

# DETECCIÓN ESPECÍFICA MEDIANTE PCR DE UN AISLADO DEL VIRUS PLUM POX (PPV) EN CHILE<sup>1</sup>

## PCR-specific detection of a plum pox virus (PPV) isolate in Chile

Marlene Rosales V.<sup>2</sup>, Patricio Hinrichsen R.<sup>2</sup> y Guido Herrera M.<sup>2</sup>

### SUMMARY

The potyvirus plum pox virus (PPV) is the causal agent of Sharkas disease. This virus severely affects stone fruit trees. Usually, the virus can be found at very low titers and unevenly distributed in different tissues of plants. Until recently, PPV was restricted to Europe and the northern part of Africa, but the virus was detected for the first time out of that region in Chile, in Los Tilos Regional Center of INIA (Acuña, 1993). Considering the great importance of this disease, highly sensitive detection techniques are required to control its spread. In this work a detection method was optimized based on the polymerase chain reaction (PCR), which amplified a specific segment of the viral genome.

Viral RNA present in a crude plant extract was first processed with reverse transcriptase to produce a cDNA that was used as a template for the PCR reaction, using specific primers designed to anneal at the 3' end of the viral genome. With this procedure, the amplification of a 243 bp fragment, corresponding to the carboxi-terminal region of the coat protein gene (CP primers), and of a 220 bp fragment of the 3' non-coding region of PPV genome (3'-NCR primers) were achieved. This technique allowed the unequivocal detection of the virus in 24 out of 28 samples that were mostly sero-positive with a policlonal anti-PPV antibody. However, only 36% of these samples had visual Sharkas disease symptoms.

**Key words:** RT-PCR, virus, PPV, Sharkas disease, molecular diagnostic, *Prunus* sp.

### INTRODUCCIÓN

El virus plum pox (PPV) es el agente causal de la enfermedad de Sharkas, la que causa serias pérdidas en árboles frutales del género *Prunus* sp., debido a los graves síntomas que produce. En cuanto a la distribución geográfica del PPV, éste tras su aparición en Bulgaria en 1915 (Atanasoff, 1932), se ha difundido por diversos países europeos (Italia, Alemania, España, Francia, ex Yugoslavia, etc.), así como también a algunos países del litoral oriental del Mediterráneo (Turquía, Siria y Egipto) (Herrera, 1994b; Wetzal *et al.*, 1991a). Fuera de esta región del mundo ha sido detectado sólo recientemente. En América, se detectó por primera vez en Chile, donde recién

temente el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) notificó la presencia de PPV (Acuña, 1993). La detección se realizó en el Centro Regional de Investigación La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), utilizando técnicas tales como ELISA, microscopía electrónica e identificación electroforética del RNA de doble hebra. La enfermedad se encontró en plantas madres de damasco y duraznero pertenecientes a una antigua colección de variedades del Campo Experimental Los Tilos del INIA, material importado originalmente desde Europa (Herrera 1994a; 1994b; figuras 1a y 1b).

El virus afecta seriamente el aspecto y desarrollo de los frutos, lo que impide su comercialización. Los árboles infectados deben ser removidos, lo que unido a las continuas inspecciones a que deben someterse los cultivos susceptibles, aumenta las pérdidas económicas provocadas por este patógeno (Herrera, 1994a). En muchos países con infecciones de PPV, los frutos infectados son indeseados como fruta de mesa o no pueden ser exportados. En aquellos países donde la enfer-

<sup>1</sup>Recepción de originales: 30 de octubre de 1995.

Trabajo financiado en parte por Proyecto FIA N° 014-92.

Parte del trabajo de tesis presentado por la primera autora para optar al Título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

<sup>2</sup>Centro Regional de Investigación La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

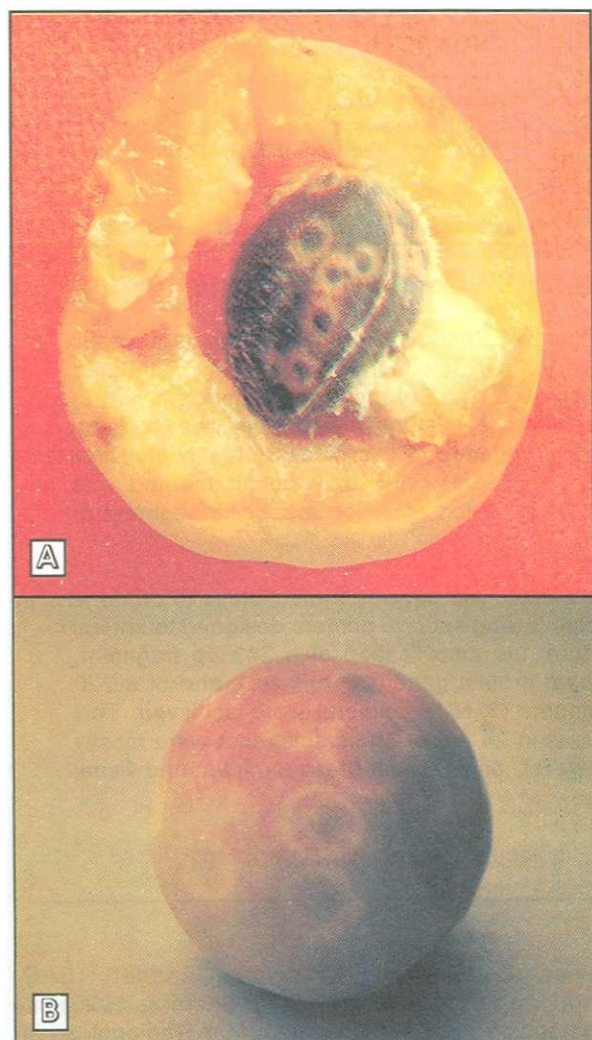


FIGURA 1. Síntomas de la enfermedad de Sharkas en (a) un fruto de damasco, cv. Bergeron; (b) un fruto de duraznero, cv. Springcrest.

