

NOTAS TÉCNICAS

UNA TÉCNICA SENCILLA PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTISUERO CONTRA EL VIRUS DEL BANDEADO AMARILLO DEL SORGO

A simple technique for the production of antisera to *Sorghum yellow banding virus*

Mario José Garrido, Gustavo E. Trujillo y Maximiliano Méndez

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica Agrícola, Laboratorio de Virología Vegetal, Apartado Postal 4579, Maracay 2101, Venezuela.

Fitopatol. Venez. 17:24-26, 2004.

Recibido: 28 de enero de 2004.

Aceptado: 07 de junio de 2004

En Venezuela, el sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] es infectado por varios virus, los cuales revisten especial interés debido a los daños económicos que pueden causar y porque en la mayoría de los casos no se posee suficiente material resistente para todos ellos y sus razas (3). De los virus que infectan al sorgo en Venezuela, el virus del bandeo amarillo del sorgo (*Sorghum yellow banding virus*, SYBV) es el virus identificado más recientemente. Este virus sólo ha sido señalado en EE.UU. (6) y en Venezuela (4), y la información disponible sobre el mismo es escasa.

El SYBV induce en las plantas infectadas síntomas de estrías y bandas cloróticas, enanismo, necrosis sistémica y eventualmente muerte de la planta. Se transmite mecánicamente con dificultad (2-10% de transmisión) y los síntomas aparecen 15-25 d después de la inoculación. Hasta el momento no se le conocen vectores. Presenta partículas isométricas de 25 nm de diám y un estrecho rango de huéspedes, limitado a las gramíneas (3,4,6). Tiene la particularidad de infectar algunas líneas de sorgo que son inmunes a todas las razas de los virus mosaico enanizante del maíz y mosaico de la caña de azúcar, y que son utilizadas como fuente de resistencia en los programas de mejoramiento de sorgo (3,4).

Una vía rápida y segura de identificar virus fitopatógenos es la serología. Para este tipo de pruebas se requieren antisueros específicos, y para producirlos se necesitan insumos y equipos de costo elevado. En Venezuela se han realizado algunas investigaciones dirigidas a la obtención de antisueros mediante esquemas sencillos de purificación con resultados muy halagadores (7,8,9). En atención a lo antes expuesto, y en vista de la importancia del sorgo como rubro agrícola en el país, el objetivo de esta investigación fue obtener antisuero contra el SYBV mediante la implementación de una metodología sencilla de "purificación".

Como fuente de virus se utilizaron plantas de sorgo cv Atlas inoculadas mecánicamente con un aislamiento del SYBV (4) que crecían en materos plásticos de 500 mL contentivos de una mezcla estéril de tierra y arena (3:1, v/v). Las plantas fueron inoculadas a los 8 d de edad y luego transferidas a un cobertizo protegido contra insectos, con temperatura controlada a 26-28 °C y 65-75 % hr, hasta su utilización. Fueron regadas diariamente y cada 15 d fertilizadas con una solución (2 g/L) de la fórmula completa 15-15-15 a razón de 50 mL/matero.

Para la purificación parcial del virus se tomó como referencia una metodología utilizada con éxito en la purificación parcial del virus del mosaico sureño de la cañota (8) con algunas modificaciones. El protocolo comprende homogeneización del tejido infectado en buffer fosfato de potasio con dos antioxidantes (mercaptoetanol y cisteína), clarificación con mezcla cloroformo-butanol, doble

precipitación del virus con polietilenglicol (PEG) 6000 en cloruro de sodio y centrifugaciones a baja velocidad (Fig. 1).

Las plantas con síntomas del virus (Fig. 2) fueron cosechadas 35 d después de la inoculación y refrigeradas a 4°C durante 3-4 h antes de la purificación. A las hojas se les eliminó la nervadura principal, se cortaron en secciones transversales de 2-5 mm y se colocaron en el buffer para su trituración en

Cortar finamente hojas de sorgo infectadas con el virus y triturarlas muy bien en una licuadora en presencia de buffer fosfato de potasio

(BFP) 0,1 M, pH 7,4 + 1% de 2-mercaptoetanol + 0,01 M de cisteína (1:3 p/v)

↓
Filtrar a través de cuatro capas de gasa

↓
Agregar al filtrado un volumen igual de mezcla fría de cloroformo:butanol (1:1, v/v), agitando suavemente. Dejar en agitación por 5 min a 4 °C

↓
Centrifugar a 12.000 g durante 5 min (eliminar el sedimento)

↓
Ajustar el sobrenadante a una concentración de 6% de polietilenglicol 6000 y 0,2 M de NaCl. Agitar durante 1 h

↓
Centrifugar a 12.000 g durante 10 min (eliminar el sobrenadante)

↓
Resuspender el sedimento en BFP 0,01 M, pH 7,4 (200 µL/g de tejido). Agitar durante 30 min

↓
Centrifugar a 12.000 g durante 10 min (eliminar el sedimento)

↓
Ajustar el sobrenadante a una concentración de 6% de polietilenglicol 6000 y 0,2 M de NaCl. Agitar durante 30 min

↓
Centrifugar a 12.000 g durante 10 min (eliminar el sobrenadante)

↓
Resuspender el sedimento en BFP 0,01 M, pH 7,4 (60 µL/g de tejido procesado). Agitar durante 30 min

↓
Centrifugar a 12.000 g durante 10 min (eliminar el sedimento)

↓
Recolectar cuidadosamente el sobrenadante (virus parcialmente purificado). Congelar a -15 °C

Fig. 1. Esquema de purificación parcial del virus del bandeo amarillo del sorgo.



