

## **Diagnóstico rápido de virus en frutales de hueso mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-DAS.**

M. CAMBRA, G. LLÁCER, D. PÉREZ DE SAN ROMÁN, P. MORENO y V. DURBÁ.

La certificación de plantas frutales exige la realización de un gran número de ensayos de diagnósticos virales en el menor tiempo posible. La puesta a punto, para frutales de hueso, de la técnica del microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, como método de obtención de plantas libres de virus, requiere asimismo una técnica de detección rápida y fiable que pueda aplicarse muy precozmente. El método ELISA reúne todos estos requisitos.

En el presente trabajo se establecen las condiciones óptimas para la aplicación del método ELISA-DAS al diagnóstico de «prunus ring spot virus», «prune dwarf virus» y «chlorotic leaf spot virus» en frutales de hueso: dosis idóneas de tapizado y conjugado, tampones de extracción, cepas de virus detectables, material vegetal y épocas de toma de muestras. A este respecto se ha comprobado la posibilidad de detectar virus en ramos incluso en el invierno, lo que permite la realización de diagnósticos en cualquier época del año. Se discuten las ventajas de la técnica, en comparación con los métodos tradicionales de diagnóstico, para programas que requieren analizar gran número de muestras en un período corto, y se expone la posibilidad de detectar cualquiera de los 3 virus (o mezcla de ellos) en un solo ensayo, utilizando un antisuero polivalente artificial.

M. CAMBRA, G. LLÁCER, C. PÉREZ DE SAN ROMÁN, P. MORENO y V. DURBÁ. *Departamento de Protección Vegetal, CRIDA-07 (Levante), INIA. Moncada (Valencia).*

### **INTRODUCCION**

Los frutales de hueso pueden estar afectados por distintos tipos de virus. El más importante, a nivel europeo, es el virus de la sharka («plum pox virus» o PPV), que se transmite de forma natural por pulgones y afecta al ciruelo, albaricoquero y melocotonero en, al menos, 16 países (OEPP, 1974). El virus de la sharka no ha sido detectado hasta el momento en España (CAMBRA, LLÁCER y GELLA, 1981), pero representa una amenaza constante debido a su presencia en Francia, Holanda y otros países europeos con los que se

mantienen frecuentes intercambios de material vegetal.

Entre los virus más extendidos en España se hallan los del grupo ILAR (isométricos, lábiles, «ring spot»), que pueden transmitirse por semilla y polen y afectan a todos los frutales de hueso. Sus representantes más característicos en Europa son «prunus ring spot virus» (PRSV) y «prune dwarf virus» (PDV). Son virus típicamente insidiosos, que no producen daños llamativos pero que reducen, a menudo, el crecimiento y las cosechas en porcentajes nada despreciables (LLÁCER, 1978).

Otro virus muy extendido en España es el «chlorotic leaf spot virus» (CLSV) que, aunque muchas veces latente, es capaz de producir enfermedades graves en las siguientes especies y variedades (LLÁCER, 1978):

- Albaricoquero: «Viruela» de la variedad Búlida, «Roseta» de la variedad Luizet e incompatibilidades intraespecíficas sobre el patrón A-843.
- Melocotonero: Incompatibilidad en la combinación Ribet/ciruelo de Ente GF-43.
- Ciruelo: «Falsa sharka» («pseudo plum pox») en diversas variedades y «Hendiduras de la corteza» («bark split») en ciruelo de Ente sobre todo.

Ante la ineficacia de los métodos directos, la lucha contra los virus que afectan a los árboles frutales se basa en multiplicar exclusivamente plantas sanas, previa eliminación de las contaminadas, para asegurar a viveristas y productores un material inicial sano. Estos programas de selección sanitaria exigen métodos de diagnóstico fiables, sensibles, rápidos, económicos y capaces de ser utilizados a gran escala. Los métodos tradicionales de diagnóstico consisten fundamentalmente en la inoculación por injerto de plantas leñosas indicadoras (LLÁCER, 1978). Aunque estos métodos son bastante fiables y sensibles, poseen el gran inconveniente de ser lentos (de 2 meses a 3 años), caros y difíciles de emplear en gran escala (requieren, por lo general, importantes superficies de vivero e invernadero acondicionado y muchas operaciones manuales).

Entre las técnicas de diagnóstico recientemente incorporadas a la patología vegetal, el denominado «método inmunoenzimático», y abreviadamente ELISA («Enzyme-Linked Immunosorbent Assay»), ha venido a perfeccionar o sustituir a otras técnicas más tradicionales, gracias a su alta sensibilidad, especificidad, rapidez, economía y capacidad de ser usado sobre gran número

de muestras de una forma rutinaria y objetiva (SÁNCHEZ-VIZCAÍNO y CAMBRA, 1981).

El primer estudio de aplicación del método ELISA, en su variante de doble «sandwich» de anticuerpos (ELISA-DAS), a la detección de virus de vegetales fue publicado por VOLLER *et al.* (1976). A continuación CLARK *et al.* (1976), DUNEZ (1977), BARBARA *et al.* (1978) y FLEGG y CLARK (1979) pusieron de manifiesto el evidente interés del método ELISA para la detección de virus de frutales, concretamente el virus de la sharka, los virus ILAR y el CLSV.

La aparición en España de la reglamentación del Ministerio de Agricultura, regulando la certificación de plántulas de frutales, exigirá la realización de un gran número de ensayos de diagnóstico viral en el menor tiempo posible. Por otra parte, en el CRIDA-07 (Levante) del INIA se está trabajando en la puesta a punto de la técnica del microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para frutales de hueso (NAVARRO *et al.*, 1980 y 1982) como método de obtención de plantas libres de virus, lo que requiere asimismo una técnica de detección rápida y fiable que pueda aplicarse muy precozmente. El método ELISA era el que mejor parecía reunir todos estos requisitos, por sus características y por la posibilidad teórica de utilizarlo con antisueros polivalentes artificiales que permitiesen detectar la presencia de cualquiera de los virus citados en un solo análisis, como a continuación se describe.

