
METODO ANALITICO PARA DIAGNOSTICO FITOSANITARIO

Plum Pox Virus

Contenido

[Nombres Comunes](#)

[Hospederos principales y secundarios](#)

[Introducción](#)

[Caracterización y detección](#)

[Inspección directa](#)

[Técnicas Analíticas](#)

[Evaluación de la técnica de detección y diagnóstico](#)

[Información complementaria](#)

[Referencias](#)

[Anexos](#)

Nombres Comunes:

Enfermedad de "Sharka".

Hospederos principales y secundarios:

Prunus spp. Frutales de Carozo (hueso).

El virus afecta a un gran número de especies y variedades del género *Prunus*; ocasionalmente puede infectar al almendro.

Introducción:

Plum Pox Virus (PPV), enfermedad de "Sharka", es el virus de mayor importancia económica en Europa para los frutales de carozo. Numerosas plantas anuales pueden infectarse artificialmente y podrían actuar como reservorio del inóculo en el campo, pero nunca se ha demostrado una transmisión natural entre hospederos herbáceos y *Prunus* (4). Entre los huéspedes leñosos la fuente natural más importante de infección es *Prunus spinosa* la cual generalmente no muestra síntomas (3).

El virus es transmitido por varias especies de áfidos en forma no persistente y transmisible por injerto y por inoculaciones de savia a huéspedes herbáceos (6, 8). De diez especies de pulgones señaladas como vectores de PPV, las más eficaces son *Myzus persicae*, *Brachycaudus helichryse*, *B. cardui* y *Phorodon humuli* (22). Su transmisión por polen o semilla no ha sido demostrada (19).

El virus tiene una errática distribución en las plantas y junto a su bajo título en épocas de calor hacen difícil su detección (4, 6), lo que obliga a procesar varias muestras, al menos cinco por cada árbol (22).

La propagación sistémica del virus dentro del árbol es lenta, árboles nuevos demoran 3 - 4 años para estar totalmente infectados y en árboles viejos el proceso puede demorar más tiempo. La infección parcial complica los procedimientos de diagnóstico. Puede ocurrir que tras la primera infección aparezcan síntomas severos, pero que desaparezcan al cabo de un tiempo. Los síntomas pueden variar también de año en año en el mismo árbol. La susceptibilidad también difiere

considerablemente de acuerdo a la variedad.

La diseminación en huertos depende de las condiciones climáticas en un año en particular, de los cultivares y de la raza involucrada, la que puede o no ser transmitidas por áfidos (9).

Caracterización y detección:

1-. Morfología:

Plum Pox Virus pertenece al grupo de los potyvirus, cuyas partículas filamentosas miden aproximadamente 750 nm de largo. Su genoma consiste en una única molécula de ARN de cadena simple de 3,5 x 10⁶ Da (4, 8, 22).

En los últimos años se ha determinado la secuencia de nucleótidos de varios aislados de PPV (13, 18).

En el citoplasma de hojas y frutos infectados se encuentran inclusiones proteicas del tipo "pinwheel" (molino de viento) (2, 8).

2-. Razas:

Hasta hace poco se habían descrito dos grupos de serotipos con limitada variabilidad intragrupo:

- El serotipo D (Dideron, Francia) que afecta principalmente a damascos y ciruelos. En damasco produce síntomas severos que impiden su consumo e incluso su destino industrial. En ciruelo europeo deforman gravemente el fruto y manifiestan una clara sintomatología foliar al igual que en ciruelo japonés, donde los frutos no suelen presentar síntomas. Los tipos D causan también síntomas de ligeros anillos y depresiones en los frutos de duraznero y nectarino, los que se infectan naturalmente en forma ocasional.
- Los tipos M (Marcus, Grecia), provocan síntomas en damasco y ciruelo como los que producen las cepas D, pero en duraznero y nectarino son más severos y se difunden rápidamente entre estos (5, 6).
- Últimamente se ha determinado un tercer grupo denominado "El Amar" en Egipto que podría corresponder a una variante de la raza M (21).