FIGURE 1. Sharkas disease symptoms in (a) apricot fruit, cv. Bergeron; (b) peach fruit, cv. Springcrest.

medad existe, pero no se ha establecido, se tienen dificultades para la exportación de yemas y patrones (Herrera, 1994b). Es por estos motivos que la enfermedad de Sharkas se considera como una plaga de importancia cuarentenaria; en nuestro país, el SAG ha declarado el control obligatorio de ella (MINAGRI, 1994).

El PPV es un potyvirus de tipo filamentoso, con envoltura proteica, que posee como material genético RNA de hebra simple con polaridad positiva, de aproximadamente 10 kb de longitud; posee una cola de poli-A en el extremo 3' y una proteína unida covalentemente al extremo 5' (Riechmann *et al.*, 1992). En su genoma es posible identificar un único marco de lectura abierto que es tradu-

cido como una gran poliproteína, la que es subsecuentemente procesada a polipéptidos de menor tamaño por una proteasa codificada por el virus (Cervera *et al.*, 1993; Lain *et al.*, 1989; Maiss *et al.*, 1989; Riechmann *et al.*, 1992; Teycheney *et al.*, 1989). El PPV es transmitido por áfidos de una manera no persistente, aunque también se ha descrito un aislamiento que no presenta esta característica; esto hace que el número de especies de áfidos capaces de actuar como vectores sea importante. Además, este virus induce la formación de cuerpos de inclusión citoplásmicos del tipo "pinwheel" que son característicos de los potyvirus (Riechmann *et al.*, 1992; Maiss *et al.*, 1989; Pappu *et al.*, 1993).

Este virus se presenta distribuido irregularmente y a veces en muy bajas concentraciones en el hospedero (Wetzel *et al.*, 1991a), por lo que el control de la enfermedad requiere de técnicas de detección de alta sensibilidad. El diagnóstico rutinario de PPV se efectúa en forma tradicional mediante la inoculación por injerto en ciertos durazneros, pero las técnicas serológicas son actualmente las más empleadas. Actualmente se dispone de anticuerpos policlonales (pAB) y monoclonales (mAB) específicos (Cabra *et al.*, 1993), algunos de los cuales son comercializados como kits de diagnóstico. También se ha utilizado en su identificación ensayos de hibridación con sondas de DNA y RNA, microscopía electrónica y algunos ensayos de campo, como es la susceptibilidad selectiva de ciertos hospederos herbáceos frente al virus (Wetzel *et al.*, 1991b).

En los últimos años se ha desarrollado un nuevo sistema de detección de genes, de alta sensibilidad y especificidad, basado en una reacción enzimática usando una polimerasa termoestable (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Esta metodología también es aplicable para la detección e identificación de fragmentos de RNA, como es el genoma del virus PPV, para lo cual se recurre en primer lugar a una transcriptasa reversa (RT), enzima capaz de generar una copia de DNA (cDNA) a partir del RNA original. Posteriormente, este cDNA es usado como templado en la amplificación del DNA por PCR (Wetzel *et al.*, 1991b), identificándose por electroforesis bandas de DNA de tamaños específicos. El proceso en su conjunto se conoce como RT-PCR.

Dada la importancia que reviste el control y diagnóstico de la enfermedad provocada por el PPV, se planteó como objetivo de este trabajo el optimizar las metodologías de diagnóstico basadas en RT-PCR, comparando protocolos basados en distintos métodos de obtención del RNA viral, así

como distintos partidores de RT-PCR, para detectar con la mayor confiabilidad y sensibilidad posible la presencia de este potyvirus en frutales en Chile.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de las muestras y controles

Se analizaron 28 muestras de hojas y frutos de damascos (*Prunus armeniaca* L.) cv. Bergeron y durazneros (*Prunus persica* L.) cv. Springcrest, algunos de los cuales mostraban síntomas típicos de PPV (Herrera, 1994a), provenientes del Centro Regional Los Tilos del INIA (Región Metropolitana). Estas muestras se colectaron entre 1992 y 1994 y se mantuvieron a -80°C. Como controles positivos se utilizaron los serotipos de PPV M, D y El Amar, mantenidos en hojas de hospederos herbáceos, conservadas bajo refrigeración. Estos materiales fueron proporcionados por el USDA-ARS (Departamento de Agricultura de EE.UU.). Como control negativo se incluyó agua destilada estéril o tejido sano, en reemplazo de los extractos de ácidos nucleicos, y se procesó de la misma forma que el resto de las muestras.

### Pruebas serológicas

Los ensayos de ELISA, tanto con anticuerpos policlonales (pAB) como monoclonales (mAB), fueron realizados como lo describió Herrera (1994a).

### Amplificación del genoma viral por RT-PCR

En una primera etapa, se produjo un cDNA a partir del RNA viral presente en tejido de plantas infectadas, usando la enzima transcriptasa reversa (RT). Este cDNA se empleó posteriormente como templado en la reacción de PCR, usando parti-

dores específicos que amplifican un fragmento del extremo 3' del genoma viral.

Dos pares de oligonucleótidos fueron seleccionados para efectuar la amplificación por PCR. El primer par amplifica un segmento de 243 bp localizado dentro de la región carboxi-terminal del gen de la proteína de cubierta de PPV (Wetzel *et al.*, 1991b) y en este trabajo serán denominados "partidores de CP". El otro par de partidores amplifica una región de 220 bp de la región 3' no codificante del genoma de PPV (Hadidi y Levy, 1994; Levy y Hadidi, 1994), y serán llamados "partidores de 3'NCR". Las secuencias de los partidores y tamaño del producto esperado están descritas en el Cuadro 1; la ubicación de los fragmentos amplificados dentro del genoma de PPV se muestra en la Figura 2. Los partidores usados en la reacción de RT son los precedidos por una letra "c", de complementario.