El presente trabajo tiene por objeto exponer también los estudios realizados sobre las condiciones de aplicación del método al diagnóstico de los virus ILAR y CLSV en frutales de hueso en España, comparando sus resultados con las técnicas convencionales y estudiando el tipo de material vegetal y la época idónea de recolección del mismo para realizar la técnica con máxima fiabilidad. Todos estos datos son necesarios para aplicar el método a

gran escala y no habían sido abordados anteriormente.

## MATERIAL Y METODOS

### Material vegetal

Para la puesta a punto de la técnica inmunoenzimática ELISA se utilizó una colección de melocotoneros, variedades Cardinal y Dixired, injertados sobre melocotonero de semilla Nemaguard e inoculados por injerto, en septiembre de 1978, con distintas cepas de los virus PRSV, PDV y CLSV. Estos melocotoneros se cultivaron en macetones situados en un recinto al aire libre protegido por malla anti-pulgón.

Posteriormente se ensayó la técnica con otros materiales frutales, entre los que podemos destacar los siguientes: ciruelos europeos e híbridos naturales almendro × melocotonero de colecciones de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza) del CSIC y clones de melocotonero Cofrentes, albaricoquero Búlida y ciruelo Pollizo de Murcia preseleccionados en el Centro de Levante (CRIDA-07) del INIA.

### Antisueros y cepas de virus

Los antisueros brutos de PRSV y PDV fueron suministrados por el Dr. Fulton, del Department of Plant Pathology de la Universidad de Wisconsin-Madison (USA), y los de CLSV se recibieron del Dr. Dunnez, de la Station de Pathologie Végétale, Centre de Recherches Agronomiques de Bordeaux (Francia), y del Dr. Clark, de la East Malling Research Station, Maidstone (Gran Bretaña).

Los sueros anti-PRSV y anti-PDV se ensayaron frente a las siguientes cepas de virus ILAR: «Prunus ring virus», «Necro-

tic ring spot virus», «Necrotic ring virus», «Necrotic ring mottle virus», «Rugose mosaic virus», «Almond calico virus», «Chlorotic ring virus», «Chlorotic necrotic ring virus» y «Sour cherry yellows virus».

Los sueros anti-CLSV se ensayaron, a su vez, frente a las cepas: «In 21» (*Prunus salicina*), «bark split virus», «pseudo plum pox virus» y «butteratura».

Todas las cepas de virus citadas hasta ahora estaban inoculadas sobre la colección de melocotoneros descrita en el apartado de material vegetal y procedían de la Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière de la Grande Ferrade del INRA de Burdeos (Francia).

Los sueros anti-CLSV se ensayaron además frente a cepas de «Viruela» presentes en albaricoqueros Búlida y ciruelos Pollizos de Murcia.

### Preparación de reactivos

La purificación de inmunoglobulinas se realizó a partir de los antisueros brutos siguiendo la técnica descrita por CAMBRA, MORENO y NAVARRO (1979) con ligeras modificaciones. El antisuero se diluyó 1/10 en agua destilada estéril y se precipitaron sus inmunoglobulinas con una solución saturada de sulfato de amonio añadida volumen a volumen. Tras reposo de 30 minutos a 4° C se centrifugó 20 minutos a 20.000 g y el precipitado fue resuspendido en 2 ml. de agua fisiológica tamponada (AFT), 0,1 M, pH 7,2 (0,8 por 100 ClNa, 0,04 por 100 PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na.2H<sub>2</sub>O, 0,27 por 100 PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O, 0,02 por 100 N<sub>3</sub>Na) diluida 1/2. La solución fue dializada a 4° C con el mismo tampón utilizando una célula de ultrafiltración molecular AMICON provista de una membrana XM100 A y, a continuación, en dosis de 2 ml. fue pasada por una columna de DEAE-Sephacel celulosa. El eluato se impulsó mediante una bomba peristáltica a través de una célula

de lectura ISCO conectada a un registrador. Se recuperó la primera fracción con absorbancia a 280 nm. Esta fracción, que corresponde a inmunoglobulinas, fue concentrada por ultrafiltración utilizando una célula AMICON 12 provista de membrana XM100 A. La solución resultante fue esterilizada por filtración a través de una membrana MILLIPORE de  $0,45 \mu$  y almacenada a  $-18^\circ \text{C}$  en frascos de vidrio.

La preparación de los conjugados inmunoglobulina-enzima se realizó según el método descrito por CLARK y ADAMS (1977) utilizando 5 mg. de fosfatasa alcalina SIGMA tipo VII. La solución de enzima se centrifugó durante 10 minutos a 20.000 g y el precipitado fue resuspendido con una solución de 2 mg. de inmunoglobulinas. Tras dializar a  $4^\circ \text{C}$  contra tampón AFT 1/2, se añadió glutaraldehído purificado hasta una concentración final del 0,05 por 100 y se dejó 4 horas en reposo a temperatura ambiente. A continuación se dializó contra tampón AFT 1/2, se añadió 0,5 por 100 de albúmina de suero bovino y se conservó el conjugado a  $-18^\circ \text{C}$  en frascos de vidrio, una vez filtrado por  $0,45 \mu$  y adicionado volumen a volumen con glicerol.

### Realización del ensayo inmunoenzimático

El ensayo inmunoenzimático ELISA-DAS («double antibody sandwich») se realizó habitualmente en las cuatro etapas clásicas (figura 1) descritas por ENGVALL y PERLMANN (1971), aunque en algunos casos, para la detección del CLSV, se utilizó también la variante del método propuesta por FLEGG y CLARK (1979).

Como inmunoabsorbente se utilizaron microplacas de poliestireno M129B (DYNATECH). La dosis idónea de tapizado para cada antisuero fue determinada ensayando concentraciones entre  $0,1$  y  $20 \mu \text{g/ml}$

de inmunoglobulinas (Ig). Las placas ya tapizadas, lavadas y secas se conservaron a  $-18^\circ \text{C}$  hasta su utilización.