Inspección directa:

1-. Sintomatología:

Un método utilizable para el diagnóstico es la observación de síntomas, en hojas y en frutos, que debe ser realizada por personal especialmente capacitado para ello. Este método sencillo y rápido permite prospectar áreas extensas en poco tiempo. Los síntomas pueden aparecer sobre hojas y frutos, y esta sintomatología está ampliamente descrita para las distintas especies y variedades (2, 8). Diversos factores inciden en la gravedad o expresión de los síntomas; especies y variedad del árbol frutal, aislado o cepa del virus, condiciones ambientales, de suelo, etc. (6).

El virus de la sharka produce síntomas en hojas y frutos de damasco y ciruelos y en frutos solamente en duraznero y nectarino. En las hojas se observan manchas, anillos o bandas cloróticas de diferentes tamaños forma y distribución. En ciruelo estos síntomas pueden necrosarse y formar un cribado especial (perforaciones). En los frutos de ciruelo de variedades sensibles, los síntomas aparecen antes de la madurez y consisten en manchas, depresiones o deformaciones en la superficie. La carne subyacente toma un aspecto suberoso y exuda goma.

En damasco los síntomas son similares, produciéndose además anillos en el hueso. En duraznero los síntomas consisten en manchas y anillos en los frutos. En muchas variedades se produce la caída de los frutos afectados antes de la madurez comercial (16).

Técnicas Analíticas:

1- Transmisión a huéspedes herbáceos:

Comúnmente usados como indicadores herbáceos han sido *Chenopodium foetidum* y *Nicotiana clevelandii* (2), pero el rango de huéspedes es amplio incluyendo malezas y plantas de jardín. En la transmisión mecánica el virus puede inducir en algunos casos necrosis, amarillez o síntomas intermedios. El tejido vegetal infectado con síntomas es macerado en fosfato buffer 0,5 M, pH 7,2- 7,4, más carbón activado 5 mg/ml y DIECA 0,2% (5). La inoculación en *Chenopodium foetidum* produce lesiones locales después de 6 a 8 días en las hojas inoculadas. *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana benthamiana* y *Pisum sativum* se utilizan para multiplicar el PPV y luego purificarlo (8,16, 17).

2- Transmisión a indicadores leñosos:

El diagnóstico y detección rutinaria del Plum Pox Virus se ha efectuado en forma tradicional injertando yemas infectadas sobre indicadores leñosos (*P. persica* y *P. tomentosa*) temprano en la primavera, apareciendo los síntomas 6 a 8 semanas después del injerto. Los síntomas en durazneros francos consisten en clareo de venas y manchas a lo largo de éstas, rizado de las hojas (2, 19, 22). *P. persica* G.F. 305 o Elberta injertado y mantenido en invernadero a 20° C, mostró síntomas en 12 semanas; *P. tomentosa* I.R. 473/1 o I.R. 474/1, injertado y mantenido en invernadero a 22° C mostró síntomas en 12 semanas (19).

Para realizar las pruebas de infectividad; transmisión por injerto a indicadores leñosos, transmisión mecánica a plantas herbáceas o experimental mediante pulgones, se deben disponer de invernaderos climatizados y protegidos con mallas antiáfidos.

3- Métodos E.L.I.S.A. (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay):

Las técnicas serológicas de E.L.I.S.A. (DAS o DASI, convencionales o biotina - streptoavidina) son actualmente las más usadas por sus ventajas. Pueden detectar bajas concentraciones de PPV. En forma comercial se dispone de antisueros; anticuerpos policlonales (Agdia, Sanofi) y de anticuerpos monoclonales específicos (Durviz, Ingenasa) que son comercializados en estuches o kits de diagnóstico.

Existen anticuerpos monoclonales que solos o en mezclas reconocen todas las cepas del virus y por su alta especificidad y sensibilidad, son más aconsejables para el diagnóstico de rutina. También hay anticuerpos monoclonales muy selectivos y otros que solo reconocen aislados del tipo D, pudiendo detectar selectivamente los aislados del tipo M para fines de erradicación.

Los protocolos del E.L.I.S.A. están disponibles y tienen algunas diferencias de acuerdo a las casas comerciales que producen los estuches.

