

DETECCION DE PROTEINAS ESTRUCTURALES DE VIRUS MEDIANTE INMUNOIMPRESION-ELISA Y SU USO EN DIAGNOSTICO

M. CAMBRA
E. CAMARASA
M. T. GORRIS
M. P. ROMAN
M. ASENSIO
E. PEREZ

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Moncada (Valencia)

J. SERRA

Servicio de Sanidad Vegetal. Generalitat Valenciana
Silla (Valencia)

M. A. CAMBRA

Centro de Sanidad Vegetal. Diputación General de Aragón
Montañana (Zaragoza)

RESUMEN

Se ha aplicado la técnica de la inmunopresión-ELISA en sus variantes directa e indirecta para la detección y localización de antígenos virales en cortes de tejidos. Los virus estudiados han sido: Apple chlorotic leaf spot (ACLSV), Prunus necrotic ring spot (PNRSV), Prune dwarf (PDV), Plum pox (PPV), Citrus tristeza (CTV), Tomato spotted wilt (TSWV) y Lettuce mosaic (LMV). El diagnóstico en material vegetal ha sido comparado, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales específicos, con la técnica convencional ELISA-DAS o DASI, en primavera y en invierno. Hubo una buena correspondencia entre los resultados obtenidos por ambos métodos. La inmunopresión es una técnica muy simple, sensible y puede ser utilizada de forma rutinaria para analizar muestras. Además, es rápida (3 h) y permite el revelado de membranas impresas almacenadas mucho tiempo y el uso de reactivos y anticuerpos reciclados que supone una reducción de costes.

PALABRAS CLAVE: Inmunopresión-ELISA. Reutilización. ACLSV-Apple chlorotic leaf spot virus. PNRSV-Prunus necrotic ring spot virus. PDV-Prune dwarf virus. CTV-Citrus tristeza virus. PPV-Plum pox virus. TSWV-Tomato spotted wilt virus. LMV-Lettuce mosaic virus.

INTRODUCCION

El uso de las técnicas ELISA en cualquiera de sus numerosas variantes (Koenig, Paul, 1982; Cambra *et al.*, 1991a), se ha impuesto para la caracterización y detección de virus fitopatógenos en material vegetal. Las causas fundamentales son el uso de anticuerpos conjugados con enzimas o biotina que confieren a los análisis serológicos alta sensibilidad, estabilidad, bajo coste y seguridad (Clark, Bar-Joseph, 1984; Sánchez-Vizcaíno, Cambra, 1987; Hampton *et al.*, 1990) y la

capacidad de ser utilizadas para analizar gran número de muestras en poco tiempo y limitado espacio. Además, el uso de anticuerpos monoclonales específicos (AMC) ha conferido a las técnicas ELISA especificidad y consecuentemente más sensibilidad (Garnsey, Cambra, 1991; Cambra *et al.*, 1991a). No obstante, la detección de virus en material vegetal necesita un equipo relativamente costoso y la realización de extractos, que constituye una etapa especialmente problemática y limitante de la capacidad de análisis, cuando se manejan especies leñosas.

Han sido descritas diferentes variantes de la técnica ELISA indirecta utilizando membranas porosas como soporte insoluble («Dot-ELISA», «immunoblot») (Hawkes *et al.*, 1982; Towbin *et al.*, 1984), para la detección de virus en material vegetal (Banttari, Goodwin, 1985; Hibi, Saito, 1985; Parent *et al.*, 1985; Powell, 1987; Smith, Banttari, 1987). Con ello, además de aumentar la sensibilidad, se deseaba reducir costes y/o simplificar el proceso de preparación de extractos, pero ninguna de estas técnicas ha prosperado en su aplicación rutinaria, probablemente debido a las dificultades de lectura y a la frecuente presencia de coloración inespecífica (Hampton *et al.*, 1990).