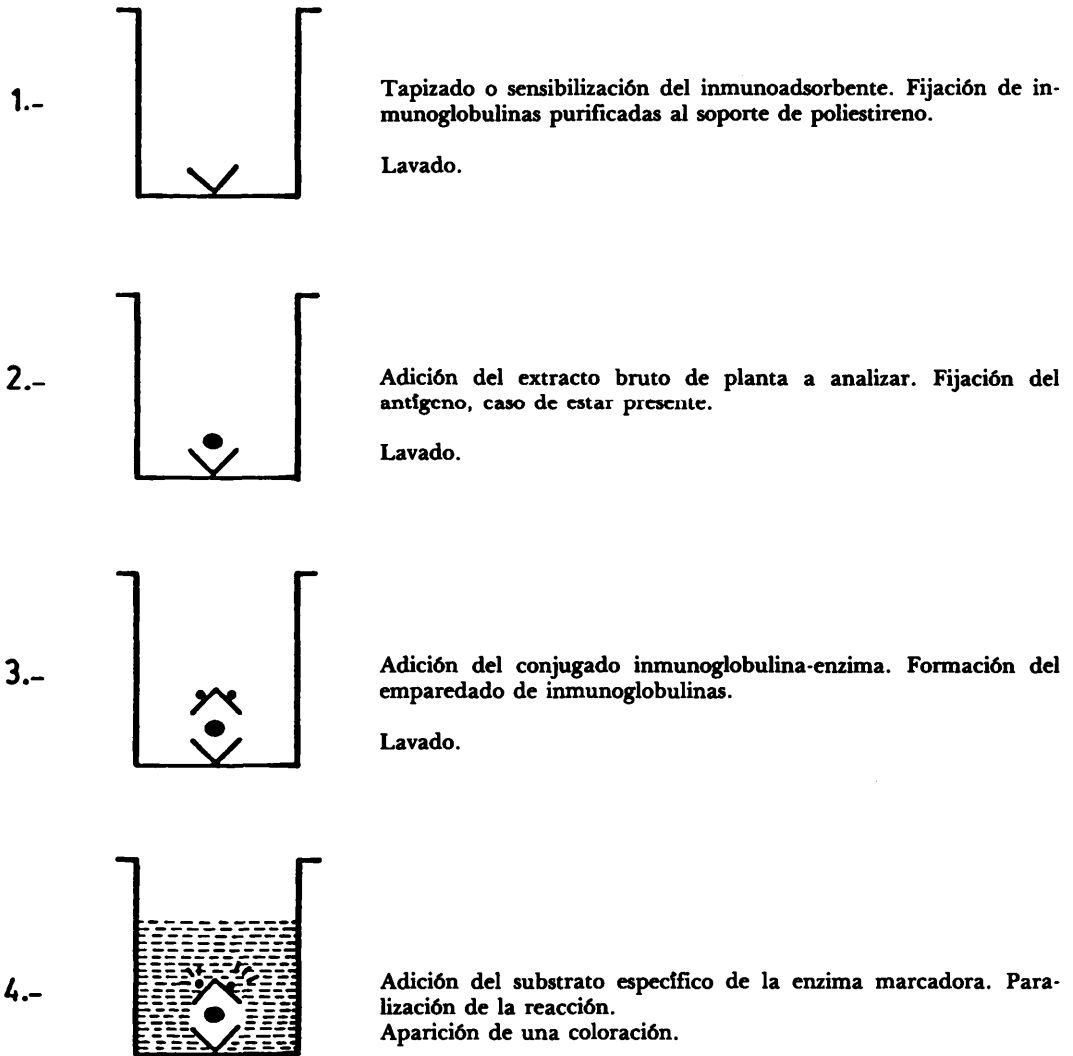
Los extractos de muestras vegetales fueron preparados con un homogeneizador de vástago POLYTRON tipo PT 10-35 (Kinematica). Como tampón de extracción se empleó una solución de 2 por 100 de polivinil pirrolidona (PVP-10.000) en agua fisiológica tamponada (AFT), o este mismo tampón con diferentes aditivos: 0,2 por 100 de dietilditiocarbamato sódico (DIECA), 0,2 por 100 de ovoalbúmina y 2,5 por 100 de ácido nicotínico.

La dosis idónea del conjugado inmunoglobulina-enzima (Ig-E) a utilizar para la detección de cada virus se determinó ensayando diversas diluciones que variaron entre 1/100 y 1/4.000 del conjugado en tampón de extracción sin aditivos.

La reacción serológica se reveló utilizando una solución de 1 mg/ml de p-nitrofenil fosfato en un tampón pH 9,8 conteniendo 10 por 100 de dietanolamina en agua destilada. La lectura de resultados se realizó en un lector automático de placas TITERTEK MULTISKAN (Flow), a los 30 y 60 minutos de comenzar la reacción enzimática.

### Determinación del material vegetal y épocas más idóneas de toma de muestras

Durante un ciclo vegetativo completo de los melocotoneros inoculados con PRSV, PDV y CLSV se tomaron periódicamente muestras representativas de cada estado vegetativo: en primavera, botones florales, pétalos, anteras, flores completas, hojas jóvenes y brotes tiernos; en verano, hojas jóvenes, hojas adultas y frutos (pedúnculo y mesocarpo); en otoño, hojas adultas, hojas agostadas y ramos; y, en invierno, ramos y yemas latentes. Todas estas muestras, junto con otras equivalentes de árbo-



Observación visual o espectrofotométrica del producto coloreado. La intensidad del color es proporcional a la concentración de antígenos en la muestra.

Fig. 1. — Principio del método ELISA-DAS.

- ∨ — Inmunoglobulinas purificadas.
- — Antígeno.
- ∧ — Conjugado inmunoglobulina-enzima.

les sin inocular, fueron analizadas a fin de comprobar la capacidad de la técnica ELISA para detectar los virus en cada tipo de material y época del año, y las posibilidades de utilización de la misma en ensayos rutinarios de selección sanitaria.