Procedimiento de muestreo para la técnica E.L.I.S.A.:

La distribución errática del PPV en las plantas y su bajo título en las épocas de calor dificultan la detección mediante E.L.I.S.A. Las muestras deben ser tomadas durante la primavera cuando el crecimiento del brote nuevo es casi completo hasta la aparición de los primeros calores a principios del verano (16, 20, 22). Normalmente en este estado la concentración del virus es más alta. Hojas, brotes nuevos, frutos, flores, raíces y corteza constituyen material para análisis (1, 2).

Por cada árbol se colectan cuatro o cinco brotes de 10 - 15 cm de longitud, tomando un brote de cada punto cardinal o de una posición equidistante dentro de la copa del árbol. Alternativamente se colectan hojas seleccionadas al azar en la parte central de la copa. Las hojas o brotes de cada árbol se unen constituyendo una sola muestra (20, 22), conservar a 4° C hasta su uso (16).

En la práctica en vivero, un brote de cada tres o cuatro plantas distintas forman una sola muestra. Si en el laboratorio se cuenta con maceradores es posible utilizar la parte leñosa de los brotes tiernos, sin las hojas. En el caso de utilizar morteros o bolsas de plástico es más fácil el uso de las hojas de estos brotes.

ELISA - DAS (5):

- Sensibilización de la placa: diluir el anticuerpo monoclonal (1ug/ml.) con buffer carbonato pH 9,6. Utilizar 200ul. de esta solución en cada pocillo. Incubar 4 horas a 37°C. o toda la noche a 4°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Adición de la muestra: añadir 200 ul. de una solución del extracto de plantas macerado en buffer de extracción (p/v = 1/10) a cada pocillo. Incubar 16 horas a 4°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Adición de anticuerpos monoclonales biotinilados (primer conjugado): diluir anticuerpos monoclonales (0.1 ug./ml.) con PBS y agregar 200 ul. a cada pocillo. Incubar 3 horas a 37°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Adición de estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina (segundo conjugado): diluir la estreptoavidina conjugada con fosfatasa alcalina 1/1000 en PBS y agregar 200 ul. a cada pocillo. Incubar 30 minutos a 25°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Adición del sustrato: añadir 200 ul. de PNP en buffer sustrato, a cada pocillo.
- Lectura a 405 nm. o evaluación visual: lectura a los 15, 30 y 60 minutos.
- Preparación de buffer en anexo.

ELISA - DASII (5, 7):

- Sensibilización de placa: diluir las inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-PPV (1-2 ug./ml.) en buffer carbonato pH 9,6. Agregar 200 ul. a cada pocillo. Incubar 4 horas a 37°C. o 16 horas a 4°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Adición de la muestra: agregar 200 ul. a cada pocillo de la muestra vegetal macerada en buffer de extracción (p/v = 1/10 ó 1/20); PBS pH 7,2- 7,4, más 0,2% DIECA más 2% PVP-10. Incubar 16 horas a 4°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Adición del anticuerpo monoclonal específico: diluir los anticuerpos monoclonales (0,1 ug/ml.) en PBS más 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA). Agregar 200 ul. a cada pocillo. Incubar 2 horas a 37°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Adición de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina: diluir las inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina 1/1000 en PBS más 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA). Agregar 200 ul. a cada pocillo. Incubar 2 horas a 37°C.
- Lavado: lavar los pocillos tres veces con PBS-T.
- Revelado y lectura de resultados: preparar una solución de sustrato de fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato) de 1 mg./ml. en buffer sustrato. Agregar 200 ul. a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y realizar lecturas (405 nm.) a los 15, 30 y 60 minutos.
- - Preparación de buffer en anexo.

4-. Sondas complementarias de ADN c(DNA):

Hibridación molecular usando ADN complementario c(DNA) es un método altamente específico y sensible para identificar, caracterizar y comparar viroides y virus. Como las sondas c(DNA) no están limitadas a la información genética de la cubierta de proteínas son especialmente útiles para la diferenciación de razas y también para partículas de virus que han perdido parte o la totalidad de la cubierta de proteína.

También son útiles para evitar reacciones no específicas que ocurren en las pruebas serológicas. En el caso de las sondas c(DNA) de PPV hay una cierta especificidad para la cepa respectiva de PPV (ya sea D o M) correlacionada con la especificidad serológica (24).