### Preparación de la muestra

Se optimizaron dos métodos para extraer ácidos nucleicos. El primero se basó en la absorción de interferentes de las reacciones de RT y PCR presentes en los extractos, usando una resina de origen comercial (GeneReleaser™, de Bio-Ventures, Inc., Murfreesboro, TN) (Levy *et al.*, 1994); el otro método se basó en concentrar las partículas virales con un anticuerpo policlonal anti-PPV ("inmuncaptura") (Wetzel *et al.*, 1992). Para cada caso fue necesario usar diferentes condiciones de la reacción de RT-PCR, como se indica a continuación.

**Preparación de la muestra usando Gene-Releaser (GR).** Este es un método simple y rápido que permite obtener un extracto del tejido vegetal utilizable en la reacción de RT-PCR, exclu-

CUADRO 1. Secuencia de los partidores de RT-PCR utilizados para la detección de PPV en *Prunus* sp

TABLE 1. Sequence of the RT-PCR primers used in the detection of PPV in *Prunus* sp

Partidor <sup>a</sup>	Secuencia	Producto amplificado
cPPV(3')NTR <sup>b</sup>	5'-GTCTCTTGACACAAGAACTATAACC-3'	220 bp
hPPV(3')NTR	5'-GTAGTGGTCTCGGTATCTATCATA-3'	
cPPV-CP <sup>c</sup>	5'-ACCGAGACCACTACACTCCC-3'	243 bp
hPPV-CP	5'-CAGACTACAGCCTCGCCAGA-3'	

<sup>a</sup>c representa al partidor complementario; h representa al partidor homólogo.

<sup>b</sup>PPV(3')NTR: partidor que se une a la región 3' no traducida de PPV; "partidores de 3'-NCR".

<sup>c</sup>PPV-CP: partidores que amplifican el segmento terminal del gen de la proteína de cubierta de PPV; "partidores de CP".

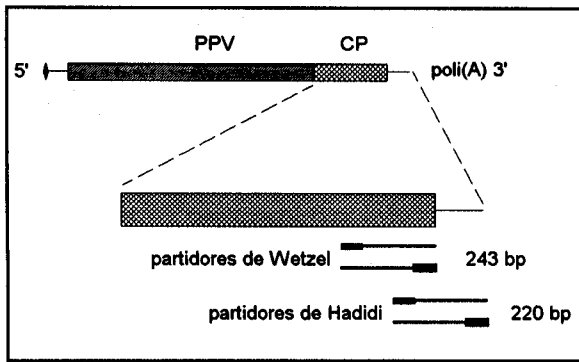


FIGURA 2. Fragmentos del RNA viral (PPV) amplificados por PCR. El fragmento achurado corresponde al gen de la proteína de cápside (CP). Los partidores se esquematizan como rectángulos oscuros, seguidos de una línea que representa el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados. Ambos productos de amplificación (243 bp y 220 bp) son parcialmente complementarios.

FIGURE 2. Viral RNA fragments amplified by PCR. Stripped fragment corresponds to the coat protein (CP) gene. Primers are represented as filled boxes; the size of the line represents the approximate size of the amplified fragments. Both products (243bp and 220 bp) are partially complementary.

yendo laboriosos pasos de purificación de ácidos nucleicos. Con la base de una punta de micropipeta P-1000 se presionó el tejido de las hojas para obtener discos de aproximadamente 30 mg. En caso de procesar frutos, se realizaron cortes rectangulares en distintas posiciones de éste con una hoja de afeitar estéril. El tejido colectado se trituró con un vástago de plástico en un tubo de microfuga de 1,5 ml con 100 µl de tampón TE frío (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y aproximadamente 40 mg de carborundo. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 1-2 min (centrífuga Eppendorf 5415C). El sobrenadante fue removido a un tubo estéril y puesto en hielo. Una alícuota de 1 µl de cada muestra fue puesta en un microtubo de 0,5 µl que contiene 23 ml de resina GeneReleaser™ recién resuspendido. La mezcla del extracto con la resina fue mezclada y puesta en hielo hasta que todas las muestras estaban preparadas. Luego la muestra se cubrió con una gota de aceite mineral y calentó en un horno microonda por aproximadamente 7 minutos.

**Preparación de la muestra por inmunocaptura (IC).** Los extractos se prepararon moliendo hojas o frutos en 4 volúmenes de tampón CS [citrate trisódico 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0; dietiltiocarbamato (DIECA) 20 mM y polivinilpirrolidona (PVP K25) 2% p/v]; este proceso se realizó en una bolsa plástica o en un tubo de microfuga de 1,5 ml. Luego se colectó la savia y se centrifugó por 10

min a 13.000 rpm. Una alícuota de 250 µl del sobrenadante obtenido se aplicó en una microplaca que ha sido previamente activada con un pAB anti-PPV (Bioreba); se dejó toda la noche a 4°C en una atmósfera húmeda y luego se lavó la placa con tampón PBS. Para provocar la ruptura de las partículas virales capturadas se agregaron 10 µl de una solución de Triton X-100 al 10% a 65°C a cada pocillo y se agitó en un vórtex. La solución resultante se transfirió a un tubo estéril y se procesó sin un tratamiento posterior.