### Comparación de la técnica ELISA con los métodos tradicionales de diagnóstico

A fin de establecer la fiabilidad de la técnica ELISA, ésta se ha comparado con los métodos tradicionales de inoculación de indicadores leñosos. En el caso de los virus ILAR, 46 plantas de melocotonero y 60 del híbrido almendro  $\times$  melocotonero fueron analizadas mediante la técnica ELISA y, paralelamente, yemas de estas plantas fueron injertadas sobre el indicador *Prunus serrulata*, variedad Shirofugen. La comparación con CLSV se llevó a cabo en forma análoga, pero utilizando el indicador melocotonero de semilla GF-305. Se analizaron 18 plantas de melocotonero, 14 de albaricoquero y 92 del híbrido almendro  $\times$  melocotonero. Los métodos de inoculación, en cada caso, fueron los descritos por LLACER (1978).

### Antiseros polivalentes artificiales

Con el objeto de comprobar la posibilidad de detectar en un solo ensayo cualquiera de los virus citados anteriormente o infecciones mixtas de ellos, se prepararon antiseros artificiales mediante mezcla de inmunoglobulinas y, en su caso, conjugados anti-PRSV y anti-PDV o anti-PRSV, anti-PDV y anti-CLSV. Las mezclas se prepararon de forma que cada uno de los componentes estuviese en la concentración óptima previamente establecida para la realización del ensayo. Estos antiseros polivalentes fueron comparados con los antiseros específicos de cada virus frente a

extractos de plantas sin inocular, de plantas inoculadas con un virus y mezclas de extractos de plantas inoculadas con virus diferentes. La concentración de cada virus en la mezcla fue la misma que en los extractos individuales, para lo cual éstos se diluyeron adecuadamente con extracto de plantas sin inocular. Las cepas de virus utilizadas para los ensayos fueron: «almond calico virus» (PRSV), «chlorotic necrotic ring virus» (PDV) y «butteratura» (CLSV).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Condiciones idóneas de realización del ensayo y cepas detectadas

#### *Concentraciones de tapizado y conjugado*

En la figura 2 se puede apreciar la variación de la absorbancia o densidad óptica obtenida a 405 nm, en función de la concentración de tapizado con inmunoglobulinas anti-PRSV y anti-PDV. Puede observarse cómo la densidad óptica aumenta con la concentración de tapizado hasta alcanzar un valor de saturación que corresponde a la concentración  $2,5 \mu\text{g/ml}$  de Ig. Para la detección rutinaria de ambos grupos de virus se ha seleccionado una concentración de  $2 \mu\text{g/ml}$  como la más idónea, ya que proporciona valores de densidad óptica claramente distinguibles de los que dan los extractos de planta sana y representa una economía de reactivos.

Las figuras 3 y 4 muestran la variación de la densidad óptica en función de la concentración de tapizado y de la dilución del conjugado inmunoglobulina-enzima para los virus PRSV y PDV, respectivamente. Para la concentración de  $2 \mu\text{g/ml}$  de tapizado se han elegido como diluciones idóneas del conjugado 1/1.000 para

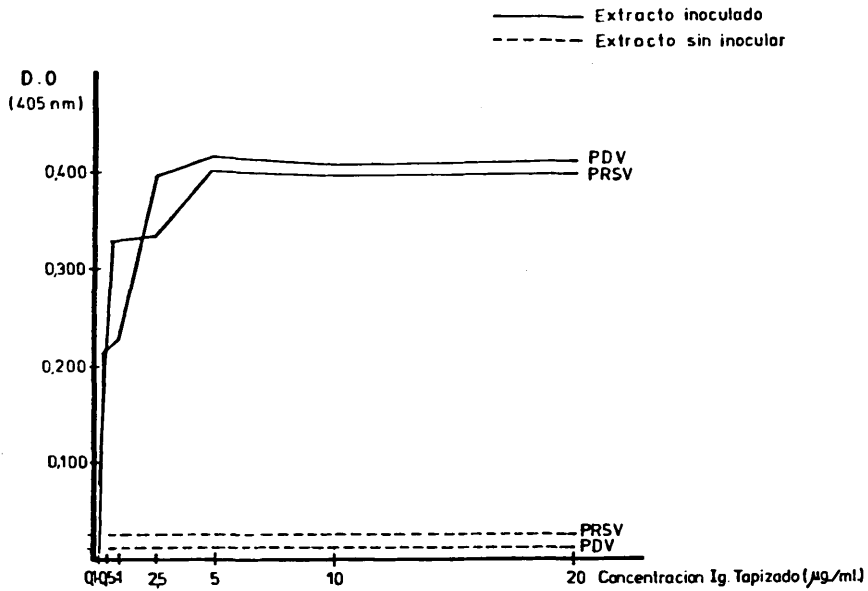


Fig. 2.—Variación de la densidad óptica (405 nm) en función de la concentración de tapizado con inmunoglobulinas anti-PRSV y anti-PDV, para un extracto de planta inoculada con PRSV o con PDV y para un extracto de planta sin inocular.