5-. Hibridación molecular:

Preparación de la muestra (25, 26):

- Macerar el tejido vegetal en buffer citrato 50 mM, pH 8,3, (p/v=1/4), conteniendo dietilditiocarbamato (DIECA) 20mM y 2% de polivinilpirrolidona (PVP).
- Centrifugar 10 min. en microcentrífuga Eppendorf.
- Diluir el sobrenadante 10 veces en SSC 12x, formaldehído 6% (SSC es NaCl 150 mM, citrato trisodio 15mM, pH 7).
- Colocar 10 ul. en una membrana de nitrocelulosa saturada con SSC 20x.
- Secar las membranas al aire y colocarlas en un horno a 80°C. por 2 horas.

Condiciones de hibridación (24, 25):

- Prehibridación, realizada en bolsas de polietileno a 50°C. durante 3 horas en formamida al 50%, fosfato buffer 50mM, pH 6,5, SSC 5x (SSC 1x = NaCl 150mM, citrato de sodio 15 mM pH 7,0), sodiododecil sulfato (SDS) 0,1%, etilendiamina tetraacetato (EDTA) 1mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0,05%, ficoll 0,05%, polivinilpirrolidona (PVP) 0,05% y 200 ug./ml. de ADN desnaturalizado de esperma de salmón (1ml. de buffer por 10 cm² de membrana).
- Hibridación; realizada a 50°C. por 15 min. con solución fresca de hibridación luego de agregarle la sonda ARN desnaturalizada (1x10⁶cpm/ml. de buffer de hibridación).
- Las membranas se lavan 4 veces, por 20 min. a 65°C. en SSC 0,1x, SDS 0,1%.
- Autorradiografía de las membranas secadas a 80°C. durante 48 horas usando película Kodak-XAR y pantallas intensificadoras.
- Las sondas ARN marcadas con P-32 correspondientes a proteínas estructurales y no estructurales de PPV-D fueron sintetizadas usando el Kit Riboprobe Gemini System (Promega).(25, 26).

6-. ISEM (Microscopía Electrónica Inmunoespecífica):

Un método basado en el mismo principio de la técnica E.L.I.S.A., de inmovilización de concentración del antígeno se usa en microscopía electrónica, ISEM.

- La rejilla porta objetos se sensibiliza en este caso con los anticuerpos del PPV, los cuales quedan adsorbidos a ésta.
- Solamente las partículas del virus correspondiente (relacionadas serológicamente) van a ser capturadas y concentradas en la rejilla. Esto facilitará la observación cuando la concentración del virus es baja.
- Para el caso de PPV, las rejillas se mantienen "flotando" por 5 minutos en gotas de antisero diluido 1:1000. Luego de un lavado se coloca nuevamente "flotando" durante 15 minutos en savia de frutos enfermos macerados en fosfato "buffer" 0.1 M a pH 7.0, conteniendo 2% de polivinilpirrolidona. La rejilla se lava nuevamente y se tiñe con acetato de uranilo al 2% (15).
- Variaciones en este método al igual que en el E.L.I.S.A. pueden realizarse para lograr una mayor concentración de partículas "atrapadas" y así una mejor observación.
- Esta técnica permite también establecer relaciones serológicas entre las razas o entre virus (6).

7-. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

PCR consiste en la amplificación "in vitro" de un segmento de ADN, de manera que cantidades imperceptibles de dicho segmento son amplificadas en cantidades fácilmente detectables.

Para realizar una PCR previamente se deben extraer los ácidos nucleicos de la muestra, y si el virus es ARN como en el caso del PPV, es necesario sintetizar un ADN complementario c(DNA) al ARN extraído de la muestra, por medio del proceso de la transcripción reversa. Los protocolos para realizarlos usan en distintas proporciones según sea el caso, una transcriptasa reversa, un "buffer", deoxinucleósidos trifosfato (dNTP), un partidor o "primer" complementario a la secuencia del ARN (virus) y períodos de incubación a un tiempo y temperaturas determinadas.