#### RT-PCR con extractos preparados por GR (GR-PCR)

Una alícuota de 20 µl de matriz GeneReleaser que contenía la muestra se removió inmediatamente después de calentar en el microonda. Esta se agregó a una mezcla de apareamiento del partidor que contenía: 6 µl de tampón de RT 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 3 µl de DTT 0,1 M y 1 µl (1 µg/µl) de partidor complementario. Con agua estéril se ajustó el volumen a 50 µl. Esta mezcla se agitó en un vórtex brevemente, se desnaturó por calentamiento a 100°C por 5 min y se puso en hielo por 2 min. Posteriormente, se dejó la mezcla a temperatura ambiente por 30-45 min para permitir el apareamiento del partidor. A la mezcla anterior, se agregó 20 µl de mezcla de reacción de cDNA (4 µl de tampón de transcripción reversa 5X, más 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl RNasin [40 U/µl], 5 µl de b-mercaptoetanol 0,3 M, 2,5 µl de dNTPs 10 mM total [dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 2,5 mM cada uno] y 1 µl de transcriptasa reversa M-MLV [Promega, 200 U/µl]), se agitó en un vórtex y se incubó por 1,5 horas a 37 °C. El producto de esta reacción (cDNA) fue el sustrato para la reacción de PCR, en una mezcla que contenía 5 µl de tampón de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM y 0,01% de gelatina), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada partidor (6 µM cada uno) y 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Promega) en un volumen final de 45 µl. Antes de agregar 5 µl de cDNA recién preparado, esta mezcla se cubrió con una gota de aceite mineral y se realizó una "partida en caliente", para lo cual se mantuvo a 85 °C por 5 min, antes de comenzar la reacción de PCR (termociclador Cetus Perkin-Elmer). Se realizó una amplificación de 30 ciclos, según el esquema descrito por Levy *et al.* (1994): 30 seg a 94 °C (desnaturación); 30 seg a 62°C (apareamiento); 45 seg a 72 °C (elongación); extensión final de 7 min a 72 °C. Como control negativo de la reacción de RT-PCR, se reemplazó el volumen de cDNA por agua.

### RT-PCR con extractos preparados por inmunocaptura (IC-PCR)

Se tomaron 4  $\mu$ l de la solución obtenida después de la interrupción viral y se agregaron a una mezcla de transcripción reversa que contenía 4  $\mu$ l de tampón de RT 5X, 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l de partidor complementario (20  $\mu$ M), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (200 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l de DTT 10 mM y 1  $\mu$ l de RNasin (40 U/ $\mu$ l), completando a 20  $\mu$ l con agua estéril. Esta mezcla se cubrió con una gota de aceite mineral y se incubó en el termociclador por 10 min a 23 °C, luego por 40 min a 37 °C, seguida finalmente por un período de 5 min a 95 °C. La amplificación se realizó agregando los 20  $\mu$ l de la reacción de cDNA a una mezcla compuesta por 10  $\mu$ l de tampón de PCR 10X, 5  $\mu$ l de cada partidor (20  $\mu$ M), 1,3  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM y 2 U de Taq DNA polimerasa, completando con agua estéril hasta un volumen de 100  $\mu$ l. La amplificación se realizó en 40 ciclos (Krczal y Avenarius, 1994) de 30 seg a 94 °C (desnaturación); 30 seg a 62 °C (apareamiento); 1 min a 72 °C (elongación) y una extensión final de 10 min a 72 °C.

### Análisis electroforético de los productos amplificados

Los productos de la RT-PCR fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida no-desnaturante al 5%. Para un gel de 16x18 cm y un espesor de 2 mm, se mezclaron 38,7 ml de agua estéril, 5 ml de tampón TBE 10X (Tris-base 890 mM, borato 890 mM y EDTA 25 mM pH 8,3), 6,25 ml de solución de acrilamida:bis-acrilamida al 40% (29:1), 50  $\mu$ l de TEMED y 340  $\mu$ l de persulfato de amonio al 20%. En el gel se cargó un 20% de la reacción de PCR mezclada con 1/6 del volumen de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25% y glicerol 30%) y se corrió a 120 V por aproximadamente 2 horas en TBE 1X. La visualización de los productos amplificados se efectuó por tinción con nitrato de plata. Para ello, después de correr el gel, éste se sumergió 4 horas en solución de fijación (etanol 10%, ácido acético glacial 1%). Luego el gel se incubó en una solución de nitrato de plata 0,011 M por 1 hora y se agitó constantemente. Después de lavar dos veces el gel con agua destilada por 1 min, se agregó la solución reveladora (NaOH 0,525 M y NaBH<sub>4</sub> 2 mM). El tamaño de los productos fue determinado usando el estándar de peso molecular DNA BioMarker™ Low (BioVentures, Inc.), cuyas bandas son de 1.000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100 y 50 bp.

## RESULTADOS

### Análisis serológico

Se analizaron 28 muestras, provenientes del Campo Experimental Los Tilos, de las cuales 24 fueron positivas en un test de ELISA usando un pAB anti-PPV (Sanofi), aunque sólo 10 de estas muestras (hojas y frutos de damascos y durazneros) presentaban síntomas visuales evidentes (Cuadro 2). Al utilizar en el ELISA mAB específicos para epítopes ubicados en la proteína de cubierta del PPV (Cambra *et al.*, 1993), los que reconocen todos los serotipos descritos de este virus en el mundo (mAB 5B, 4DG5, 4DB12 y 1EB6, donados por el Dr. Mariano Cambra, IVIA, Valencia, España), se obtuvo reacción positiva con dos de las muestras que presentaban síntomas de la enfermedad y ninguna reacción en las muestras asintomáticas (Herrera, 1994a).

### Detección del virus por RT-PCR: uso de la matriz GR en la identificación de PPV

Considerando los resultados de los estudios serológicos, se optó por efectuar la identificación del PPV por un método de mayor especificidad y sensibilidad, como es RT-PCR. Para ello, se optimizaron dos protocolos que básicamente constan de tres etapas: obtención de un extracto crudo del tejido infectado que contenga las partículas virales, transcripción reversa del RNA viral y amplificación por PCR de un segmento definido del genoma de PPV usando partidores específicos.

El primer protocolo optimizado fue aquel denominado GeneReleaser-PCR (GR-PCR). La base de este método es usar una matriz polimérica que une inhibidores de las enzimas que participan en la transcripción reversa del RNA y/o en la amplificación del DNA. Con este método y usando los partidores de 3'-NCR (amplifican un fragmento de 220 bp) se obtuvo un total de 21 muestras positivas que presentaron la banda esperada (Figura 3, cuadros 2 y 3). Con los controles positivos (serotipos D, M y El Amar), que fueron procesados paralelamente usando el mismo protocolo, se obtuvo igual resultado (ver Figura 3 para serotipo D). En cambio, al utilizar los partidores de CP no se observó presencia de la banda esperada (243 bp), ni en las muestras provenientes de Los Tilos ni en los controles ya mencionados (resultados no presentados).