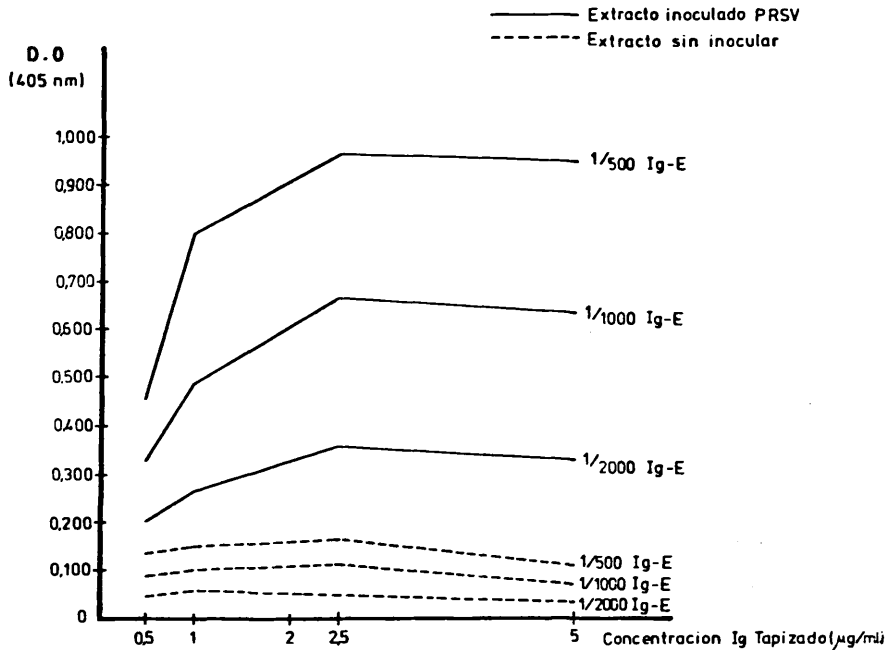


Fig. 3.—Variación de densidad óptica (405 nm) en función de la concentración del tapizado y de la dilución del conjugado inmunoglobulina-enzima para un extracto de planta inoculada con PRSV y un extracto de planta sin inocular.

PRSV y 1/2.000 para PDV. En forma análoga, en la figura 5, se representa la variación de densidad óptica en función de las concentraciones de tapizado y conjugado para la detección del CLSV. Se ha optado por una concentración de tapizado de  $2 \mu\text{g/ml}$  de inmunoglobulinas y una dilución de conjugado de 1/200.

En todos los casos se ha comprobado que las placas, una vez sensibilizadas, lavadas y secas, pueden conservarse a  $-18^\circ\text{C}$  durante al menos un año, siendo válidas para la realización del ensayo.

#### *Tampón de extracción de virus*

El tampón de extracción AFT con 1 por 100 de PVP, sin más aditivos, ha proporcionado buenos resultados para la detección de los virus ILAR en melocotonero y ciruelo, empleando una relación peso de muestra/volumen de tampón de 1/20.

El diagnóstico de CLSV en melocotonero es factible con el mismo tampón de extracción empleado para los virus ILAR, adicionado de 0,2 por 100 de DIECA y 0,2 por 100 de ovoalbúmina, sin necesidad de añadir nicotina ni de utilizar la modificación propuesta por FLEGG y CLARK (1979). En cambio, para la detección de CLSV en albaricoquero se requiere o bien la incubación simultánea del extracto y del conjugado (modificación de FLEGG y CLARK, 1979) o la adición de ácido nicotínico al 2,5 por 100 al tampón de extracción tal como recomiendan DETIENNE, DELBOS y DUNEZ (1980). En nuestras condiciones, se obtienen mejores resultados con la adición de nicotina, empleándose una relación peso de muestra/volumen de tampón de 1/10 ó 1/20.

#### *Cepas de virus detectadas*

En las condiciones descritas, los sueros anti-PRSV, anti-PDV y anti-CLSV fue-

ron capaces de detectar las siguientes cepas de virus:

#### — *Suero anti-PRSV*

prunus ring virus  
necrotic ring spot virus  
necrotic ring virus  
necrotic ring mottle virus  
rugose mosaic virus  
almond calico virus

#### — *Suero anti-PDV*

chlorotic ring virus  
chlorotic necrotic ring virus  
sour cherry yellows virus

#### — *Suero anti-CLSV*

bark split virus  
In 21 (*prunus salicina*)  
pseudo plum pox virus  
butteratura  
viruela

#### **Material vegetal y épocas de toma de muestras**

Se ha comprobado que la técnica ELISA permite la detección de los virus PRSV, PDV y CLSV sobre melocotonero en cualquier época del año, utilizando preferentemente flores, hojas jóvenes o brotes tiernos en primavera, hojas jóvenes en verano y ramos en otoño e invierno.

Se ha logrado también la detección de los virus ILAR en botones florales, pétalos, anteras, flores cuajadas, hojas adultas y frutos, no obstante la fiabilidad del ensayo en hojas agostadas es baja.

La posibilidad de detectar estos virus en ramas (tanto en yemas latentes como



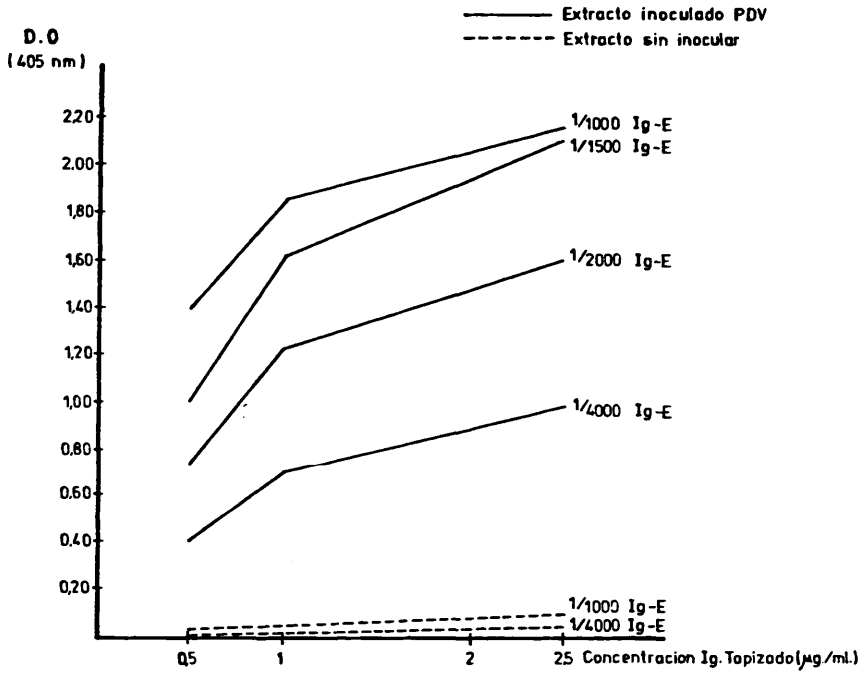


Fig. 4. — Variación de la densidad óptica (405 nm) en función de la concentración del tapizado y de la dilución del conjugado inmunoglobulina-enzima para un extracto de planta inoculada con PDV y un extracto de planta sin inocular.

