

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Proyecto:

“Transferencia tecnológica para la producción de semilla básica y prebásica de papa.”



Componente:

“Implementación del Laboratorio de Virología Vegetal en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.”

Informe Final

Elaborado por:

MSc. Dora Flores, Investigadora Principal

Ing. Karol Alpízar, Investigadora Adjunta



INTRODUCCIÓN:

Los virus son entes infecciosos submicroscópicos (no se pueden observar al microscopio de luz), que se propagan en el interior de células vivas y tienen la capacidad de producir una enfermedad.

Más de la mitad de los virus conocidos atacan y producen enfermedades a las plantas, un solo virus puede infectar una o varias especies y una planta puede ser atacada por más de un virus.

En su forma más simple los virus constan de un ácido nucleico y una cápside proteica que contiene al primero. Producen la enfermedad a través de la alteración del metabolismo de su célula hospedera, provocando la producción de sustancias anormales que influyen negativamente sobre sus funciones.

Debido a lo anterior, es importante determinar la calidad fitosanitaria de las plantas madres seleccionadas que van a ser utilizadas en los procesos de micropropagación con el fin de iniciar colecciones *in vitro*, o el establecimiento de plantaciones en campo, ya que si se emplea material enfermo habría una rápida diseminación del patógeno, evidenciando bajos rendimientos, mala calidad del producto obtenido y en algunos casos muerte de los materiales.

Por esta razón se hace necesario efectuar una evaluación periódica de diagnóstico a los materiales con que se está trabajando, para poder detectar cualquier contaminación y así aplicar medidas de control.

Para determinar la presencia de un virus en un tejido vegetal, se utilizan técnicas moleculares, de microscopía electrónica y/o serológicas. Dentro de estas últimas, las más importantes, debido a su sensibilidad, son las que utilizan conjugados y fases sólidas; una de ellas es la técnica inmunoenzimática denominada ELISA (del inglés, "Enzyme Linked Immuno-absorbent Assay"). Esta consiste en la detección de un antígeno viral utilizando un anticuerpo marcado enzimáticamente y que es

específico para la proteína que se desea detectar. Es una prueba muy utilizada y ha generado una basta información sobre la identificación de virus, su epidemiología y control (Cambra *et al.* ,1996).

JUSTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD:

El trabajo que realiza el Centro de Investigación en Biotecnología considera la conservación de germoplasma, el cultivo y multiplicación *in vitro* de especies de importancia económica.

Es por esta razón que se consideró importante implementar un Laboratorio de Diagnóstico de Virología Vegetal en el CIB, con el fin de apoyar los proyectos que ahí se desarrollen por lo que dentro del marco del proyecto *“Transferencia tecnológica para la producción de semilla prebásica y básica de papa en las zonas productoras de Costa Rica”*, se planteó esta actividad.

Las plantas madres con las que se inicia el cultivo *in vitro* en el CIB corresponden en su mayoría, a materiales provenientes del campo que han sido seleccionados considerando su alto rendimiento, calidad del producto y resistencia a plagas y enfermedades. Generalmente este material es introducido *in vitro* sin antes realizar una adecuada evaluación virológica del mismo.

Posteriormente se envían unas pocas muestras a un laboratorio de diagnóstico para verificar su estado fitosanitario a un costo económico alto. Si el análisis no se realiza podría tener repercusiones negativas, ya que en caso de estar contaminadas con algún virus, habría una diseminación de la enfermedad.

Por esta razón, es importante contar con un laboratorio para el diagnóstico viral en el Centro de Investigación en Biotecnología, que permita evaluar la condición fitosanitaria de los materiales con que se trabaja y así evitar la diseminación de patógenos en forma irresponsable.

Por otra parte, es recomendable efectuar una evaluación regular de las vitroplantas para conocer su estado fitosanitario durante el ciclo de multiplicación, y así saber si se ha dado alguna contaminación durante el proceso y así poder aplicar las medidas correctivas.

Inicialmente, el Laboratorio de Virología Vegetal enfocó sus actividades en la detección e identificación viral en plantas de papa; sin embargo, con la técnica ELISA y sus variantes se puede trabajar con otros microorganismos fitopatógenos tales como bacterias, fitoplasmas y espiroplasmas; causantes de enfermedades en especies de interés para el CIB.