En 1990 Lin *et al.*, describieron un procedimiento de impresión de cortes de tejidos en membranas de nitrocelulosa y su posterior revelado inmunológico, que ofrece la posibilidad de detectar los antígenos localizados en la impronta del tejido vegetal y evita la realización de extractos. El método denominado inmunopresión-ELISA (IIP-ELISA) ha sido aplicado a algunos virus, fitoplasmas y bacterias fitopatógenas (Lin *et al.*, 1990; Hsu, Lawson, 1991; Cambra *et al.*, 1991b; Cambra *et al.*, 1992; Garnsey *et al.*, 1993) y presenta numerosas ventajas. Los objetivos del presente trabajo han sido evaluar dos modalidades de IIP-ELISA, compararlas con el diagnóstico mediante ELISA-DAS o DASI realizando extractos y determinar la época y el tejido o tejidos más apropiados para realizar un diagnóstico fiable. Para ello se han empleado virus que causan daños de importancia económica o que afectan a especies leñosas en las que la concentración de antígeno suele ser escasa. También se ha estudiado la posibilidad de reutilizar reactivos para reducir los costes de la inmunopresión.

MATERIAL Y METODOS

Virus

Se han utilizado los aislados del virus de la tristeza de los cítricos (CTV): T.388, T.300, T.302 y T.397 P multiplicados en naranjo dulce; los aislados del Apple chlorotic leaf spot (ACLSV): 121 y Búlida 8, mantenidos en melocotonero de semilla GF.305 y albaricoquero, respectivamente; los aislados de Prunus necrotic ring spot (PNRSV): Almond calico y Samantha 4 inoculados en GF.305 y rosal, respectivamente; los aislados del Prune dwarf (PDV): SCY y EDETA 2 multiplicados en GF.305; los aislados del Plum pox virus (PPV): Marcus 79, 3.5 y RB inoculados en GF.305, albaricoquero y ciruelo japonés, respectivamente. Todos ellos mantenidos en abrigos de cuarentena en la Colección de virus del IVIA en Moncada (Valencia). Además, se han utilizado aislados no caracterizados del Tomato spotted wilt virus (TSWV) en tomate y pimiento y del virus del mosaico de la lechuga (LMV) en lechuga, obtenidos en cultivos de Valencia y Zaragoza.

Material vegetal

Se han utilizado 750 naranjos dulces, mandarinos y pomelos procedentes de campos de cultivo con alta incidencia de CTV; 120 ciruelos japoneses de 32 variedades diferentes y 42 albaricoqueros de 12 variedades cultivados en zonas con riesgo de infección por PPV (los 42 albaricoqueros fueron utilizados además para el diagnóstico de ACLSV); 114 rosales de las variedades Samantha y Dallas procedentes de invernaderos en los que previamente se habían detectado plantas con PNRSV; 16 almendros cultivados en un campo con alta incidencia de PDV; ocho tomates y dieciocho pimientos con síntomas típicos de TSWV y 11 lechugas que presentaban síntomas de mosaico. De todas las plantas leñosas se dispuso de material vegetal libre de virus de la colección de variedades del IVIA, de tomate y pimiento se utilizaron plantas sin síntomas procedentes de cultivos en invernadero y de lechuga plantas de campo sin síntomas de mosaico, tomadas de cultivos en los que no se habían observado plantas enfermas.

Anticuerpos

Se han empleado los AMC: 3DF1 y 3CA5 (Vela *et al.*, 1986) específicos de CTV y los mismos marcados con fosfatasa alcalina comercializados por INGENASA (Madrid) y los 5B y 4DG5 específicos de PPV (Cabra *et al.*, 1994, López-Moya *et al.*, 1993) comercializados por REAL-DURVIZ (Valencia) e INGENASA, respectivamente.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos policlonales marcados con fosfatasa alcalina: Anti PNRSV del antisuero ATCC 22 purificado y conjugado según Cabra *et al.*, (1983), anti PDV (Adgia), anti ACLSV, anti TSMV y anti LMV (Sano-fi). También se utilizaron inmunoglobulinas policlonales sin marcar, anti PPV (Cabra *et al.*, 1994).