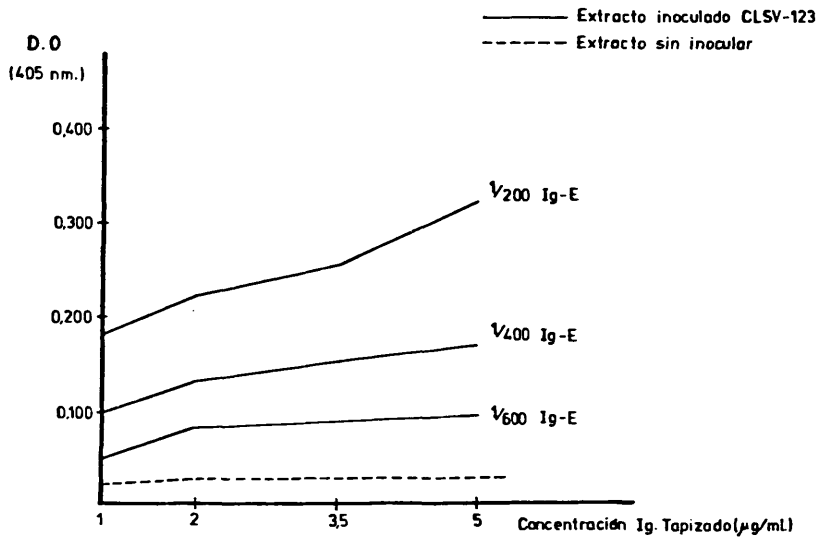


Fig. 5. — Variación de la densidad óptica (405 nm) en función de la concentración del tapizado y de la dilución del conjugado inmunoglobulina-enzima para un extracto de planta inoculada con CLSV y un extracto de planta sin inocular.

en entrenudos), permite la realización de diagnósticos incluso durante el invierno, de modo análogo al empleado por MINK (1980) para la detección de «cherry rugose mosaic virus» antes de la floración.

### Comparación de la técnica ELISA con los métodos tradicionales de diagnóstico

En la figura 6A se muestran los resultados obtenidos en la comparación entre la técnica ELISA y el indicador Shirofugen para la detección de virus ILAR. La comparación ha sido repetida durante 2 años con el mismo material. De un total de 106 plantas analizadas por ambas técnicas en 1980 se obtuvieron 103 diagnósticos coincidentes y 3 divergentes, de los cuales 2 correspondían a reacciones positivas por ELISA y negativas sobre Shirofugen y el tercero a una planta que dio reacción negativa en ELISA y positiva sobre Shirofugen. En 1981 la coincidencia de resultados fue total, al reaccionar positivamente en ambas técnicas las 3 plantas divergentes en 1980. Las 2 plantas que en 1980 dieron reacción positiva en ELISA y negativa sobre Shirofugen eran melocotoneros infectados con la cepa «chlorotic ring virus» de PDV. En 1981 estas plantas produjeron sobre Shirofugen una reacción de hipersensibilidad más leve y tardía que el resto de cepas ILAR inoculadas, volviendo a reaccionar positivamente en la técnica ELISA.

En la figura 6B figuran los resultados de la comparación entre la técnica ELISA y la inoculación en melocotonero de semilla GF-305 para la detección de CLSV. De un total de 124 plantas, se obtuvieron 108 diagnósticos coincidentes y 16 divergentes (8 albaricoqueros Búlida infectados por «Viruela» y 8 híbridos almendro × melocotonero). En todos ellos se obtuvo reacción positiva por ELISA y negativa sobre GF-305. Estos resultados parecen

confirmar los obtenidos por PRACROS *et al.* (1981), según los cuales el número total de muestras con reacción positiva es superior mediante la utilización de la técnica ELISA que por el empleo del indicador GF-305.

### Antisueros polivalentes artificiales

En la figura 7 se representan, en forma de histograma, los valores de densidad óptica obtenidos con las diferentes combinaciones antígeno-anticuerpo utilizadas para comprobar la eficacia de un antisuero polivalente artificial anti-PRSV y anti-PDV.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, en las condiciones del ensayo, el poder de detección del antisuero polivalente frente a cada uno de los virus es análogo al de los antisueros individuales. Ello parece indicar que, a las concentraciones ensayadas, no hay interacción entre las inmunoglobulinas de cada virus en el proceso de tapizado.

Los valores de densidad óptica obtenidos con antisueros individuales cuando se realiza el ensayo frente a la mezcla de virus no difieren significativamente de los obtenidos frente a cada uno de los virus por separado. Cuando se ensaya el antisuero polivalente frente a la mezcla de virus, los valores de densidad óptica obtenidos son significativamente superiores a los del resto de condiciones ensayadas.

La ausencia de reacción que se observa entre cada virus y el antisuero heterólogo confirma la ausencia de parentesco serológico entre ambos virus, ya que esta reacción heteróloga no difiere significativamente de la reacción obtenida con extractos sanos.

En la figura 8 se representan, en forma de histograma, los valores de densidad óptica obtenidos con las diferentes combinaciones antígeno-anticuerpo utilizadas para comprobar la eficacia de un suero

Técnica ELISA

6A

		+		-	
		1980	1981	1980	1981
<u>Indicador SHIROFUGEN</u>	+	21	24	1	0
	-	2	0	82	82

TOTAL : 106 PLANTAS

Técnica ELISA

6B

		+	-
<u>Indicador GF - 305</u>	+	14	0
	-	16	94

TOTAL : 124 PLANTAS

Fig. 6. — Resultados de la comparación entre la técnica ELISA y los métodos tradicionales de diagnósticos. Número de plantas con reacción positiva o negativa en cada técnica.

polivalente artificial anti-PRSV, anti-PDV y anti-CLSV.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, en las condiciones descritas, el antisuero polivalente es capaz de detectar cualquiera de los 3 virus o mezcla de ellos, siendo de destacar que cuando se encuentran los 3 virus en el mismo extracto, los valores de densidad óptica son netamente superiores a los del resto de condiciones ensayadas.