Fig. 2. Plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) cv QL-11 infectadas en condiciones naturales con el virus del bandeo amarillo del sorgo.

una licuadora. Todo el proceso se realizó a 2-4 °C y no se hicieron ajustes de pH.

La determinación de la pureza del extracto parcialmente purificado y la concentración de los viriones se realizó mediante microscopía electrónica. Para ello, una alícuota del material parcialmente purificado se colocó en una rejilla de cobre previamente cubierta con colodión y una capa fina de carbón. Luego, la rejilla fue teñida con una solución de acetato de uranilo al 2 % y examinada en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi-300.

Para la obtención del antisuero contra el SYBV se utilizó un conejo, al cual se le suministraron seis inyecciones intramusculares con un intervalo de 7 d. Cada inyección consistía de 0,75 ml de suspensión viral (virus parcialmente purificado) homogeneizada con igual volumen de adyuvante incompleto de Freund. La extracción de la sangre del conejo se realizó por punción cardíaca 10 d después de la última inyección de antígeno. La separación del suero se realizó según Ball *et al.* (2). Para las pruebas serológicas se utilizó el método de doble difusión en agar o de Ouchterlony (1). El medio de

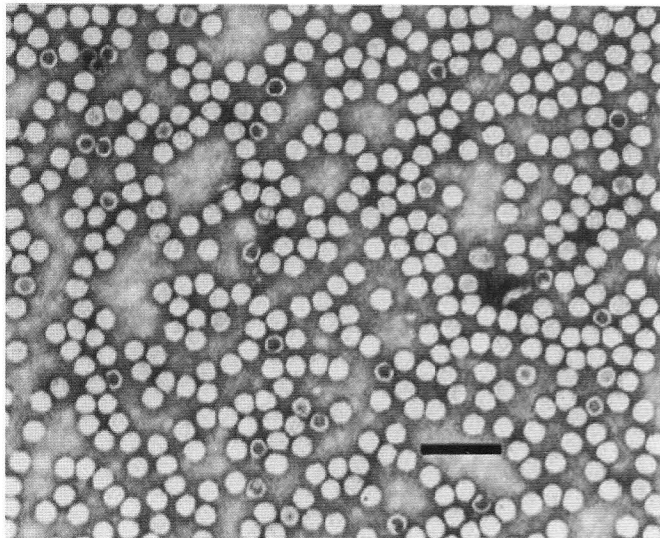


Fig. 3. Microfotografía electrónica de las partículas del virus del bandeo amarillo del sorgo purificado parcialmente. La barra representa 100 nm.

inmunodifusión consistió de 0,8 % de agar purificado y 0,25 % de azida de sodio en buffer fosfato salino; una vez preparado, se colocaron 12 ml de medio en cada placa de Petri de 100 x 15 mm. Los huecos realizados en el gel median 5 mm de diám y estaban separados 5 mm de un hueco central de igual medida (1). Para determinar el título del suero se utilizó este mismo método, y como diluyente buffer fosfato salino. Para la absorción del antisuero se siguió la metodología ya descrita (8) y los antígenos fueron preparados a partir de hojas de sorgo cv Atlas de 35-40 d de edad, sanas e infectadas.

A partir del material parcialmente purificado se observaron al microscopio electrónico partículas isométricas, de 25-26 nm, en alta concentración y con cierto grado de contaminación con restos del huésped (Fig. 3). La forma y el tamaño de la partícula coinciden con lo citado por otros autores para el SYBV (3,4,6). El remanente de proteína de planta observado con las partículas virales era de esperar, debido al proceso de purificación utilizado. Es importante destacar que la doble precipitación con PEG en presencia de NaCl (Fig. 1) disminuyó considerablemente la contaminación con proteína vegetal. Resultados similares han sido reportados al purificar parcialmente otros virus a través de protocolos sencillos (7,8,9). No se realizaron pruebas para determinar la infectividad de los viriones.