Técnicas serológicas

Se realizaron las técnicas inmunoenzimáticas ELISA-DAS, ELISA-DASI e IIP-ELISA directa e indirecta.

Se efectuó ELISA-DAS para CTV en las condiciones indicadas por Cabra *et al.*, (1990 y 1991a), para PNRSV según Cabra *et al.*, (1983) y para PDV, ACLSV, TSWV y LMV según las indicaciones de los estuches de diagnóstico de las compañías reseñadas anteriormente. Se efectuó ELISA-DASI para PPV en las condiciones de Cabra *et al.*, (1994).

La IIP-ELISA directa se realizó básicamente según Lin *et al.*, (1990) y Garnsey *et al.*, (1993) utilizando cortes de tallos, hojas, yemas o frutos realizados con cuchilla de afeitar de un solo filo. Las secciones fueron suaves pero firmemente presionadas contra una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ (Millipore), las huellas o improntas se conservaron durante 1, 6 ó 12 meses en un sobre a temperatura ambiente, o se procedió tras la impresión a su análisis. Para el mismo, las membranas impresas fueron bloqueadas con suave agitación durante 1 h a temperatura ambiente o durante 16 h a 4 °C, en una solución de 1 p. 100 de albúmina de suero bovino (ASB) (fracción V, Boehringer Mannheim) que posteriormente fue recupe-

rada y conservada a 4 °C. Seguidamente las membranas fueron aclaradas con agua fisiológica tamponada (AFT) pH 7,2-7,4 y se añadió una solución de anticuerpos monoclonales marcados con fosfatasa alcalina en AFT a una concentración aproximada de 0,1 µg/ml o de anticuerpos policlonales comerciales conjugados con fosfatasa alcalina, a la concentración o dilución indicada para su uso en ELISA-DAS. Las membranas se incubaron 2 h a temperatura ambiente y con suave agitación y las inmunoglobulinas fueron recuperadas y conservadas a 4 °C hasta un nuevo uso. Las membranas se lavaron tres veces consecutivas durante 5 min cada vez y bajo fuerte agitación en tampón lavador (0,85 p. 100 ClNa, 0,05 p. 100 Tween-20, agua destilada). Se añadió sustrato precipitante específico de fosfatasa alcalina: 0,33 mg/ml de NBT, 4 nitro blue de tetrazolio (Boehringer Mannheim) y 0,175 mg/ml de BCIP, 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato (Boehringer Mannheim) en tampón sustrato (0,1 M Tris-ClH, 0,1 M ClNa, 5 mM ClMg; pH 9,5). En algunas ocasiones la reacción se reveló utilizando tabletas NBT/BCIP de disolución en agua (Sigma, Vector o Amresco). La reacción fue paralizada al cabo de 5 o 10 min de incubación a temperatura ambiente, cuando puntos o zonas coloreadas aparecieron en los controles positivos (Fig. 1). Las membranas se observaron todavía húmedas o una vez secas en un binocular a X10-X20 aumentos.

La IIP-ELISA indirecta se realizó únicamente con los AMC y se desarrolló de análoga forma a la directa pero en vez de añadir anticuerpos específicos del virus marcados con fosfatasa alcalina, se añadieron sin conjugar. La dosis varió para los diferentes AMC de 0,05 a 0,2 µg/ml de AFT adicionado con 1 p. 100 de suero nor-

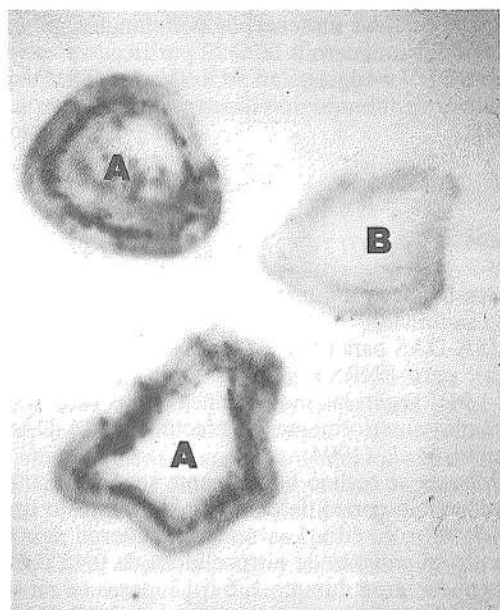


Fig. 1.—Inmunopresión de secciones de tallo joven de naranja dulce.