### Inmunocaptura de partículas virales y su efecto en la RT-PCR

El segundo protocolo usado se denomina inmunocaptura-PCR (IC-PCR). En este método, el cDNA es sintetizado a partir del RNA obtenido desde

partículas virales que han sido capturadas en una placa de ELISA previamente activada con un pAB anti-PPV (Wetzel *et al.*, 1992, Krczal y Avenarius, 1994). Con este método, además de los controles positivos, 20 muestras presentaron el fragmento de 243 bp al usar los partidores que amplifican

**CUADRO 2. Comparación entre presencia de síntomas y reacciones de ELISA y RT-PCR en hojas y frutos de durazneros y damascos**

**TABLE 2. Comparison between symptomatology and ELISA and RT-PCR results in peach and apricot fruits and leaves**

Muestra	Síntoma	ELISA <sup>a</sup>	GR-3'NCR <sup>b</sup>	GR-CP	IC-3'NCR	IC-CP
1. Fruto damasco	+	+	+	-	+	-
2. Fruto durazno	+	+	+	-	+	+
3. Hoja durazno	+	+	+	-	+	+
4. Hoja durazno	-	+	-	-	-	-
5. Hoja durazno	-	+	+	-	+	+
6. Fruto durazno	-	+	+	-	+	+
7. Hoja durazno	-	+	-	-	-	-
8. Hoja durazno	-	+	-	-	+	+
9. Fruto durazno	-	-	-	-	+	-
10. Hoja durazno	-	-	+	-	+	-
11. Hoja durazno	-	+	+	-	+	+
12. Hoja durazno	-	+	+	-	+	+
13. Fruto durazno	+	+	+	-	+	+
14. Fruto durazno	-	-	+	-	+	-
15. Fruto durazno	-	+	+	-	+	+
16. Fruto durazno	-	+	+	-	+	+
17. Fruto durazno	-	+	+	-	+	+
18. Fruto durazno	-	+	-	-	-	-
19. Fruto durazno	-	+	+	-	+	+
20. Fruto durazno	-	+	+	-	+	+
21. Hoja damasco	+	+	+	-	+	+
22. Fruto damasco	+	+	+	-	+	+
23. Hoja durazno	+	+	+	-	+	+
24. Fruto durazno	+	+	+	-	+	+
25. Fruto durazno	-	+	+	-	+	+
26. Fruto durazno	+	+	-	-	+	+
27. Fruto durazno	+	+	-	-	-	-
28. Fruto durazno	-	-	+	-	+	+

<sup>a</sup>Ensayo de ELISA realizado con anticuerpo policlonal anti-PPV (sanafi).

<sup>b</sup>GR-3'NCR: RT-PCR usando los partidores de 3'NCR (Levy *et al.*, 1984) y el protocolo que usa la matriz GR.

-GR-CP: RT-PCR usando los partidores de CP (Wetzel *et al.*, 1991b) y el protocolo que usa la matriz GR.

-IC-3'NCR: RT-PCR usando los partidores de 3'NCR (Leavy *et al.*, 1994) y el protocolo de la inmunocaptura.

-IC-CP: RT-PCR usando los partidores de CP (Wetzel *et al.*, 1991b) y el protocolo de la inmunocaptura.

**CUADRO 3. Resumen del total de muestras positivas y negativas según cada ensayo indicado en el Cuadro 2 (n = 28)**

**TABLE 3. Total number of positive and negative samples according to the different assays shown in Table 2 (n = 28)**

Síntomas visuales	ELISA	GR-3'NCR	IC-3'NCR	GR-CP	IC-CP
10 + (35,7%)	24 +	21 +	24 +	0 +	28 +
18 - (63,3%)	4 -	7 -	4 -	28 -	8 -

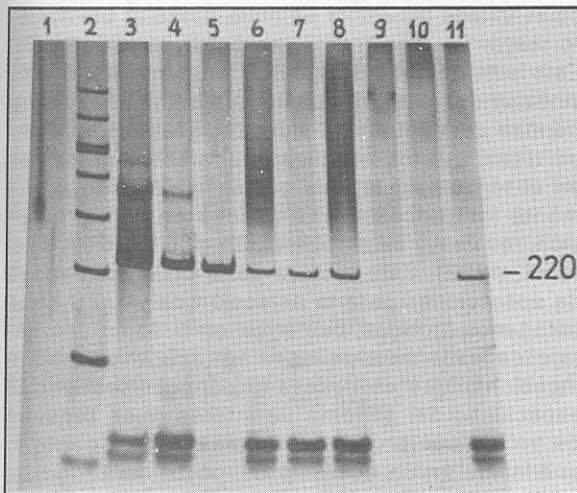


FIGURA 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de fragmentos de amplificación obtenidos a partir del método GR-PCR, usando los partidores de 3'NCR. Carril 1: H<sub>2</sub>O [control (-)]; carril 2: estándar de PM; carril 3: PPV-D; carriles 4 a 11: muestras 21 a la 28. Se indica posición de la banda principal de amplificación (220 bp).

FIGURE 3. Polyacrilamide gel electrophoresis (5%) of samples amplified using the GR-PCR method and the 3'NCR-primers. Lane 1: H<sub>2</sub>O [(-) control]; lane 2: MW standard; lane 3: PPV-D; lanes 4 to 11: samples 21 to 28. The migration of the main amplification band is indicated.

la CP, mientras que no se observó amplificación cuando se usó agua como control negativo (Figura 4, línea 1; cuadros 2 y 3). La banda de 220 bp que se obtiene usando los partidores de 3'-NCR estuvo presente en 24 de las 28 muestras procesadas (Figura 5, cuadros 2 y 3), banda que también se detectó en los controles positivos, y que no se observó al reemplazar los ácidos nucleicos virales por agua o tejido sano.