OBJETIVOS:

- Implementar un laboratorio de Virología Vegetal en el Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR .
- Establecer algunos protocolos para las pruebas ELISA y sus variantes, empleadas en la detección de virus.

METODOLOGÍA

1- Acondicionamiento del área de trabajo.

Para acondicionar el área se solicitó al Departamento de Administración de Mantenimiento del Instituto Tecnológico de Costa Rica, la confección de mesas de trabajo y de estantes, llavines y la pintura para el área, con el propósito de contar con espacios adecuados para colocar el equipo, los reactivos y mantener el área de trabajo organizada.

2- Adquisición del equipo, productos químicos.

Se elaboró un listado de lo requerido para facilitar la búsqueda de opciones en catálogos y por internet en empresas distribuidoras a nivel nacional e internacional.

3- Solicitud de cotizaciones y compra de reactivos y equipo de laboratorio.

Se contactaron las empresas relacionadas con la venta de los equipos y los materiales y suministros que se requerían y se solicitaron las cotizaciones.

Se analizaron las distintas opciones y se procedió.

A continuación se detalla el equipo y reactivos adquiridos.

Equipo adquirido para el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación en Biotecnología

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN
1	Lector ELISA BioRad. Modelo 680
1	Repuesto para lámpara de lector
1	Set de rollos de papel para impresora de lector
1	Caja de reservorios para reactivos
1	Micropipeta Eppendorf 0.5-10ul y 96 puntas
1	Micropipeta Eppendorf 10-100ul y 96 puntas
1	Micropipeta Eppendorf 1000ul y 96 puntas
5	Gradillas para microtubos
1	Caja de tubos para microcentrífuga
1	Caja con 60 placas para ELISA (MaxiSorp)

Reactivos adquiridos para el laboratorio de virología del Centro de Investigación en Biotecnología

Cantidad	Descripción
1	Kit para el virus PLRV 1000 PRUEBAS
500 g	Sulfato de sodio anhidro
100 ml	Tween-20
25 g	Azida de sodio
250 g	Albúmina de huevo (Grado II)
500 g	Carbonato de sodio anhidro
250 g	Bicarbonato de sodio
250 g	Cloruro de sodio
500 g	Fosfato de sodio dibásico
500 g	Fosfato de potasio monobásico
500 g	Cloruro de potasio
100 g	Albúmina bovina (Fracción 5)
500 g	PVP (mol.wt 40 000)
250 g	Sulfito de sodio anhidro
500 g	Dietalonamina
100 g	Cloruro de magnesio anhidro



Fig. 1. Microplate Reader
BioRad. Modelo 680

4- Inicio de pruebas para el establecimiento del protocolo de trabajo.

Inicialmente se prepararon las soluciones amortiguadoras requeridas para llevar a cabo las pruebas de detección viral.

Para establecer una metodología de trabajo estándar se evaluaron dos protocolos: el suministrado por la casa comercial BioRad, para las pruebas DAS ELISA y el modificado por la Ing. Karol Alpízar; luego de analizar los resultados obtenidos, se eligió el sugerido por la Ing. Alpizar ya que fue más preciso en la obtención de los resultados. A continuación se describen ambas metodologías de trabajo:

PROTOCOLO PARA DAS-ELISA (PLRV) (SEGÚN KIT CASA COMERCIAL BioRad)

1-Paso: Cubrimiento de la placa con el anticuerpo

- Diluir el buffer coating (relación 1:5) en agua destilada.
- Diluir el anticuerpo de recubrimiento (relación 1:500) en el buffer coating.
- Para una placa utilizar:

Buffer coating	10 ml
Anticuerpo	20 μ l

Mezclar con cuidado antes de utilizar.

- Incubar 2 h a 37°C (las placas deben ser cubiertas con papel adhesivo).
- Lavar 3 veces con PBS-Tween.

2-Paso: Colocación de las muestras

- Macerar las muestras con el buffer de extracción a una relación 1:3, 1:5 ó 1:10. El macerado debe ser almacenado a +2°/-8°C durante 12 h.
- Los controles deben ser rehidratados en 1 ml de agua destilada, almacenados a +2°/-8°C.
- Incubar la placa con las muestras por una noche a +2°/-8°C.
- Lavar la placa 2 veces con PBS-Tween, seguidas de 2 lavados adicionales permitiendo el contacto del buffer con la placa durante 3 minutos.

