

ELABORACION DEL ANTISUERO PARA EL VIRUS CAUSANTE DEL "MOSAICO DEL TABACO" (x)

Mario Alvarez A.
Primo Accatino L.
Ingenieros Agrónomos (xx)

INTRODUCCION

Antes de describir el método a seguir en la elaboración de un antisuero para un virus fitopatógeno determinado, es conveniente y útil a la vez explicar algunos de los conceptos que se aplican y se desprenden de este proceso.

Antígeno es una sustancia que, cuando es introducida en los tejidos de un animal, estimula la producción de anticuerpos y cuando se mezcla con este anticuerpo, reacciona en forma característica y evidente. *Anticuerpo*, es aquella sustancia producida por el suero sanguíneo de un animal, como respuesta a los estímulos originados por la introducción de un antígeno en los tejidos.

Una vez obtenido el antisuero, debe hacerse reaccionar con el virus purificado para determinar si se ha logrado la formación de anticuerpos.

En el caso de los virus vegetales, los tipos de reacciones más usados son:

a) Reacción de la Precipitina. Se forma un precipitado, cuando se pone en contacto el virus purificado con su antisuero específico, en diferentes soluciones salinas. El precipitado se denomina *precipitina*.

b) Reacción por aglutinación. Es el tipo de reacción que se emplea en la práctica, con savia no purificada en la que se observa una aglutinación de los cloroplastos, dependiendo ésta, de la edad de la planta y de la concentración del virus.

Objetivos:

El presente trabajo experimental se llevó a cabo con el fin de elaborar un antisuero para el *Nicotiana Virus 1*, causante del "Mosaico Común" del tabaco.

(X) Trabajo realizado con la asesoría del Dr. Allard B. R. Beemster, experto en virología de la FAO, en Chile.

(XX) Ingenieros Agrónomos del Departamento de Investigación Agrícola, Ministerio de Agricultura.

Se eligió este virus por presentar las siguientes características: se trata de uno de los virus que se inactiva a más alta temperatura, 88° a 93° C. durante 10 minutos; no se destruye por desecamiento, pues el virus también puede ser aislado de los tabacos manufacturados; tolera diluciones hasta de 1:1.000.000; retiene su longevidad *in vitro* en jugo filtrado y esterilizado, tal vez por años; y en consideración a que el principio de preparación de este antisuero sirvió como base para elaborar otros, como aquellos para virus X, Y, S y M de la papa.

Además, los autores desean hacer presente la importancia que tuvo esta investigación, referida al entrenamiento y numerosos nuevos conocimientos que les aportó a lo largo de todo el desarrollo del proceso, en materia virológica, que sin lugar a dudas, los capacite cabalmente a programar proyectos más ambiciosos, como es entre otros, elaborar los antisueños para los virus X o Y de la papa.

Metodología de la investigación:

a) *Obtención y Multiplicación del virus.* Con el propósito de tener material de tabaco atacado con *Nicotiana Virus 1*, se procedió a recolectarlo en la Zona de Chagres y Graneros, donde se pudo apreciar la extraordinaria intensidad del ataque de esta enfermedad en tabaco, manifestándose claramente en las hojas el característico "mosaico" que se había desarrollado sistémicamente a través de toda la planta. Fue confirmada la existencia de *Nicotiana Virus 1*, mediante la inoculación de savia de hoja de tabaco atacado por "mosaico" sobre *Nicotiana glutinosa*, la cual dio las típicas lesiones locales que evidenciaron la presencia del virus.

Posteriormente, se procedió a multiplicar el virus en forma masiva sobre *Nicotiana tabacum* var. White Barley y variedad Samsum, en el invernadero de la Estación Experimental Central "La Platina".

La inoculación del virus sobre las plantas mencionadas, se efectuó por el método de "frotación", es decir, la savia proveniente de las hojas enfermas se frotó sobre las hojas de plantas sanas, previo espolvoreo de "Carborundum", que actuó como abrasivo, produciendo fisuras en la epidermis de la hoja sana, las que ayudan al virus en su penetración.