## DISCUSIÓN

### Presencia de PPV en Chile

Este trabajo reafirmó la presencia del PPV en un huerto localizado en la Región Metropolitana, descrito originalmente por Acuña (1993) y Herrera (1994b) usando anticuerpos específicos. Cabe destacarse que en esta oportunidad la detección fue realizada en base a metodologías que reconocen directamente los ácidos nucleicos del virus, como es el RT-PCR, una aproximación novedosa en nuestro país para tejidos vegetales. Por otra parte, los métodos implementados (GR-PCR e IC-PCR) permiten detectar ínfimas cantidades del virus debido a su gran sensibilidad, lo que asegura un diagnóstico más certero frente a las características que poseen los potyvirus, como es su distribución irregular y bajas concentraciones en el hospedero (Wetzel *et al.*, 1991b).

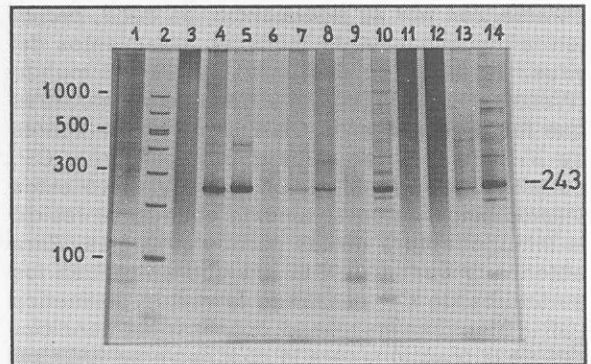


FIGURA 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de productos de amplificación obtenidos usando el método IC-PCR y los partidores de CP. Carril 1: H<sub>2</sub>O; carril 2: estándar de PM de DNA; carril 3 a 12: muestras 1 a 10; carril 13: PPV-M; carril 14: PPV-EI Amar. Se indica la banda del producto de amplificación principal (243 bp).

FIGURE 4. Polyacrilamide gel electrophoresis (5%) of the amplified products obtained by means of the IC-PCR method, using the CP-primers. Lane 1: H<sub>2</sub>O; lane 2: MW standard; lane 3 to 12: samples 1 to 10; lane 13: PPV-M; lane 14: PPV-EI Amar. Main amplification product is shown indicating the size (243 bp).

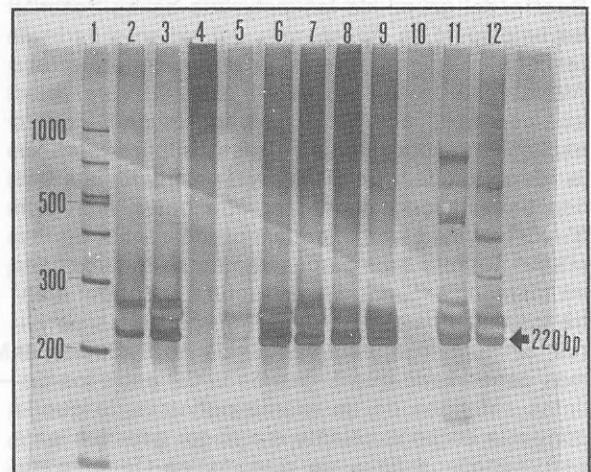


FIGURA 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% que muestra los productos de la amplificación usando el protocolo IC-PCR y los partidores de 3'NCR. Carril 1: Estándar de PM; carril 2 strain D; carril 3: strain M; carril 4: strain EI Amar; carriles 5 y 13: H<sub>2</sub>O; carriles 6 a 12: muestras 16 al 22. Se indica la banda del producto de amplificación principal (220 bp).

FIGURE 5. Polyacrilamide gel electrophoresis (5%) of the amplified products obtained by means of the IC-PCR method, using the 3'NCR-primers. Lane 1: MW standard; lane 2: strain D; lane 3: strain M; lane 4: strain EI Amar; lanes 5 and 13: H<sub>2</sub>O; lanes 6 to 12: samples 16 to 22. Main product is shown indicating the size (220 bp).

### Eficiencia de distintos partidores de PCR

En cuanto a los partidores utilizados, aquellos que amplifican el segmento de 243 bp (partidores de CP), son los más usados en la detección e identificación de PPV (M. Cervera, Univ. de Ghent, Bélgica, comunicación personal). Estos partidores se

caracterizan por su polivalencia, es decir, permiten la identificación de múltiples aislamientos del virus, descritos en diferentes partes del mundo (Wetzel *et al.*, 1991b). En el caso de las muestras que fueron aisladas en Chile, tanto los partidores de 3'-NCR como aquellos que amplifican la CP, permitieron la identificación de PPV, pero estos últimos amplificaron solamente cuando se realizó la inmunocaptura de las partículas virales. Para obtener la banda de 243 bp que amplifican los partidores de CP utilizando la matriz polimérica (GR-PCR) sería necesario optimizar las condiciones de la reacción, para lo cual deberían variarse, por ejemplo, las concentraciones de  $MgCl_2$ , dNTPs, partidores, cDNA; la temperatura de apareamiento, etc. Aunque no se puede descartar que este tratamiento afecte al templado de cDNA viral, es menos probable que la causa de no observar productos de amplificación se deba a interferencia de la matriz, dado que GR-PCR fue efectivo con los otros partidores usados en este trabajo (3'-NCR).

Dentro del grupo de los potyvirus se ha descrito un bajo nivel de divergencia del extremo carboxi-terminal del gen de la proteína de envoltura (Wetzel *et al.*, 1991b; Cervera *et al.*, 1993), región que es amplificada por los partidores de CP. Esto explicaría la polivalencia de estos partidores en la identificación del PPV, y justificaría su uso con fines taxonómicos. Por otra parte, la región 3'-NCR que es amplificada por los partidores del mismo nombre ha sido descrita como heterogénea en tamaño, secuencia y estructura secundaria entre los distintos miembros del grupo de los potyvirus; sin embargo, esta secuencia no traducida es más conservada que el gen de la CP entre los distintos serotipos de un mismo potyvirus, lo que la convierte en un excelente marcador genético para ser usado con fines de diagnóstico (Riechmann *et al.*, 1992). Si se comparan las secuencias de tres aislados de PPV, la divergencia encontrada en el extremo 3' de los genes de CP es de 3,4%, mientras que para la región 3'-NCR es de sólo 1% (Cervera *et al.*, 1993). Por lo tanto, si se tuviera que recomendar un partidore que permitiera identificar PPV en particular, se debiera recurrir a aquellos que amplifican el segmento de 220 bp de la región 3'-NCR; por el contrario, los partidores de CP podrían reconocer a otros virus que pertenecen al mismo grupo, dado el alto grado de homología que presenta esta región en los potyvirus, originando falsos resultados positivos.

