente de las células del floema (Figura 1 A-C) y la concentración viral aumentó en comparación con la metodología general propuesta por Lockhart (1999) y la de Scagliusi y Lockhart, (2000) para ScYLV. Además, la agitación a temperatura ambiente durante 4 horas del tejido picado con la solución de extracción y el Celluclast 1.5 L, promovió la disgregación del virus antes de los procesos de limpieza (Figura 1-D).

En la técnica modificada se encontró que es necesario mantener el tejido en condiciones controladas de frío utilizando nitrógeno líquido, evitando así que el tejido se humedezca para posteriormente triturar finamente el tejido en un moledor de café con la ayuda de hielo seco. Las centrifugaciones a baja velocidad fueron uniformizadas a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. La primera centrifugación a alta velocidad debe realizarse siempre sobre un colchón de sucrosa al 30% para disminuir el efecto de pérdida del virus (Tabla 2).

Es también necesario dejar el precipitado en resuspensión por un tiempo mínimo de 12 horas para favorecer la disgregación del virus, este tiempo no debe excederse porque pueden presentarse contaminaciones por bacterias. El uso de bajas concentraciones de cloroformo incidió en que el virus no se degradara. Es importante una última concentración del virus a alta velocidad de centrifugación (42000 r.p.m. x 1 hora) con o sin colchón de sucrosa, para obtener menores volúmenes de resus-

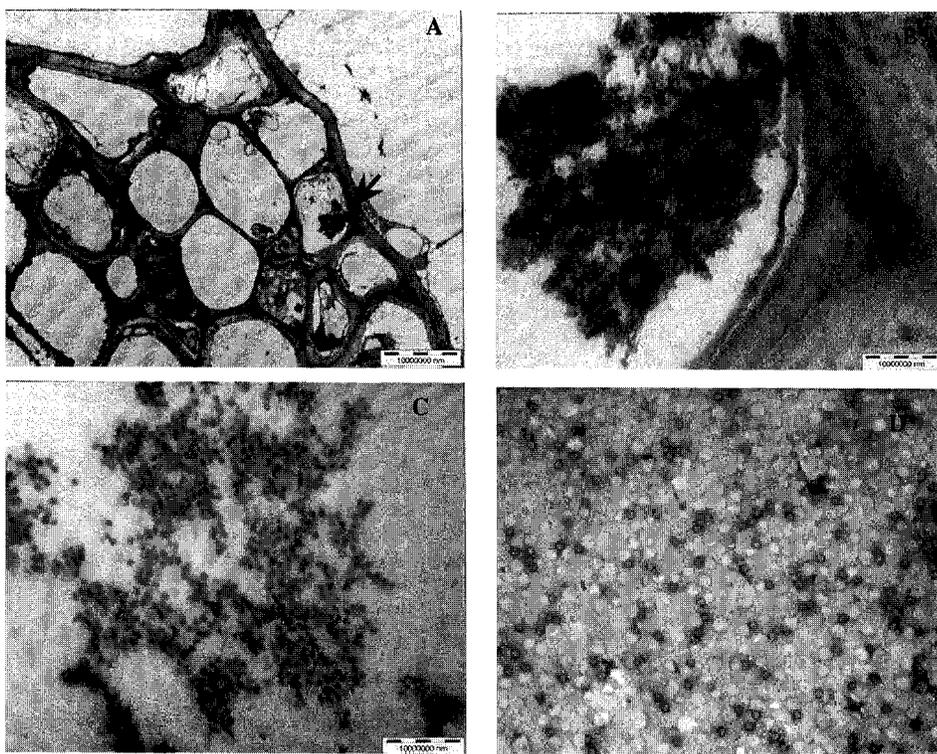


Figura 1. Corte de tejidos del floema. A-C. Partículas virales dentro de la célula D. Observación por microscopía electrónica del virus purificado siguiendo el protocolo general de purificación propuesta por Lockhart 1999 con adición de Celluclast 1.5 L en el proceso de purificación.

pensión y de esta forma tener una alta concentración del virus (Figura 1-D).

Edad fisiológica y tipo de tejido para purificar el virus

Se encontró que las mejores muestras para usar en la purificación del virus corresponden a tejido joven (hojas de cogollo y hoja TVD) de plantas entre 30 y 60 días que no hayan recibido procesos de congelamiento, pues en estas muestras se observó un promedio mayor de partículas virales mediante microscopía electrónica. Los materiales jóvenes presentan también mayores ventajas para su manejo, especialmente en el proceso de trituración. Materiales de mayor edad, entre 6 y 12 meses y tejido de nervaduras de hojas y entrenudos de tallo mostraron promedios bajos en concentración de partículas y además son difíciles de triturar.

Tabla 2. Evaluación de los antisueros de las diferentes sangrías para la detección del virus del síndrome de la hoja amarilla ScYLV, mediante la técnica serológica TBIA.