A: Infectado por CTV, **B:** Testigo no infectado

Immunoprinting of young shoot sections of sweet orange.

A: CTV infected, B: Non infected control

mal de cabra o conejo o 0,5 p. 100 de ASB. Después de la incubación, se procedió al lavado y finalmente, se añadió una solución de inmunoglobulinas de cabra anti ratón conjugadas con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) a una dilución 1/5000 en AFT. Las membranas se incubaron durante 1 h, se lavaron, se revelaron y se observaron como en el método directo. En el método indirecto se recuperaron también los AMC específicos y las inmunoglobulinas anti especie ratón y se conservaron a 4 °C hasta un nuevo uso.

Comparación de diagnósticos mediante ELISA convencional e inmunopresión ELISA

Se tomaron muestras de cuatro brotes jóvenes de 10-15 cm del material vegetal leñoso reseñado, para el diagnóstico mediante ELISA-DAS de: ACLSV, CTV, PDV, PNRSV y mediante ELISA-DASI de PPV. El material fue recolectado y tratado para realizar extractos según el método de Cambra *et al.*, (1988). De cada brote se realizaron dos impresiones, una de la parte apical y otra de la basal (ocho impresiones por membrana y por planta). Así cada individuo fue analizado simultáneamente mediante ELISA convencional con extractos y las mismas muestras por IIP-ELISA directo (para ACLSV, CTV, PDV, PNRSV) y por IIP-ELISA indirecto (para CTV y PPV). El proceso se realizó en primavera tras la brotación y en el mes de diciembre, tanto para frutales de hueso y rosal como para cítricos.

El diagnóstico de TSWV en tomate y pimiento se realizó simultáneamente por ELISA-DAS e IIP-ELISA indirecto, pero analizando diferentes tipos de tejidos (tallos, hojas, botones florales, frutos incipientes y frutos bien desarrollados) en los meses del cultivo al aire libre en Valencia de mayo a julio. El diagnóstico del LMV en lechuga se realizó por los mismos métodos que el TSWV, pero utilizando cortes de la base de hojas adultas y jóvenes.

Reutilización de reactivos y anticuerpos en inmunopresión

La reutilización de ASB, de anticuerpos específicos del virus (ya fueran conjugados o no) y de las inmunoglobulinas anti especie ratón, fue ensayada para el diagnóstico mediante IIP-ELISA directa de CTV y TSWV y mediante IIP-ELISA indirecta de CTV. Se utilizaron tres veces consecutivas los mismos reactivos recuperados tal y como se indica en técnicas serológicas y se compararon los resultados y su nitidez con el ensayo realizado por vez primera. El proceso total fue realizado en una semana, de manera que el máximo tiempo que los reactivos y anticuerpos recuperados estuvieron conservados a 4 °C fue de 24-48 h hasta una nueva utilización.

RESULTADOS

Se observaron claras diferencias entre las improntas realizadas con material vegetal infectado con los diferentes virus y con el material utilizado como control no inoculado. Cuando se compararon el método directo y el indirecto para diagnóstico de CTV, se obtuvieron similares resultados, variando únicamente en el tiempo necesario para conseguirlos. La IIP-ELISA directa necesitó unas 3 h y mediante el método indirecto se precisaron unas 4,5 h. Cuando la concentración de

anticuerpos fue adecuada, los controles no infectados quedaron de color blanco verdoso o ligeramente rosa pero las intensas áreas coloreadas en la zona del floema únicamente aparecieron en los tejidos infectados permitiendo la localización del antígeno. La aparición de un ligero color rosa fue más frecuente cuando se utilizaron anticuerpos policlonales y con el método directo. El uso de anticuerpos monoclonales confirió una gran especificidad para el diagnóstico de CTV y PPV. También fue más frecuente la aparición de un ligero color inespecífico y generalizado con hospedadores como tomate (tallos y hojas) y algunos frutales de hueso, especialmente el albaricquero.