#### Comparación de metodologías de RT-PCR

De los dos métodos optimizados para la RT-PCR, aquel que involucra la inmunocaptura de las parti-

culas virales (IC-PCR) permitió detectar un número mayor de muestras como positivas (Cuadro 3). Esto está determinado por un aumento en la sensibilidad del método, puesto que la inmunocaptura permite concentrar las muestras y al mismo tiempo disminuye los posibles interferentes presentes en el tejido vegetal, los cuales afectan negativamente los procesos enzimáticos en la transcripción reversa y la amplificación por PCR (Wetzel *et al.*, 1992). Esta técnica tiene un amplio rango de aplicaciones para la detección de virus u otros patógenos (hongos, bacterias, etc). Como desventaja de este método de diagnóstico se puede mencionar que es necesario conocer secuencias específicas del genoma de interés, y se requiere de un anticuerpo que «capture» al patógeno, lo que incide en un aumento del costo del proceso.

Por otra parte, con el método denominado GR-PCR se obtuvo un número menor de muestras positivas (Cuadro 3), por lo que se puede inferir que no es posible alcanzar la misma sensibilidad del método de inmunocaptura; esta menor sensibilidad también se podría explicar por el menor volumen de muestra usado (ver Métodos). A pesar de ello, GeneReleaser es recomendable para realizar un screening masivo, ya que (i) es una metodología de fácil aplicación; (ii) la sensibilidad alcanzada con él es similar a la obtenida con otros métodos que hasta ahora se utilizan para identificación de patógenos (por ej., ELISA); (iii) existen ventajas para la preparación de las muestras, puesto que requiere de pequeñas cantidades de tejido y evita el uso de solventes orgánicos que generan desechos tóxicos; y, (iv) es de bajo costo y permite que con un tratamiento simple y rápido se obtenga un extracto utilizable en la RT-PCR (Levy *et al.*, 1994).

#### Resultados de ELISA vs. RT-PCR

Respecto de las diferencias observadas entre los resultados obtenidos con ELISA o RT-PCR, hubo 4 muestras que fueron negativas al test de ELISA y positivas a alguno de los protocolos de RT-PCR, mientras que otras 4 muestras fueron ELISA positivo y no presentaron la banda de amplificación por RT-PCR. Este resultado parece contradictorio, dado que ELISA se considera de menor sensibilidad que un método basado en PCR; sin embargo, podría explicarse como falsos positivos del ensayo de ELISA, determinado por lavados ineficientes o por reacción cruzada de los anticuerpos policlonales. Otra explicación para estas diferencias entre ELISA y RT-PCR es que se ha demostrado que existe una distribución irregular del virus en el árbol infectado, por lo que una misma muestra podría contener varias hojas, con distinto grado de



infección. Sin embargo, también es posible que existan diferencias puntuales en las secuencias nucleotídicas de los aislados locales, lo que podría afectar la unión de los partidores al templado de cDNA. Si estas modificaciones puntuales de la secuencia del virus no modifican la conformación de la proteína de cubierta (CP), entonces es probable que la unión de los anticuerpos no se vea afectada, obteniéndose un ensayo de ELISA positivo.

Finalmente, existe la posibilidad de que el virus «asintomático» presente esta característica debido a que está en bajos títulos en el árbol infectado, o no ha alcanzado los niveles en algún compartimento dentro del tejido vegetal, que podría ser un requisito para la manifestación de los síntomas («período de latencia»). Sin embargo, no es esto lo que sugieren los resultados con los mAB, los cuales han sido preparados para detectar específicamente los diferentes aislamientos de PPV. El que este nuevo aislamiento asintomático sea reconocido por un pAB anti-PPV, pero no lo sea por los diferentes monoclonales ensayados, sugiere fuertemente que una porción de la CP conserva su estructura secundaria o terciaria, mientras que aquellos epitopes reconocidos por los mAB han sido modificados o perdidos. La respuesta a esta interrogante se obtendrá al secuenciar el gen de la proteína de cubierta del aislado chileno de PPV en su totalidad.

Hoy, la mayor limitación para el uso rutinario de la RT-PCR como técnica de diagnóstico es su alto costo. Sin embargo, la gran sensibilidad y especificidad que es posible alcanzar debe ser considerada al momento de evaluar costos y beneficios. Por otra parte, se debe tener precaución en la recolección del tejido para el análisis, porque cuando se trabaja con fitopatógenos que se distribuyen irregularmente en el hospedero, no es difícil obtener falsos negativos derivados de muestras no representativas. El mantenimiento de las muestras a una temperatura que no afecte la estabilidad del fitopatógeno es otro punto importante de control, así como la forma en que éstas se manipulen, todo esto en beneficio de un diagnóstico más certero.

Es importante proseguir con un análisis más profundo de las muestras infectadas con PPV, especialmente de aquellas obtenidas de árboles que no exhibieron síntomas (Cuadro 2), pues es posible que se esté ante la presencia de un aislamiento avirulento o de virulencia moderada de PPV. Si este fuera el caso, sería posible usar este virus atenuado en frutales de carozo, para otorgarles «protección cruzada» frente a razas más virulentas del virus (Fulton, 1986). Esta protección cruzada ha sido utilizada con éxito en el control de la enfermedad de la tristeza de los cítricos (virus RNA), especialmente en Brasil, donde, ya en el año 1980, existían 8 millones de árboles protegidos con aislamientos moderados del virus que provoca esta enfermedad (Costa y Müller, 1980).