Sangría	Dilución del antisuero				
	1:5000	1:6000	1:7000	1:8000	1:9000
1 y 2	-	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4, 5 y 6	-	+	-	-	-
7, 8 y 9	-	-	-	-	-
10, 11 y 12	-	-	-	-	-

+: Detección positiva a la enfermedad -: Detección negativa a la enfermedad

Cuantificación de la concentración viral

Las preparaciones del virus purificado de la metodología modificada en Cenicaña tuvieron una relación de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1,49 y su concentración fue de 1.87 mg ScYLV/ml. La concentración del virus permitió preparar las diferentes dosis que fueron utilizadas en el proceso de inmunización y producción del antisuero específico.

Método de inmunización para obtener antisuero

Al finalizar la aplicación de las dosis y al cumplirse la quinta semana se iniciaron las sangrías del conejo realizándose doce en total. Con cada sangría se obtuvo un antisuero más específico, precipitando las proteínas que aún pudiera contener, utilizando la metodología de Ball et al (1990). El precipitado se resuspendió en PBS con la mitad del volumen original del antisuero y se congeló para em-

plearse en la realización de las pruebas serológicas.

Pruebas serológicas con el antisuero de ScYLV

El antisuero de cada una de las sangrías se evaluó por la técnica serológica de TBIA y se observó una reacción positiva específica del antisuero sobre el patógeno presente en las nervaduras de las plantas enfermas, a partir de la primera hasta la sexta sangría, siendo la tercera sangría la demás alto título al poder emplearse en un rango de dilución que va de 1:5000 a 1:8000 (Tabla 2).

La primera y segunda sangría también mostraron resultados óptimos ya que respondieron específicamente en las diluciones realizadas entre 1:6000 a 1:8000. De igual manera, de la cuarta a la sexta sangría respondieron de manera específica solo en la dilución 1:6000 (Tabla 2).

Las sangrías posteriores no mostraron ninguna reacción positiva a las diferentes diluciones de anticuerpos, lo cual puede ser debido a que la concentración de anticuerpos producidos por el conejo se disminuyó con el paso del tiempo. En las impresiones de nervaduras de plantas sanas no se observó ninguna reacción positiva en ninguna de las diluciones de los antisueros utilizados.

Para la técnica de ISEM se utilizó el mejor antisuero que fue el de la tercera sangría. Se observó que cuando se usa el Celluclast 1.5 L adicionado a la solución de macerado de tejido y dejándolo por una hora y adicionándole luego el antisuero específico se detecta una captura de las partículas virales con mayor especificidad que cuando se utiliza solo el antisuero sin usar el celluclast en el proceso de maceración (Tabla3).

Se observó además que el antisuero preparado en este estudio actuó específicamente mostrando una mayor captura de partículas virales en los mismos semipurificados utilizados para la inmunización de los conejos de este trabajo que cuando se observó el semipurificado sin adicionarle el antisuero (Tabla 3, Figura 2). En las variantes de macerado del tejido con Celluclast 1.5 L y tejido macerado sin Celluclast 1.5 L y sin utilizar el antisuero, no hubo detección de partículas vírales (Tabla 3).

CONCLUSIONES

- Se purificó el virus causante de la enfermedad del síndrome de la hoja amarilla empleando la metodología modificada en CENICAÑA, y al adicionar la enzima celulolítica Celluclast 1.5 L al 2 % (Novo Nordisk Biochemich North America, Inc., Franklinton) a la solución de extracción se aumentó considerablemente la concentración de partículas virales.
- El material óptimo para purificar el agente causal del virus del síndrome de la hoja amarilla debe ser tejido joven prove-niente

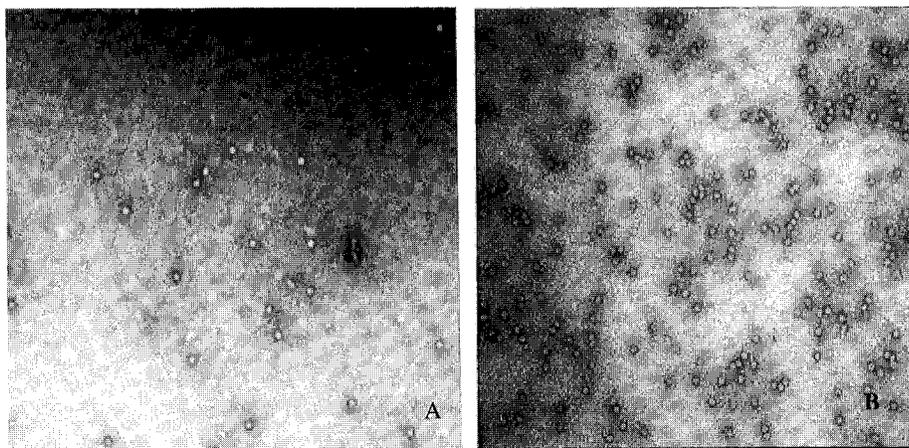


Figura 2. Captura específica de partículas virales extraídas de plantas de caña de azúcar afectadas por ScYLV. A. Semipurificado sin antisuero. B. Semipurificado con antisuero.