Cuando se utilizan los antisueros simples, no interfiere en el diagnóstico la presencia de virus heterólogos respecto al antisuero empleado. Se obtienen similares resultados cuando al virus homólogo del antisuero le acompañan uno o dos heterólogos en el extracto.

A medida que aumentan los componentes del suero polivalente nos alejamos de las condiciones ideales de realización del ensayo para cada virus concreto y ello se traduce en una disminución de la densidad óptica con respecto a la obtenida con el antisuero simple, por lo cual, la utilización de antisueros polivalentes de 3 o más componentes vendrá limitada por la especificidad de cada uno de los antisueros individuales.

## CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en el presente trabajo muestran el interés de la técnica ELISA como método de detección de virus ILAR y CLSV en frutales de hueso.

En comparación con los métodos tradicionales de diagnóstico, la técnica ELISA aporta mayor rapidez (diagnósticos en 24 horas) y la posibilidad de utilización a gran escala de una forma semi-automática y objetiva. Es tan fiable como la inoculación sobre Shirofugen para la detección de virus ILAR, permitiendo además discernir

entre PRSV y PDV, y aparece con mayor capacidad de detección de CLSV que la inoculación sobre melocotonero de semilla GF-305, siendo una técnica mucho más económica.

La posibilidad de detectar virus en ramos, incluso en el invierno, permite la realización de diagnósticos en cualquier época del año. Además, la técnica ELISA-DAS permite la detección en un solo ensayo de virus ILAR y CLSV mediante antisueros polivalentes artificiales, siempre que se disponga de antisueros altamente específicos. No obstante, parece más recomendable realizar la detección de los dos virus ILAR en un solo ensayo y, a parte, la del CLSV, debido a las especiales características de este último virus.

Por todo lo expuesto, consideramos que la técnica ELISA es especialmente apropiada como un primer análisis para los ensayos de rutina necesarios en los programas de selección sanitaria, controles de la producción viverística y de materiales importados, prospecciones para la localización de focos y su erradicación, estudios epidemiológicos, etc., es decir, todos aquellos trabajos que exigen la realización de un gran número de ensayos de diagnóstico de virus en un corto plazo.

La aplicación de la técnica ELISA no sustituirá totalmente el empleo de los métodos tradicionales (indicadores leñosos) para la producción de plantas de base libres de virus, ya que en ese caso es prudente realizar el máximo de pruebas y no hay antisueros disponibles para todos los virus, pero sí reducirá en gran medida el número de ensayos a realizar por dichos métodos tradicionales, que son demasiado lentos y costosos.

La aplicación de la técnica ELISA-DAS es sencilla y no requiere instalaciones costosas ni personal altamente especializado, por lo que se convierte en una técnica capaz de ser usada incluso en fronteras.

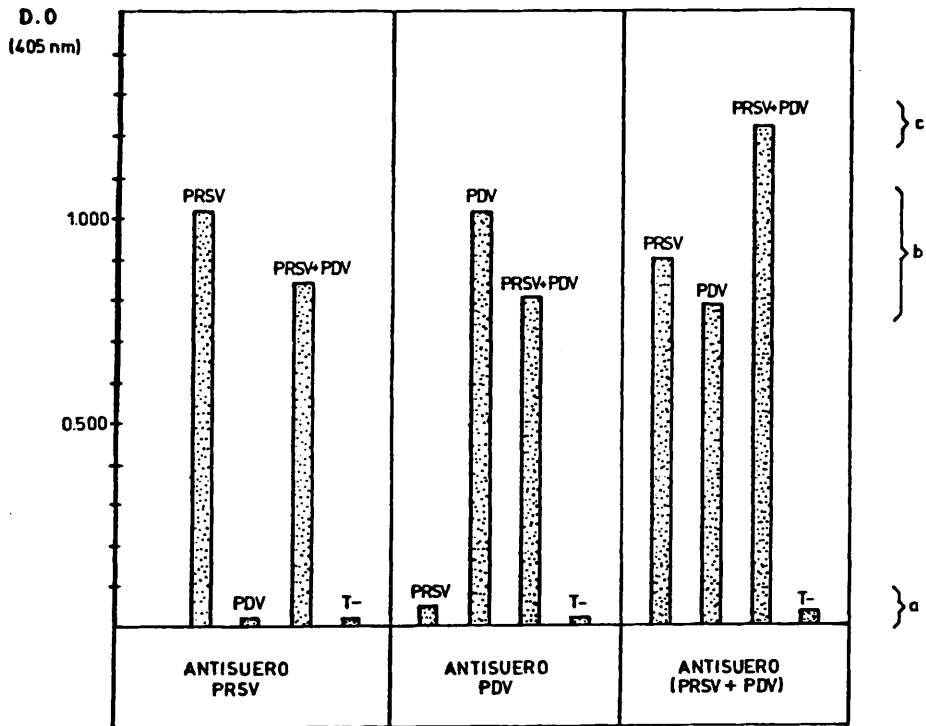


Fig. 7.—Valores de densidad óptica (405 nm) obtenidos con antiseros de PRSV, PDV y polivalente artificial anti-PRSV y anti-PDV para extractos de plantas inoculadas con cada virus y mezcla de ellos y para extractos de plantas sin inocular (T—). Sin diferencias significativas dentro de cada intervalo a, b y c.