## RESUMEN

El virus plum pox (PPV, potyvirus) es el agente causal de la enfermedad de Sharkas. Este virus ataca severamente árboles frutales de carozo, donde usualmente se encuentra en muy bajos títulos e irregularmente distribuido en diferentes tejidos de la planta. Hasta ahora, PPV estaba restringido a Europa y la parte norte de África, pero el virus fue detectado por primera vez fuera de esa región, en Chile (Acuña, 1993), en el Campo Experimental Los Tilos del INIA (Santiago). Considerando la importancia crucial de esta enfermedad, se hace necesario contar con una técnica de detección de alta sensibilidad para controlar su dispersión. En este trabajo se presenta la optimización de un método de detección basado en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), lográndose la amplificación específica de un fragmento del genoma viral.

A partir del RNA viral presente en un extracto crudo de hojas o frutos, se preparó cDNA correspondiente al extremo 3' del virus. Este cDNA sirvió de templado en una reacción de PCR, usando partidores que reconocen y se alinean en secuencias específicas del extremo 3' del genoma viral. Con este procedimiento se amplificó un fragmento de 243 bp, correspondiente a la región carboxi-terminal del gen de la proteína de cubierta viral (partidores de CP) y un fragmento de 220 bp de la región 3'-no codificante del genoma de PPV (partidores de 3'-NCR). La amplificación de estos fragmentos de ADN permitió la detección específica del virus en 24 muestras, de un total de 28, en su mayoría sero-positivas frente a un anticuerpo policlonal anti-PPV, aunque sólo un 36% de estas muestras presentaban síntomas visuales de la enfermedad.

**Palabras claves:** RT-PCR, enfermedad de Sharkas, virus, diagnóstico, PPV, *Prunus* sp.

## LITERATURA CITADA

- ACUÑA, R. 1993. Outbreaks of Plum Pox Virus in Chile. Abstract, Conference on Plum Pox, Bordeaux, France, October 5-8, 1993.
- ATANASSOF, D. 1932. Sarka po silvite, edna nova virus a bolest. Jb. Univ. Sofia Agronom. Fak. 11: 4970.
- CAMBRA, M., ASENSIO, M., GORRIS, M., PÉREZ, E., CAMARASA, E., LÓPEZ-MOYA, J.J., LÓPEZ-ABELLA, D., SANZ, A. and VELA, C. 1993. Detection of plum pox virus using monoclonal antibodies to structural and non structural proteins. Abstract, Conference on Plum Pox, Bordeaux, France, October 5-8, 1993.
- CERVERA, M.T., RIECHMANN, J.L., MARTÍN, M.T. and GARCÍA, J.A. 1993. 3'-terminal sequence of the plum pox virus PS and 6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. J. Gen. Virol. 74: 329-334.
- COSTA, A.S. and MÜLLER, G.W. 1980. Tristeza control by cross protection: A U.S.-Brazil cooperative success. Plant Disease 64(6): 538-541.
- FULTON, R.W. 1986. Practices and precautions in the use of cross protection for plant disease control. Ann. Rev. Phytopathol. 24: 67-81.
- HADIDI, A. and LEVY, L. 1994. Accurate identification of Plum Pox potyvirus and its differentiation from Asian prunus latent potyvirus in Prunus germplasm. EPPO Bulletin 24(3): 633-643.
- HERRERA, G. 1994a. Detección de la Enfermedad de Sharkas (Plum Pox Virus) en una vieja colección de carozos en la subestación experimental Los Tilos (INIA), Chile. Agricultura Técnica (Chile) 54 (2):187-191.
- HERRERA, G. 1994b. Enfermedad de Sharkas: El peligro de la importación de material vegetativo. IPA-La Platina 83: 16-19.
- KRCZAL, G. and AVENARIUS, U. 1994. Detection and characterization of Plum Pox potyvirus isolates from Southern Germany by polymerase chain reaction (PCR). EPPO Bulletin 24(3): 625-631.
- LAÍN, S., RIECHMANN, J.L. and GARCÍA, J.A. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. Virus Research 13: 157-172.
- LEVY, L. and HADIDI, A. 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with Plum Pox potyvirus for use with specific 3'non-coding region RT-PCR assays. EPPO Bulletin 24(3): 595-604.
- LEVY, L., LEE, I.M. and HADIDI, A. 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of viruses, viroids and MLOs. J. Virol. Methods 49: 295-304.
- MAISS, E., TIMPE, U., BRISKE, A., JELKMANN, W., CASPER, R., HIMMLER, G., MATTANOVICH, D. and KATINGER, H.W.D. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. J. Gen. Virol. 70: 513-524.
- MINAGRI-MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1994. Servicio Agrícola y Ganadero establece el control obligatorio de la plaga de los vegetales que indica en todo el territorio nacional y establece medidas de carácter obligatorio. Diario Oficial Nº 34. 843: 2.
- PAPPU, S.S., BRAND, R., PAPPU, H.R., RYBICKI, E.P., GOUGH, K.H., FRENKEL, M.J. and NIBLETT, C.L. 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. J. Virol. Methods 41: 9-20.
- RIECHMANN, J.L., LAÍN, S. and GARCÍA, J.A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. J. Gen. Virol. 73: 1-16.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and EHRlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
- TEYCHENEY, P.Y., TAVERTE, G., DELBOS, R., RAVELONANDRO, M. and DUNEZ, J. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). Nucleic Acids Res. 17: 10115-10116.
- WETZEL, T., CANDRESSE, G., RAVELONANDRO, R., DELBOS, R.P., MAYZAD, H., ABOUL-ATA, A.E. and DUNEZ, J. 1991a. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El-Amar strain plum pox potyvirus. J. Gen. Virol. 72: 1741-1746.
- WETZEL, T., CANDRESSE, T., RAVELONANDRO and DUNEZ, J. 1991b. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. J. Virol. Methods 33: 355-365.
- WETZEL, T., CANDRESSE, G., RAVELONANDRO, R. and DUNEZ, J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. J. Virol. Methods 39: 27-37.