Todas las plantas inoculadas artificialmente contrajeron la enfermedad, manifestándose evidentes síntomas a los pocos días de la inoculación. Estas plantas se dejaron crecer, para contar con mayor material vegetativo y después de dos meses, presentaron un regular desarrollo y totalmente infectadas con el virus.

Se cosecharon todas las hojas atacadas de la totalidad de las plantas, las que fueron maceradas en una juguera eléctrica, previo agregado de agua destilada, obteniéndose de esta manera aproximadamente 4 litros de savia de tabaco.

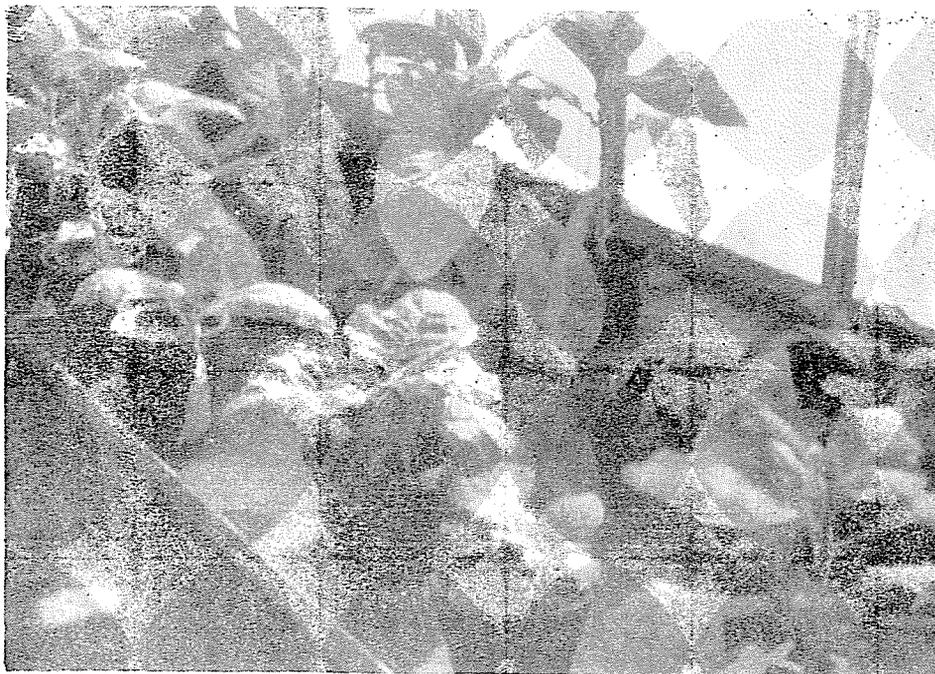


Foto N° 1.— Plantas de tabaco atacadas con *Nicotiana virus 1*.

b) *Purificación del Virus*. La savia obtenida fue calentada hasta 60° C, con el fin de coagular una gran parte de las proteínas normales de la planta y provocar la precipitación de ellas.

El trabajo que se realizó a continuación se efectuó en la Sección Virología del Instituto Bacteriológico de Chile.

A fin de lograr la precipitación total de las proteínas normales coaguladas, se procedió a centrifugar la savia durante 30 minutos a 2.000 r. p. m., de la que se obtuvo un sobrenadante de 3.500 cc. que fue tratado con Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para ayudar ahora a la precipitación del virus. Para este efecto, se empleó el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en proporción de 300 grs. por litro de líquido savial. Después de dejarse en reposo por 30 minutos a 4° C, se centrifugó nuevamente por 30 minutos a 2.000 r. p. m., obteniéndose de esta manera un precipitado constituido por las proteínas-virus y descartándose el líquido sobrenadante. Al precipitado que contenía el virus se le agregó agua destilada, quedando una suspensión líquida de 500 cc.

Con esta cantidad de líquido, se repitió enteramente el proceso ya indicado, es decir, se centrifugó y se agregó Sulfato de amonio. En esta forma, se consideró que el virus causante del "Mosaico común" del tabaco se encontraba totalmente purificado. Después de este paso, la cantidad de líquido con virus purificado, se redujo a 350 cc.