Tabla 3. Comparación del uso del Celluclast 1.5 L y el antisuero específico en la captura de partículas mediante la prueba serológica de ISEM.

Muestra	Sin antisuero	Con antisuero
Tejido sin Celluclast	-	+
Tejido con Celluclast	-	++
Semipurificado	+	+++

- = No partículas vírales (0), + = bajo número de partículas vírales (1-2), ++ = Número moderado de partículas vírales (5-10), +++ = Alto número de partículas vírales (>10)

de hojas de cogollo hasta la TVD sin congelar y con edad de las plantas de 30 a 60 días, donde se encontró una alta concentración de partículas virales.

- Se obtuvo un purificado con una relación de absorbancia A_{260}/A_{280} igual a 1.49 y una concentración viral de 1.87 mg ScYLV/mL.
- Se obtuvo antisuero específico contra el ScYLV para ser empleado en la técnica serológica de TBIA en un título de 1:5000 a 1:8000.
- El empleo del celluclast 1.5 L al 2 % (Novo Nordisk Biochemich North America, Inc., Franklinton) en la técnica serológica ISEM, mostró beneficio en la captura de las partículas virales del ScYLV.
- Por medio de ésta metodología se puede seguir produciendo un antisuero específico con un alto título para ser utilizado en pruebas de diagnóstico de la enfermedad en campos de caña de azúcar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ball, E. M.; Hampton, R. O.; De Boer, S. H. y Schaad, N.W. 1990. Cap Polyclonal antibodies in Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens, a laboratory manual. APS PRESS.
- Borth, W., Hu, J. S. y Schenck, S. 1994. Double strand RNA associated with sugarcane yellow leaf syndrome. *Sugarcane* 3: 4-5.

- Cronje, C. P. R.; Timón, A.; Jones, P.; y Bailey, R. A. 1997. Preliminary evidence for The association of phytoplasma with yellow leaf virus in Florida. In: Congress of the International Society of Sugarcane Technologist, 23, New Delhi, 22-26 february, 1999. Proceedings, ISSCT, 1999. V. 2. P. 366-372.
- Derrick, K.S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56: 652-653.
- Guzmán, M. L. y Victoria, J. I. 2001. Evaluación de cinco enfermedades de la caña de azúcar mediante dot-blot y tissue -blot a partir de la misma muestra de tejido. *Fitopatología Colombiana* 25(2):103-110.
- Irey, M. S.; Baucum, L.E.; Derrick; K.S.; Manjunath, K.L. y Lockhart, B. E. L., 1996. Incidence of the luteovirus associated with yellow leaf syndrome of the Florida commercial varieties. *Sugar y Azúcar* 91: 27.
- Lima, N.; Chinea, N. y Escalona, J., 1995. Síndrome de amarillamiento foliar de la caña de azúcar: situación actual en Brasil. Departamento de protección de plantas, INICA, MINAZ.
- Lockhart, B. E. L.; Irey, M. J. y Comstock, J. C.; 1995. Sugarcane Bacilliform Virus, sugarcane Mild Mosaic Virus and Sugarcane Yellow leaf Syndrome. Sugarcane germoplasm conservation and exchange report of an international workshop held in Brisbane Queensland, Australia 28 - 30 June Editors: B. J. Croft, C. M. Piggan.
- Lockhart, B. E. L., 1999. Procesos de purificación para virus en general, del tipo ba-

- ciliforme y filamentosos. Documento mimeografiado. 3 p.
- Moonan F. y Mirkov T. E. (1999): Development of methods for pathogen identification and of conventional and nonconventional strategies for control of yellow leaf syndrome of sugarcane. Texas A&M Agricultural Experiment Station, Weslaco, TX. 13 p.
- Scagliusi, M. S. y Lockhart, B. E. 2000. Transmission, Characterization, and Serology of Luteovirus Associated with Yellow Leaf Syndrome of Sugarcane. *Phytopathology* 90: 120-124.
- Schenck, S.; Hu, J. S., y Lockhart B. E. 1997. Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow virus in Hawaii. *Sugar Cane* 4:5-8.
- Vega, J; Scagliusi, S. M. M. y Ulian, J. E. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. *Plant Dis.* 81: 21-26.
- Victoria, J. I.; Garcés, F.; Guzmán, M. L. y Angel F. 1998. Síndrome de la hoja amarilla en Colombia ScYLV (Sugarcane Yellow Leaf Virus). *Carta trimestral (Cenicafía) Año 20. No. 2 y 3.* p. 3-7.
- Victoria, J. I.; Guzmán, M. L., y Cuervo E. 1999. Síndrome de la hoja amarilla en Colombia. Serie divulgativa # 7. Junio de 1999. Centro de Investigación de la caña de azúcar CENICAÑA. 4 p.

Reprinted with permission from Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI. Originally published in *Fitopatología Colombiana* 26(1-2): 67-72, Copyright 2002.