Una vez obtenido el c(DNA) se realiza la reacción de la polimerasa en cadena utilizando una ADN polimerasa, un "buffer" adecuado, dNTP, un par de partidores complementarios a cada uno de las respectivas cadenas de ADN y el c(DNA) obtenido de las transcripción reversa. Esto es incubado en un termociclador que efectuará los ciclos que sean programados. Estos ciclos constan de una denaturación del ADN, hibridación de las hebras de

ADN con los partidores o "primers" y finalmente una extensión.

Los productos de la reacción son visualizados mediante una electroforesis en agarosa o poliacrilamida para una mayor sensibilidad, donde se observará presencia o ausencia de una banda correspondiente al tamaño del segmento de ácido nucleico que se quiere detectar (11).

8- Inmuncaptura - PCR (12, 14) (todos los reactivos deben ser manejados en hielo):

Tapizado de tubos con anticuerpos:

- Agregar a cada tubo 100 ul. de una solución en tampón carbonato de anticuerpos frente al virus (1-2 ug/ml.).
- Incubar 3 a 4 horas a 37 C. o durante toda la noche a 4 C.
- Decantar
- Lavar 2 veces con 150 ul. de tampón de lavado (PBS-T).
- Decantar bien

Preparación del extracto vegetal:

- Macerar las muestras de plantas (hojas, corteza, etc.) en un tampón de extracción similar al usado para la detección de virus por el método ELISA (PBS más 2% PVP más 0,2% DIECA).
- Dispensar en tubos Eppendorf y centrifugar unos min.

Inmuncaptura:

- Agregar 100 ul. del sobrenadante a los tubos previamente tapizados con anticuerpos
- Incubar 2 a 4 horas a 37 C. o durante toda la noche a 4 C.
- Decantar.
- Lavar con tampón de lavado 2 veces.
- Decantar bien.

Amplificación:

- A cada tubo agregar 25 ul. de la mezcla de reactivos para la reacción PCR.
- Pasar por el Vortex o centrifugar algunos seg.
- Cubrir con 50 ul. de aceite mineral (si el termociclador lo requiere) y colocar al termociclador y efectuar los siguientes ciclos: 49 ciclos (45 min. a 42°C, (transcripción reversa); 02 min. a 92 C. (denaturación); 30 seg. a 92°C), 30 seg. a 62 C, 01 min. a 72 C.

Visualización:

Efectuar electroforesis el gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.

La región del genoma del PPV seleccionado para la amplificación es de 243 bp, que codifica el carboxilo terminal de la cubierta de proteína. El par de oligonucleótidos usados era descrito por Wetzel et. al.(1991): 5'ACCGAGACCACTACTACTCCC 3'("sense primer"), y 5'CAGACTACAGCCTCGCCAGA, 3'("antisense primer").(3).

Evaluación de la técnica de detección y diagnóstico:

- La utilización exclusiva de anticuerpos policlonales de PPV en la prueba ELISA no permite concluir que las reacciones positivas sean únicamente causadas por el PPV (1,6).