El uso de savia purificada para efectuar el proceso, asegura que el antisuero obtenido no contenga anticuerpos contra las proteínas normalmente presentes en la planta.

c) *Diálisis*. Con el objetivo de eliminar el Sulfato de amonio presente en la solución, se efectuó el proceso de la diálisis. Para este efecto, se introdujo el líquido en un tubo de celofán de 1 m. de largo que permaneció 24 horas al agua corriente y 24 horas en un recipiente con agua destilada. El Sulfato de amonio se eliminó por osmosis, a través del celofán.

d) *Infectividad del Virus Purificado*. A este respecto, se procedió a inocular el virus purificado sobre una planta indicadora llamada *Nicotiana glutinosa*, que da reacciones locales para este virus. La inoculación se realizó por el método de frotación, con diluciones del virus purificado en varias concentraciones: 1:1; 1:10; 1:100; 1:1.000 y 1:10.000.

Las lesiones locales en *N. glutinosa* aparecieron después de tres días, demostrando la alta infectividad del virus, ya que se obtuvo numerosas reacciones aún en concentraciones de 1:10.000.

e) *Inoculación de Nicotiana Virus 1 purificado en conejos*. Una vez determinada la infectividad del virus, se inoculó en concentración de 1:1 en conejos, proporcionados por el Instituto Bacteriológico de Chile.

El método seguido consistió en inyectar el virus purificado en una vena de la oreja del conejo, previa desinfección con yodo de esa región. Posteriormente los conejos fueron identificados con un número.

El cuadro de inoculación fue el siguiente:

C U A D R O N° 1
INOCULACION DEL VIRUS PURIFICADO EN CONEJOS

N° ident. conejos	Fechas de inoculación y dosis					Sangre extraída
	2-8-62	6-8-62	10-8-62	14-8-62	17-8-62	
4983	2 cc	2 cc	3 cc	3 cc	(murió)	
4984	2 cc	(murió)				
Virus purificado más 1.000 u de penicilina y 500 u de estreptomycinina						
4985			2 cc	2 cc	(murió)	
4986			2 cc	2 cc		10 cc
4987			2 cc	2 cc	(murió)	
4988			2 cc	2 cc		5 cc
4989			2 cc	2 cc		10 cc
4990			2 cc	2 cc	(murió)	

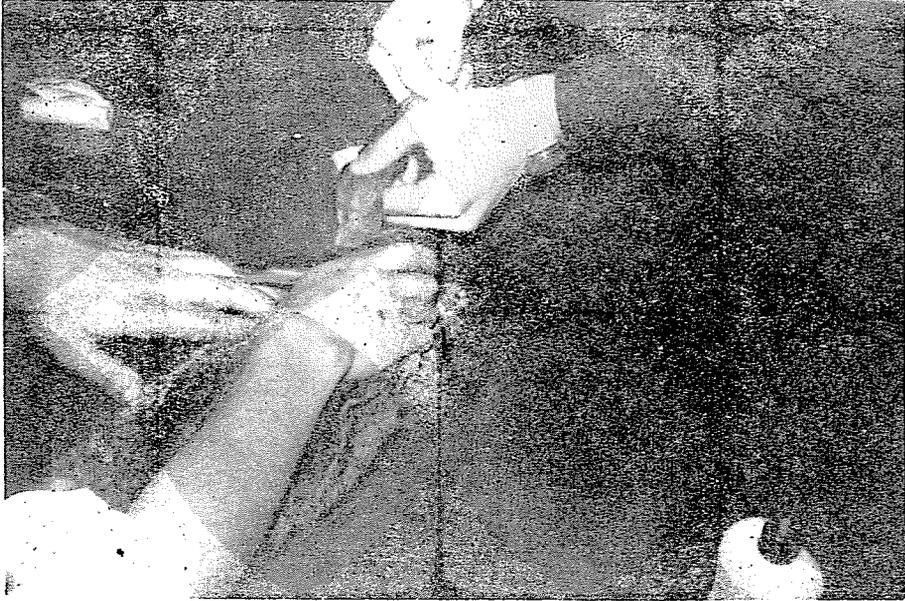


Foto Nº 2.—Inyección de Nicotiana Virus 1 purificado en conejos

f) *Obtención del Antisero.* A los tres conejos que resistieron las inoculaciones, se les extrajo sangre directamente del corazón, ya que en primer lugar debía saberse si el organismo del conejo había formado los anticuerpos contra el virus inyectado.

