

APLICACION DE LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF) EN LA DETECCION DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO (TMV) EN SEMILLAS DE TOMATE

Ruiz Guardado, M.¹; A. Pérez Barrero²; C. Gradaille Martín²

¹ Laboratorio Provincial Sanidad Vegetal, Cienfuegos Carretera Palmira Km 3 1/2, Cienfuegos. CP. 5100, Cuba.

² Banco de Sangre Provincial, Ave. 5 de Septiembre, Cienfuegos. CP. 55100, Cuba.

RESUMEN. Las semillas de tomate constituyen la vía fundamental de transmisión del virus del mosaico del tabaco (TMV) por lo que es una necesidad el empleo de métodos de diagnóstico que garanticen de forma eficiente el estado fitosanitario del material a emplear. Con este objetivo se probaron las técnicas de inoculación en plantas indicadoras y la contrainmunolectroforesis detectándose por ambos métodos el virus en 8 de las 120 muestras coincidiendo los resultados en un 100%. Con la técnica propuesta se ofrece mejor servicio de diagnóstico por su rapidez y posibilidad de procesar mayor número de muestras. El costo de análisis es menor con el uso de la técnica propuesta.

PALABRAS CLAVES: *Lycopersicon esculentum*, virus, diagnóstico.

INTRODUCCION

El virus del mosaico del tabaco se encuentra ampliamente extendido en cualquier región del mundo donde se cultive el tomate. La fuente de infección más importante es la semilla (Cowley, 1957; Gilmer y Wilks, 1967) ya que las plantas desarrolladas de aquellas infestadas contribuyen en la diseminación del virus a plantas jóvenes, originando mayores pérdidas en el cultivo, de ahí la necesidad de emplear un método sensible y rápido que garantice la certificación de material sano destinado a la producción de semillas y que a su vez pueda ser asequible en los laboratorios de diagnóstico. Para lograr este objetivo se ensayó la técnica de la contrainmunolectroforesis (CIEF) desarrollando la metodología establecida para la detección de la hepatitis B.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se desarrolló en los laboratorios de Virología del Banco de Sangre Provincial y el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal en Cienfuegos, procesándose 120 muestras procedentes de áreas de producción comparando las técnicas de inoculación en plantas indicadoras y la CIEF que es una modificación de la técnica de agar doble difusión que incrementa su sensibilidad al emplear la corriente eléctrica y acelera la reacción entre los componentes del sistema (antígeno-anticuerpo) produciéndose la inmunoprecipitación en un tiempo de 45 minutos. En los análisis se utilizó una cámara CIEF Girón de producción nacional.

Medio Cultivo

Agarosa	1 g
Buffer Veronal	140 ml
Agua destilada	60 ml

Preparación

Buffer Veronal pH 8.5	
Ácido barbitúrico	7.16 g
Sodio dietil barbitúrico	41.60 g
Azida sódica	4.00 g
Agua destilada	4000 ml

Los reactivos, disueltos en 2 000 ml de agua tibia añadiendo el resto después. El pH se midió una vez terminada la preparación del buffer.

El medio después de añadido al porcentaje o lámina de vidrio ya endurecido se mantuvo 1 hora a 4°C para la manifestación de las propiedades electroforéticas del gel (Somnawirth, 1983). Pasada esta incubación los pocillos se perforaron añadiendo el antígeno (Ag) y el anticuerpo (Ac) y se desarrolló la corrida.

Una vez concluida la misma, se realizó la lectura resultando positivas las muestras que reaccionaron con el antisuero, originando un precipitado blanco visible a simple vista. En cada lámina se utilizó dos réplicas por muestra y dos testigos: la savia de la planta enferma y el control positivo de la hepatitis B.

Este método tienen una sensibilidad de $0.03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. La extracción de la savia se hizo en una relación 1:10 gramos de semilla: agua destilada o tampón fosfato pH 7.2. Para cada lámina se confeccionó un protocolo de trabajo antes de realizar el montaje de las muestras. Los antisueros del virus del mosaico del tabaco (TMV) utilizados en la realización del trabajo proceden del Instituto de Patología de Semillas de Copenhagen, Dinamarca y el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba.

En las inoculaciones se utilizó *Nicotiana glutinosa* L. como planta indicadora (2 testigos por muestra)

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos al comparar las dos técnicas, muestra la posibilidad de aplicar CIEF en la detección del TMV en semillas de tomate, ya que por ambas se diagnosticó el virus en 8 de la 120 muestras analizadas coincidiendo en un 100% los resultados. No hubo diferencias en cuanto a la reacción entre réplicas,

Esta técnica se aplicó en la detección de la hepatitis B en los laboratorios del MINSAP por su sensibilidad y reproductibilidad, también en el diagnóstico de la bacteria agente causal de la meningitis meningocócica (Rojas *et al.*, 1987). En la agricultura ha sido de gran utilidad para detectar hongos patógenos como *Diplodia natalensis* (Fernández *et al.*, 1985). Las plantas de *N. glutinosa* inoculadas, mostraron las lesiones locales necróticas al tercer día, resultando más lento el procesamiento de la muestra. Sin embargo, con la aplicación de la CIEF se logró mayor rapidez en la

información del diagnóstico (1 día) y se pudo procesar mayor número de muestras.

En el trabajo se comprobó que no es necesaria la trituración de la muestra evitando de esa forma reacciones inespecíficas.

CONCLUSIONES

La técnica de la contrainmunolectroforesis es aplicable para el diagnóstico del TMV en semillas de tomate.

Permite procesar mayor número de muestras en menor tiempo de trabajo.

Ofrece el resultado de los análisis en menor tiempo que la técnica convencional.

LITERATURA CITADA

- COWLEY, N.C. 1957. Studies on the seed transmission of plant virus diseases. Australian Journal Biological Science 10:449-464.
- FERNÁNDEZ, A.; I. PELÁEZ; C. GARCÍA C.; R. GARCÍA, 1985. Serología de dos especies de hongos del género *Diplodia*. Ciencias de la Agricultura 24:3-10
- GILMER R.M.; J.M. WILKS. 1967. Seed transmission of tobacco mosaic virus in apple and pear. Phytopathology 57:214-217.
- ROJAS, N.; O.COTO; V. POZOS. 1987. Diagnóstico de meningitis meningocócica por contrainmunolectroforesis. Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología Clínica II. 26-32.
- SOMNOWRTH, J. 1983 Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico. Tomo III. Capítulo 60: 1126.