- ELISA con policlonales se limita a confirmar la presencia, pero no la ausencia de PPV (1,2).
- Los resultados son más confiables después que los síntomas foliares han aparecido.
- La prueba ELISA es un método muy eficaz, sensible y fiable para la detección de PPV (22). Al utilizar anticuerpos monoclonales es posible incluso diferenciar razas lo que la hace más recomendable para el diagnóstico de PPV en forma masiva (6).
- La microscopía electrónica es también una técnica rápida y sensible. La dificultad principal es la distribución irregular del virus dentro del árbol infectado lo que obliga a procesar varias muestras por cada árbol. (22). El alto costo del equipo y de la muestra individual impide usarla para pruebas de rutina o aplicarla a gran número de muestras. Esta técnica sola tampoco permite un diagnóstico fiable.
- El uso de sondas para hibridación molecular requiere equipo de laboratorio más especializado y considerable experiencia, sobre todo si se va a trabajar con radiactividad. Es ideal para el trabajo de investigación, pero puede implementarse para detección de rutina (10). La sensibilidad de esta técnica es superior a la de ELISA (24, 25).
- El uso de inmunocaptura/PCR , (IC/PCR), para detección de PPV demostró el aumento de la sensibilidad de esta técnica, cuando se comparó con hibridación molecular usando sondas cRNA marcadas con ³²P o ELISA (26, 27). IC/PCR detectó el virus en la mayoría de las muestras infectadas analizadas (90%). Las 5 mil veces más alta sensibilidad de IC/PCR cuando se comparó con ELISA, la cual es la técnica corrientemente usada, demuestra el gran potencial de IC/PCR para la detección de rutina de PPV. Al momento, la mayor limitación del uso rutinario de PCR o IC/PCR para "indexing" de rutina de PPV es probablemente el alto costo. Puede ser más cara que ELISA. Sin embargo en tiempo no son muy diferentes (27).
- Una buena correlación era obtenida entre ELISA, hibridación molecular e IC/PCR. Todas las muestras que eran positivas por ELISA(28/50) eran también positivas por hibridación molecular e IC/PCR. Hibridación molecular detectó el virus en siete muestras adicionales (35/50), confirmando su más alta sensibilidad para la detección de PPV. Usando IC/PCR, el virus se detectó en 45/50 de las muestras demostrando la más alta sensibilidad para la detección de PPV (27).
- IC/PCR detectó el virus en todas las muestras con síntomas (18/18) y en 84% (27/32) de las muestras sin síntomas. ELISA e Hibridación molecular detectaron el virus en 47% (15/32) y 62% (30/32), respectivamente de estas muestras. Esto demuestra la habilidad de IC/PCR para detectar bajas concentraciones de virus en muestras de campo (27).

Información complementaria:

1-. Especialista consultor

Mariano Cambra Alvarez.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Depto. de Protección Vegetal y Biotecnología. Apto. Oficial, 46113 Moncada. Valencia - España.

Referencias:

1. ADAMS, AN.N. 1978. The detection of Plum Pox Virus in Prunus species by enzyme - linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A) Ann. appl. Biol. 90: 215-221.
2. APHIS - PPQ 1978. Pests not known to occur in the United States or of limited distribution N° 88: Plum Pox Virus. U.S. Department of Agriculture 15 p.
3. BOUSALEM, M.,CANDRESSE, TH.,QUIOT-DOVINE, L. and J.B. QUIOT. 1994. Comparison of three methods for assessing Plum Pox Virus. Variability: Further evidence for the existence of two major groups of isolates. J. Phytopathology 142: 163-172.
4. CABI/EPPQ 1992. In "Quarantine Pest for Europe. Data sheets on quarantine pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization". C.A.B. International, 92-927.
5. CAMBRA, M. 1995. Virus de la sharka. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Comunicación personal.
6. CAMBRA, M. y LLACER, G. 1994. Asesoría sobre el virus de la sharka. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile.

Informe. Santiago Chile.