3-Paso: Colocación del anticuerpo conjugado

- Diluir el buffer del conjugado (relación 1:5) en agua destilada.
- Diluir el anticuerpo conjugado (relación 1:500) en el buffer.
- Para una placa utilizar:

Buffer conjugado	10 ml
Anticuerpo conjugado	20 µl

Mezclar con cuidado antes de utilizar.

- Incubar por 2h a 37°C (las placas deben ser cubiertas con papel adhesivo).
- Lavar 3 veces con PBS-Tween.

4-Paso: Colocación del sustrato

- Diluir el buffer sustrato (relación 1:5) en agua destilada.
- Disolver la tableta de pNPP en buffer sustrato antes de usar.

Buffer sustrato	10 ml
pNPP	10mg

Emplear hasta que el pNPP se disuelva por completo.

- Incubar por 15 min a 37°C y luego a temperatura ambiente.

5-Paso: Resultados

-Lecturas de absorbancia (OD) a los 30 min, 1h y 2h, luego de haber colocado el sustrato a una longitud de onda de 405 nm.

-La validación e interpretación de la prueba ELISA se realiza con los valores de absorbancia de los buffer, controles y muestras, luego de la resta del valor de absorbancia del sustrato:

$OD \text{ muestras} = OD \text{ lectura cruda} - OD \text{ media de sustrato}$

-Los resultados pueden ser interpretados luego de haberse revisado lo siguiente:

*Los valores de los pozos de referencia (pozos del sustrato, buffer, controles) deben concordar con la calidad estándar de cada producto

*Los valores de las repeticiones deben ser similares.

-Lecturas a 3h y 4h, permiten una mejor discriminación para aquellas muestras que se encuentran en situación dudosa.

-Se consideran positivas aquellas muestras cuyo valor de absorbancia es 2 veces mayor al valor de absorbancia de los controles negativos. La muestra se considera en situación dudosa si el valor de OD es igual al de los controles negativos.

5- Análisis viral a materiales de papa del CIB.

Se realizaron varias pruebas DAS-ELISA para los virus PLRV, PVY, PVX, PVA y PVS con el propósito de evaluar el estado fitosanitario de algunas de las variedades de papa con las que cuenta el Centro de Investigación en Biotecnología. Actualmente se dispone de información para cada una de las variedades.

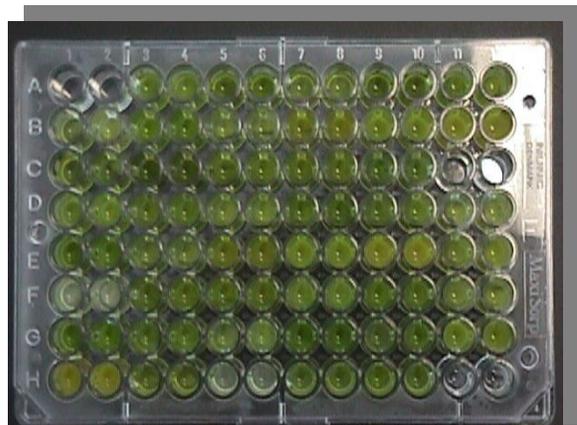


Fig. 2. Placa ELISA con muestras de papa

Para mejorar las condiciones fitosanitarias de los materiales de papa que dieron positivo, se dio inicio al cultivo de meristemos (metodología empleada en la limpieza viral). Luego de que los meristemos adquieran un desarrollo adecuado, serán micropropagados y evaluados nuevamente.

PROCOLO PARA DAS-ELISA **(Modificado por Karol Alpizar)**

El siguiente protocolo corresponde a un ejemplo para el análisis del virus PLRV. La concentración de los reactivos es la indicada por la casa comercial Agdia® y pueden variar en el caso que se utilicen reactivos de diferente casa o para el análisis de diferentes virus.

1-Paso: Cubrimiento de la placa con el anticuerpo

- Diluir el anticuerpo de recubrimiento para PLRV (1:200) en buffer coating 1X² (Anexo).
- Para una placa utilizar:

Buffer coating	10 ml
Anticuerpo	50 µl

- Mezclar con cuidado antes de utilizar.
- Incubar la placa por una noche a 4°C en cámara húmeda (la placa debe ser cubierta con papel adhesivo).
- Lavar 3 veces con PBS-Tween³ (Anexo).