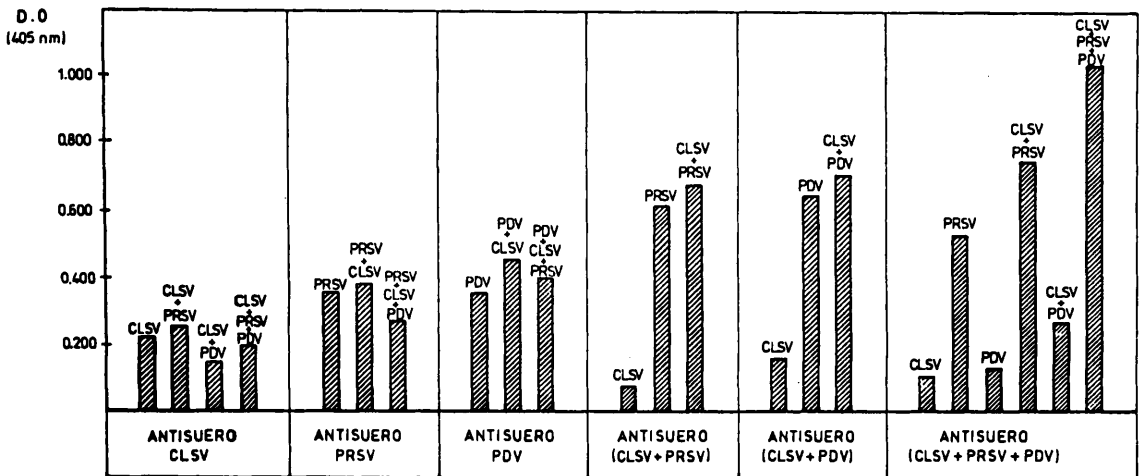


Fig. 8.—Valores de densidad óptica (405 nm) obtenidos con antiseros simples (CLSV, PRSV y PDV) y polivalentes artificiales (CLSV y PRSV; CLSV y PDV; CLSV, PRSV y PDV) para extractos de plantas inoculadas con cada virus y mezcla de ellos y para extractos de plantas sin inocular.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a Rafael GELLA FAÑANAS, del CRIDA-03 (Zaragoza) del INIA, por la realización de una parte de los ensayos de diagnóstico sobre indicadores leñosos que se

citan en este trabajo, a Rafael y Mariano CAMBRA RUIZ DE VELASCO, de la Estación Experimental de Aula-Dei (Zaragoza) del CSIC, por haber suministrado material vegetal para realizar este estudio, y a Magdalena VILCHEZ HIDALGO por el mecanografiado del trabajo.

## ABSTRACT

CAMBRA, M.; LLÁCER, G.; PÉREZ DE SAN ROMÁN, C.; MORENO, P y DURBA, V., 1983: Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for virus detection on stone fruit trees in Spain. *Bol. Serv. Plagas*, 9: 45-59.

The development of Regulations by the Ministry of Agriculture in Spain for certification of fruit trees will make it necessary to carry out a considerable number of tests for virus diagnosis as rapidly as possible. We are now working at our Station to make up the technique of shoot-tip grafting *in vitro* as a method to obtain virus-free stone fruit plants, which also requires a rapid and reliable detection technique for very early application. In both instances the ELISA method appeared as the most suitable for our needs.

We are describing here the best conditions to apply the ELISA-DAS method to diagnose prunus ring spot virus, prune dwarf virus and chlorotic leaf spot virus in stone fruit trees in Spain: proper dosages of coating and conjugate, extracting buffers, plant material and seasons for sample collection. We have studied which virus strains can be detected and made comparisons with the conventional woody indicators methods.

Advantages of the technique are discussed, and the possibility of detecting in a single test any one of the three viruses, or a combination of them, by using artificial polyvalent antiserum prepared from individual antisera.

## REFERENCIAS

- BARBARA, D. J., CLARK, M. F., THRESH, J. M., CASPER, R., 1978: Rapid detection and serotyping of prunus necrotic ring spot virus in perennial crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. appl. Biol.*, 90, 395-399.
- CAMBRA, M., LLÁCER, G., GELLA, R., 1981: Prospección del virus de la Sharka en España mediante la técnica inmunoenzimática ELISA. *An. INIA. Ser. Agric.*, 16, 161-173.
- CAMBRA, M., MORENO, P., NAVARRO, L., 1979: Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-sandwich. *An. INIA. Ser. Prot. Veg.* 12, 115-125.
- CLARK, M. F., ADAMS, A. N., 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- CLARK, M. F., ADAMS, A. N., THRESH, J. M., CASPER, R., 1976: The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Horticulture*, 67, 51-57.
- DETIENNE, G., DELBOS, R., DUNEZ, J., 1980. Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of an apple chlorotic leaf spot virus. *Acta Phytopathol. Acad. Scient. Hung.*, 15, 39-45.
- DUNEZ, J., 1977: Application des techniques immunoenzymatiques à la détection de certains virus pathogènes des végétaux. La méthode ELISA. *Ann. Phytopathol.*, 9, (2), 219-221.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P., 1971: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.

- FLEGG, C. L., CLARK, M. F., 1979: The detection of apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. appl. Biol.*, 91, 61-65.
- LLÁCER, G., 1978: Virosis y micoplasmosis de los árboles frutales. *Monografías INIA*, 23, 253 pp.
- MINK, G. I., 1980: Identification of rugose mosaic-diseased cherry trees by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 64 (7), 691-694.
- NAVARRO, L., ARREGUI, J. M., JUÁREZ, J., CAMBRA, M., LLÁCER, G., 1980: Microinjerto de ápices caulinares de melocotonero *in vitro*. Resultados preliminares. V Reunión Grupo Fitopatología S.E.M., Zaragoza (abstr.).
- NAVARRO, L., LLÁCER, G., CAMBRA, M., ARREGUI, J. M., JUÁREZ, J., 1982: Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants. XII th Intern. Symp. Fruit Tree Virus Diseases. Vancouver (Canadá), junio 1982. *Acta Horticulturae*, 130, 185-192.
- OEPP, 1974: Progrès réalisés dans la connaissance de la sharka. Document de synthèse. *Bulletin OEPP*, 4 (1), 125 pp.
- PRACROS, P., DETIENNE, G., SARRAQUIGNE, C., DUNEZ, J., 1981: Intérêts comparés de l'indexage biologique sur semis de pêcher GF 305 et du diagnostic immunoenzymatique ELISA pour la detection de virus de espèces fruitières. *Agronomie*, 1 (7): 535-540.
- SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M., CAMBRA, M., 1981: Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal. *Monografías INIA*, 29, 57 pp.
- VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D. E., CLARK, M. F., ADAMS, A. N., 1976: The detection of plant viruses by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *J. gen. Virol.* 33, 165-167.