Con una aguja hipodérmica especial, se efectuó una inyección cardíaca directa, extrayéndose 10 cc de sangre en dos conejos (4986 y 4989) y 5 cc en el otro (4988) que presentaba gran debilidad.

La sangre obtenida se dejó en reposo por 24 horas, para que precipitara el coágulo sanguíneo y de esta manera extraer el suero con facilidad. El suero fue sometido a un proceso de centrifugación a 2.000 r. p. m. por 15 minutos para precipitar los posibles glóbulos rojos que aún se encontraban en él.

Los 5 cc de sangre del conejo 4988 produjeron una deficiente coagulación sanguínea que imposibilitó la obtención del suero.

El suero sanguíneo se procedió a probarlo con el virus purificado.

g) *Titulación del Antisero obtenido.* Al mismo tiempo que debía comprobarse si reaccionaba el suero con el virus purificado, se aprovechó de titular el antisero, es decir, determinar hasta qué dilución reaccionaban las distintas concentraciones del antisero obtenido con las diferentes concentraciones del virus purificado.

C U A D R O N° 2
TITULACION DEL ANTISUERO
REACCION POR PRECIPITACION

Conejo 4986

<i>Virus purificado</i>				
Antisuero	1 1	1 10	1 100	1 1.000
Normal	—	—	—	—
1 1	+	+	—	—
1 10	+	—	—	—
1 100	—	—	—	—
1 1.000	—	—	—	—

Conejo 4989

<i>Virus purificado</i>				
Antisuero	1 1	1 10	1 100	1 1.000
Normal	—	—	—	—
1 1	+	+	—	—
1 10	+	—	—	—
1 100	—	—	—	—
1 1.000	—	—	—	—

+ = reacción positiva
— = reacción negativa

Esta titulación se repitió dos veces en ambos antisueros, con idénticos resultados. La reacción serológica que se llevó a cabo fue mediante *precipitación*, es decir, la que se produce cuando se mezcla el antisuero con el virus que ha sido purificado por centrifugación.

De acuerdo a lo revelado por el Cuadro N° 2, el antisuero obtenido reaccionó hasta una dilución de 1|10.

Conjuntamente con lo anterior, se procedió a titular el antisuero con savia de tabaco enfermo con "Mosaico", con el objetivo de verificar la posible variación en la reacción con el virus no purificado y al mismo tiempo probar si la dilución del antisuero determinada con el virus purificado, se mantenía en este nuevo test serológico.

C U A D R O N° 3
TITULACION DEL ANTISUERO
REACCION POR AGLUTINACION
VIRUS NO PURIFICADO

<i>Conejo 4986</i>				
Antisuero	1 1	1 10	1 100	1 1.000
Normal	—	—	—	—
1 1	+	+	—	—
1 10	+	—	—	—
1 100	—	—	—	—
1 1.000	—	—	—	—

Conejo 4989

<i>Virus no purificado</i>				
Antisuero	1 1	1 10	1 100	1 1.000
Normal	—	—	—	—
1 1	+	+	—	—
1 10	+	—	—	—
1 100	—	—	—	—
1 1.000	—	—	—	—

+ = reacción positiva
— = reacción negativa

Como en la reacción anterior, la titulación se repitió dos veces, con ambos antisueros, obteniéndose los mismos resultados. Al respecto, la reacción serológica, fue por *aglutinación*, es decir, un agrupamiento del virus, de los anticuerpos y de la clorofila de la planta.