2-Paso: Colocación de las muestras

- Macerar las muestras con el buffer de extracción general¹ (Anexo) a una relación de 1ml por 0,2g de tejido. El macerado puede ser almacenado a -20°C indefinidamente.

- Los controles positivos y negativos deben ser rehidratados con 2ml de buffer de extracción general y almacenados a -20°C .
- Incubar la placa por una noche a 4°C en cámara húmeda (la placa debe ser cubierta con papel adhesivo).
- Lavar la placa 2 veces con PBS-Tween, seguidas de 2 lavados adicionales permitiendo el contacto del buffer con la placa durante 3 minutos.

3-Paso: Colocación del anticuerpo conjugado

- Diluir el anticuerpo conjugado para PLRV (1:200) en buffer ECI 1X⁴ (Anexo).
- Para una placa utilizar:

Buffer conjugado	10 ml
Anticuerpo conjugado	50 μl

- Mezclar con cuidado antes de utilizar.
- Incubar por 2h a 37°C (las placas deben ser cubiertas con papel adhesivo).
- Lavar 3 veces con PBS-Tween.

4-Paso: Colocación del sustrato

- Disolver la tableta de pNPP en buffer sustrato⁵ (Anexo), de manera que se obtenga un concentración de 1mg/ml.
- Para una placa utilizar:

Buffer sustrato	10 ml
pNPP	10mg

- Mezclar hasta que la tableta de pNPP se disuelva por completo.
- Incubar a 37°C .

5-Paso: Resultados

- Realizar lecturas de absorbancia (OD) a 405nm a los 15min, 30min, 1h y 2h, luego de haber colocado el sustrato.

- La validación e interpretación de la prueba ELISA se realiza con los valores de absorbancia de los buffer, controles y muestras.
- Los resultados pueden ser interpretados luego de haberse revisado lo siguiente:
 - Los valores de los pozos de referencia (pozos del sustrato, buffer, controles) deben concordar con la calidad estándar de cada producto.
 - Los valores de las repeticiones deben ser similares.
- Se consideran positivas aquellas muestras cuyo valor es superior a la media de la absorbancia de los controles negativos más 3 veces su desviación estándar.

Bibliografía

Cambra, M; Gorris, M y Terrada, M. 1996. Sociedad Española de Fitopatología. Patología Vegetal. Tomo I. Phytoma. España. 695p.

Kemeny, D.M. 1991. A practical guide to ELISA. Pergamon Press. London. 136p.

ANEXO
FORMULACIONES DE LOS BUFFERS PARA ELISAS
(FOSFATASA ALCALINA)

¹Buffer de Extracción General

Disolver en 1000ml de PBST 1X:

Reactivo	Cantidad
Sulfito de Sodio anhidro (Na_2SO_3)	1.3 g
Poliyvinilpirrolidona (PVP) MW 24-40 000	20 g
Azida de sodio (NaN_3)	0.2 g
Albúmina de huevo (gallina), Grado II	2 g
Tween-20	20 g = 20ml

Ajustar pH a 7.4. Almacenar a 4°C.

²Buffer Coating (Buffer de recubrimiento de la placa)

Disolver en 1000 ml de agua destilada:

Reactivo	Cantidad
Carbonato de sodio anhidro(Na_2CO_3)	1.59 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	2.93 g
Azida de sodio (NaN_3)	0.2 g

Ajustar pH a 9.6. Almacenar a 4°C.

³Buffer PBST 1X (Buffer de lavado 1X)

Disolver en 1000 ml de agua destilada:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	1.15 g
Fosfato de potasio monobásico anhidro (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Tween-20	0.5 g=0.5 ml

Ajustar pH a 7.5. Mantener a temperatura ambiente.

⁴Buffer ECI (Buffer de dilución del anticuerpo conjugado)

Disolver en 1000 ml de PBST 1X:

Reactivo	Cantidad
Albúmina de suero bovina (BSA)	2 g
Poliyvinilpirrolidona (PVP) MW 24-40 000	20 g
Azida de sodio (NaN ₃)	0.2 g

Ajustar pH a 7.4. Almacenar a 4°C.

⁵Buffer PNP (Buffer sustrato para fosfatasa alcalina)

Disolver en 800 ml de agua destilada:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	0.1 g
Dietalonamina (C ₄ H ₁₁ NO ₂)	97 ml
Azida de sodio (NaN ₃)	0.2 g

Ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico (HCl). Ajustar el volumen final a 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C.