El antisuero obtenido presentó un título de 1:1024, y en las pruebas serológicas se observó una reacción positiva (formación de líneas de precipitación consistentes y bien visibles) entre el antisuero y su antígeno homólogo (SYBV). Sin embargo, también se evidenció una banda muy tenue con proteína de planta sana, lo que confirmó que la purificación no fue total. Otros investigadores (7,8,9) han obtenido resultados similares con otros virus al utilizar este tipo de protocolo de purificación, recurriendo a la absorción del antisuero para eliminar los anticuerpos no específicos contra el virus. Después de la absorción el antisuero obtenido contra el SYBV sólo reaccionó con su antígeno homólogo (Fig. 4) y no con proteína de planta sana. Además, el antisuero fue específico, ya que no reaccionó con otros virus que infectan al sorgo en Venezuela (MDMV-A, MDMV-V, SCMV-D, SCMV-MB, JGMV-O y MStpV)(3). El título del antisuero obtenido evidenció una alta inmunogenicidad del virus; esta característica también ha sido referida por otros investigadores

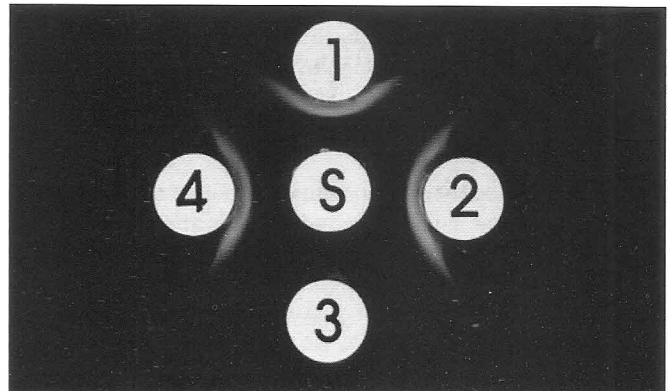


Fig. 4. Prueba de doble difusión en agar utilizando antisuero (S) absorbido contra el virus del bandeo amarillo del sorgo (SYBV). Los orificios laterales contenían extractos de plantas infectadas con aislados del SYBV provenientes de sorgo dulce cv Atlas (1), sorgo forrajero cv Stampede (2), maleza falso johnson (4) y savia de plantas de sorgo sanas (3).

(4,6). Mediante pruebas de Ouchterlony, el antisuero permitió detectar fácilmente al SYBV en muestras de plantas jóvenes y viejas de sorgo y falso pasto johnson [*Sorghum verticilliflorum* (Steud.) Stapf] procedentes del campo. Esta última especie constituye un huésped importante en la epidemiología del SYBV en Venezuela (5).

El hecho de obtener en esta investigación antisuero contra el SYBV con un título alto mediante una técnica sencilla es de gran interés para cualquier laboratorio, ya que puede ser de gran ayuda en el diagnóstico y estudios epidemiológicos de este virus. Estos resultados también pueden ser de interés para laboratorios o países que confronten problemas económicos para obtener materiales y equipos. Por otra parte, sería interesante probar este antisuero a través de otras técnicas serológicas más sensibles, como ELISA, ya que se utilizaría menos antisuero y permitiría procesar un mayor número de muestras.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a la Lic. M. Alfaro y al Téc. F. Centeno (INIA, Maracay) por su ayuda en el trabajo de microscopía electrónica.

LITERATURA CITADA

1. Ball, E. M. 1990. Agar double diffusion, plates (Ouchterlony): viruses. *In* Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. R. O. Hampton, E. M. Ball, and S. H. De Boer (eds.). Minnesota, APS-Press. pp. 111-120.
2. Ball, E. M., Hampton, R. O., De Boer, S. H., and Schaad, N. W. 1990. Polyclonal antibodies. *In* Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. R. O. Hampton, E. M. Ball, and S. H. De Boer (eds.). Minnesota, APS-Press. pp. 33-54.
3. Garrido, M. J. 2001. Virus que infectan al sorgo. *Revista UNELLEZ de Ciencia y Tecnología* 19: 30-53.
4. Garrido, M. J., Trujillo, G. E. y Cuello de Uzcátegui, R. 2000. Ocurrencia del virus del bandeo amarillo del sorgo en Venezuela. *Interciencia* 25: 321-327.
5. Garrido, M. J., Cuello, R. M., Centeno, F. and Trujillo, G. E. 2003. *Sorghum verticilliflorum*: a natural host of Sorghum yellow banding virus in Venezuela. *Journal of Plant Pathology* 85: 223.
6. Klaassen, V. A. and Falk, B. W. 1989. Characterization of a California isolate of Sorghum yellow banding virus. *Phytopathology* 79: 646-650.
7. Ochoa, F. y Trujillo, G. E. 1994. Metodología sencilla para la obtención de antisuero al virus de la tristeza de los cítricos. *Fitopatol. Venez.* 7: 2-5.
8. Patiño, Y. y Garrido, M. J. 1998. Obtención de antisuero contra el virus del mosaico sureño de la caña mediante una metodología sencilla. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 15: 319-329.
9. Trujillo, G. E., Garrido, M. J. y Alagares, M. 1989. Un modo fácil de obtener antisueros a diferentes virus vegetales. II Jornadas de Investigación de la Facultad de Agronomía, UCV Maracay. Memoria, pp. 21-22.