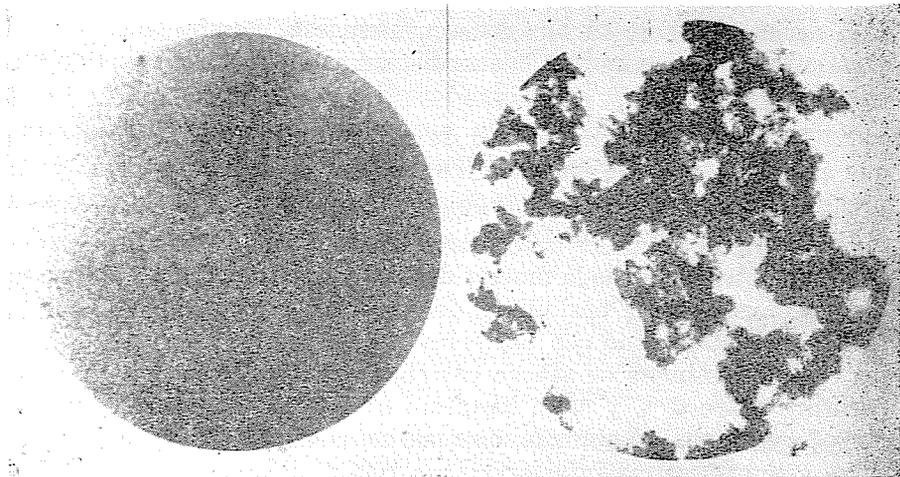


Foto N° 3.— Reacción serológica del virus "Mosaico del tabaco". Izquierda: reacción positiva; Derecha: reacción negativa.

DISCUSION Y CONCLUSIONES DE LA EXPERIENCIA

1. La investigación llevada a cabo sin lugar a dudas fué un éxito, ya que el objetivo fijado se cumplió en su totalidad, al obtenerse las reacciones serológicas mencionadas anteriormente. Analizando esta conclusión, se puede decir que el alto grado a que se llegó en la purificación del virus, descartó la posibilidad, que al mismo tiempo que se formaban los anticuerpos contra el virus del "mosaico" del tabaco en la sangre de los conejos, se formarían también, anticuerpos contra las proteínas normales de la planta. Se desprende entonces, que éstas fueron eliminadas totalmente durante el proceso de purificación.

Es posible que la concentración del virus purificado no fuese la óptima, debido a que fué sometido a varias diluciones durante el proceso de purificación. Esta concentración del virus, determinó una menor formación de anticuerpos, hecho que quedó claramente demostrado al obtenerse reacciones solamente con concentraciones de 1|1 y 1|10 del antisuero.

Este aspecto se tendrá en cuenta cuando se repita la experiencia, en la que se tratará de disminuir el número de diluciones, en tal forma que cuando el virus se purifique y al ser inoculado sobre *Nicotiana glutinosa*, produzca lesiones locales aún en concentraciones de 1|1.000.000.

2. La muerte de los conejos, después de haberles inoculado el virus purificado, fue un hecho que extrañó sobremanera a los autores del presente trabajo. Analizando este hecho, se determinaron como posibles factores causales, en primer lugar, el escaso desarrollo de los conejos y la gran debilidad que manifestaban como consecuencia de una alimentación deficiente. Este factor, consecuentemente, disminuyó la vitalidad y resistencia para soportar la inoculación sanguínea del virus del "Mosaico" del tabaco.

Se descartó la posibilidad de un "shock" anafiláctico, debido a que éste sucede inmediatamente después de inyectado el virus, y en el presente caso la muerte más rápida ocurrió a las dos horas de colocada la inyección del virus purificado.

La otra causa de la muerte de los conejos, según los autores, puede estar basada en la posibilidad de que la solución del virus purificado estuviese contaminado con bacterias, los que se habrían hecho presentes cuando las hojas de tabaco cosechadas fueron almacenadas a temperatura entre 0° C y 4° C. Respecto a lo último, se tendrá presente, para la próxima experiencia, que las hojas de tabaco deberán preservarse a temperaturas inferiores a — 10°C.