7. CAMBRA, M. et al. 1995. Detecction of Plum Pox Virus using monoclonal antibodies too estructural and non-estructural proteins. Bulletin OEPP. EPPO. BULL. 24: 569-577.
8. C.M.I.A.A.B. 1971. Descriptions of Plant Viruses N° 70 Plum Pox Virus. 1971: 1-15.
9. COS/PC 1991. Plum Pox Virus. Ficha cuarentenaria N° 15. Cosave - Plagas Cuarentenarias.
10. HANSEN, A.J., HAMILTON, R., MARTIN, R. and R. STACE - SMITH 1986. Improved methods for tree fruit virus detection. Acta Horticulturae N° 193: 229 - 231.
11. INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE 1994. Aplicaciones del método de PCR en el Diagnóstico Viral. Curso Teórico y Práctico. Santiago, Chile.
12. INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS. 1995. 46113 Moncada-Valencia. Valencia, España.
13. LAIN, S., RIECHMANN, J.L. and J.A. GARCIA. 1989. The complete nucleotide sequence of Plum Pox potyvirus RNA. Virus Research. 13: 157-172.
14. LANNEAU, M. and T. CANDRESSE. 1993. Simplified Immunocapture-PCR Protocol.
15. LOURO, D. and L. CORVO. 1986. Occurrence of sharka in Portugal. Acta Hortic. 193: 183-186.
16. LLACER, G. y M. CAMBRA. 1985. Conocimientos actuales sobre el virus de la sharka y su detección en España. Información Técnica Económica Agraria. 59: 3-15.
17. LLACER, G., CAMBRA, M., LAVINA, M. and ARAMBURA, J. 1986. Investigations on Plum Pox (Sharka) Virus in Spain. Acta Horticulturae N° 193: 155 - 158.
18. MAISS, E., et al. 1989. The complete nucleotide sequence of Plum Pox Virus RNA. J.GEN. Virology. 70: 513-524.
19. OEPP/EPPO 1983. Data sheet on quarantine organisms N° 96, Plum Pox Virus. Bulletin 13 (1).
20. OEPP/EPPO 1992. Quarentine Procedures N° 43, Plum Pox Potyvirus. Bulletin 22: 239 - 242.
21. OEPP/EPPO 1994. Conference on Plum Pox. Bordeaux (France) Bulletin 24(3): 585-594.
22. SMITH, I.M. DUNEZ, J., ET AL. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi-Prensa. Madrid-España. 671 p.
23. VARVERI, C., BRETOUT, C. and J. DUNEZ (1986). Synthesis and Characterization of a DNA Complementary to Plum Pox Virus RNA to be used as a specific detection probe. Acta Horticulturae 193: 173 - 181.
24. VARVERI, C., RAVELONANDRO, M. and J.DUNEZ. 1987. Construction and use of a cloned cDNA prove for the detection of Plum Pox Virus in Plants. Phytopathology. 77: 1221-1224.
25. VARVERI, C., CANDRESSE, T., CUGUSI, M., RAVELONANDRO, M. and J. DUNEZ. 1988. Use of a 32P.-Labeled transcribed RNA prove for dot hybridization detection of Plum Pox Virus. Phytopathology. 78: 1280-1283.
26. WETZEL, T., CANDRESSE, T., RAVELONANDRO, M. and J. DUNEZ. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted too Plum Pox Potyvirus detection. J. Virol. Methods. 33: 355-365.
27. WETZEL, T., CANDRESSE, T., MACQUAIRE, G., RAVELONANDRO, M. and J. DUNEZ. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction methods for Plum Pox Potyvirus detection. J. Virol. Methods. 39:

ANEXOS

Anexo 1:

1-. REACTIVOS ELISA - DAS y DASI:

Buffer carbonato pH 9,6 para 1000 ml.

Na ₂ CO ₃	1,59 g.
NaHCO	2,93 g.
NaN ₃ (optativo)	0,20 g.

Disolver en agua destilada hasta 1000 ml.

PBS pH 7,2-7,4 para 1000 ml.:

NaCl	8,00 g.
KH ₂ PO ₄	0,20 g.
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	2,90 g.
KCl	0,20 g.
NaN ₃ (optativo)	0,20 g.

Disolver en agua destilada hasta 1000 ml.

Buffer de extracción para 1000 ml.:

Dietilditiocarbomato sódico (DIECA)	2,00 g.
Polivinil pirrolidona (PVP - 10)	20,00 g.

Disolver en PBS (pH 7,2 - 7,4) hasta 1000 ml.

Solución de lavado (PBS-T) para 1000 ml.:

Tween 20	0,50 ml.
PBS	500 ml.
Agua destilada	500 ml.
NaN ₃ (optativo)	0,20 gr.

Buffer sustrato (pH 9,8) para 1000 ml.:

Dietanolamina	97 ml.
---------------	--------

Diluir en 800 ml. de agua destilada

NaN ₃ (optativo)	0,2 g.
-----------------------------	--------

Ajustar pH 9,8 con HCl concentrado.

Ajustar a 1000 ml. con agua destilada.

Anexo 2:

1-. Reactivos PCR:

Para 25 ul de reacción:

1,7% Triton X100	3,0 ul
10X buffer reacción	2,5 ul
25mM dNTP mezcla	0,25 ul
100 uM primers	0,25 ul c/u
AMV RTase	0,25 U
Taq Polymerasa	0,5 U
Agua destilada	hasta 25 ul

Buffer 10X PCR:

Tris - HCl, pH 8,8	100 mM
MgCl ₂	15 mM
KCl	500 mM
Triton X100	1%