Atendiendo esta posibilidad, a los seis últimos conejos se les inyectó el virus purificado, más 1.000 u de penicilina y 500 u de estreptomicina, a pesar de lo cual murieron tres conejos.

3. La principal importancia del éxito del presente trabajo, radica en que el entrenamiento y numerosos nuevos conocimientos que aportó este proceso a los autores, conduce directamente llevar a cabo una experiencia semejante con el virus X e Y de la papa, cuya elaboración de antisueros tiene muchos puntos de semejanza con el presente proceso.

Está en conocimiento de todos la extraordinaria importancia económica de estos virus de la papa y de lo dificultoso que es su determinación visual, debido a que la sintomatología de estas enfermedades, varía de acuerdo a las condiciones ambientales de la zona y de la variedad de la papa que se cultiva. La solución de este problema, se vería fácilmente resuelto con el uso de los antisueros.

Ligado estrictamente a lo anterior, es sabido que la importación de antisueros es sumamente costosa y a la vez demorosa, como le consta fehacientemente a los autores. Este hecho debería pensarse seriamente, para que en un futuro cercano, el país llegara a contar con una planta elaboradora de antisueros para los virus de la papa, que en el fondo no implica ningún gasto exorbitante, tal como se pudo apreciar en el capítulo de Metodología, del presente trabajo.

4. Para finalizar, es sabido que los antisueros tienen por propiedad reaccionar con todos los "strains" del virus específico y es así entonces, como el antisuero elaborado para el virus del "Mosaico" del tabaco, también es útil para determinar el "strains" que ataca al tomate.

R E S U M E N

El objetivo del presente trabajo fue elaborar un antisuero para el *Nicotiana Virus 1* causante del "Mosaico" del tabaco. El proceso de preparación del antisuero para el *Nicotiana Virus 1*, consistió en inyectar a la corriente sanguínea de un conejo, el virus purificado de savia proveniente de plantas de tabaco enfermas con "mosaico".

Para el proceso de purificación, la savia fue sometida a centrifugación y adición de Sulfato de amonio, para eliminar las proteínas normales de la planta.

Los conejos que resistieron la inoculación fueron sometidos a una inyección cardíaca de la que se obtuvo 10 cc de sangre la que posteriormente fue centrifugada, obteniéndose el antisuero.

El antisuero se hizo reaccionar con el virus purificado y con savia proveniente de plantas de tabaco enfermas.

Los resultados probaron claramente el éxito de la experiencia, al obtenerse reacciones serológicas en concentraciones de 1:1 y 1:10, quedando, además, de esta manera titulado el antisuero.

S U M M A R Y

The preparation of an antiserum against *Nicotiana virus 1*.

The aim of the work presented here was to elaborate an antiserum against *Nicotiana virus 1* which causes the "Common mosaic" in tobacco.

The process of preparing the antiserum consisted of injecting rabbits intravenously, with purified virus obtained from infected tobacco plants. To purify the virus the sap was heated to 60° C and centrifuged (1 hr. 2.000 r|m) after which, ammonium sulfate was added to the clarified sap to precipitate the virus.

Those rabbits which resisted the injections were submitted to a cardiac injection. In this way 10 cc of blood were obtained from each of the rabbits. After 24 hours the blood was centrifuged, by which, clear antiserum was obtained.

The antisera reacted positively with the purified virus using the precipitine reaction and also with sap directly obtained from infected plants using the agglutination reaction. Positive reactions were obtained with undiluted antisera and with the antisera diluted 1:10.

Agradecimientos:

Los autores desean dejar constancia de sus más sinceros agradecimientos para el Dr. Raúl Palacios, Jefe de la Sección Virología del Instituto Bacteriológico de Chile, por el interés y elevado espíritu de cooperación, que permitió a los autores recibir su ayuda práctica y técnica, sin la cual el éxito del presente trabajo no hubiera sido una realidad.

Nota de los autores:

Esta experiencia es totalmente original y se basó en los conocimientos y ayuda técnica proporcionada por el Dr. Allard B. R. Beemster, asesor del Proyecto Virus del Departamento de Investigaciones Agrícola, Ministerio de Agricultura.