El número de áreas teñidas en el floema cuando se emplearon los aislados T.388 de CTV o Marcus 79 de PPV, fue superior a cuando se emplearon otros aislados de los mismos virus. No hubo diferencias claras entre los otros aislados control de los otros virus probados.

La IIP-ELISA indirecta utilizada para diagnóstico selectivo de aislados M o D de PPV permitió la distinción entre ambos. Cuando el AMC 5B fue utilizado todos los aislados control reaccionaron pero cuando se utilizó el AMC 4DG5, únicamente hubo reacción con los aislados tipo D (3.5 y RB).

La comparación de épocas implicó la obtención de mayor número de casos positivos en primavera que en invierno, cuando se utilizaron brotes leñosos, excepto para el CTV.

Los resultados obtenidos para ACLSV indicaron que, en primavera, 30 de los 42 albaricqueros proporcionaron valores de densidad óptica que fueron considerados positivos en ELISA-DAS. En el siguiente invierno, cuando se utilizaron brotes en parada vegetativa, cinco casos que habían sido anteriormente positivos proporcionaron ahora diagnóstico negativo mediante ELISA-DAS. Mediante IIP-ELISA directo siete casos fueron negativos, los cinco anteriores y dos más que fueron ELISA-DAS positivos. En algún caso los albaricqueros indujeron coloraciones no específicas situadas fuera del floema, que no fueron tenidas en cuenta.

La detección de PNRSV en rosal y de PDV en almendro fue mejor en primavera que en el invierno siguiente. En cualquier caso se logró coincidencia de resultados por ambos métodos. El porcentaje de plantas de rosal infectadas por PNRSV fue el 17,5 p. 100 y en el 81,2 p. 100 de almendros se detectó PDV en primavera.

El diagnóstico de PPV en 162 árboles proporcionó en primavera más casos positivos que en invierno por ambas técnicas. Mediante ELISA-DASI e IPP-ELISA indirecta se encontraron en primavera 55 árboles infectados. En 88 casos también coincidió el diagnóstico negativo por ambas técnicas, pero 13 fueron considerados positivos mediante ELISA-DASI y negativos mediante inmunopresión y seis resultaron positivos mediante IPP-ELISA indirecta siendo negativos al analizar sus extractos por ELISA-DASI. En invierno, únicamente en 30 y 108 árboles coincidió el diagnóstico por ambas técnicas siendo positivo o negativo, respectivamente. En los 24 árboles restantes se produjeron discrepancias: ocho árboles positivos por inmunopresión fueron ELISA-DASI negativos y en 16 ocurrió en sentido inverso.

El análisis de 750 árboles a CTV proporcionó en primavera 381 y 341 árboles con diagnóstico coincidente por ambas técnicas siendo el primer número el correspondiente a positivos y el segundo a negativos. Se presentaron 28 divergencias: 13 positivos mediante inmunopresión fueron ELISA-DASI negativos y 15 ELISA-DASI positivos resultaron negativos con la otra técnica. El análisis en el invierno siguiente dio como resultado 394 y 351 árboles con diagnóstico coincidente por ambas técnicas, habiéndose indicado primeros los positivos y después los negati-

vos. Resultaron sólo cinco divergencias: dos árboles que se consideraron positivos por inmunopresión pero que resultaron negativos mediante ELISA-DAS y en tres árboles ocurrió lo contrario.

El diagnóstico de TSWV en plantas de tomate y pimiento con síntomas, resultó coincidente en todos los órganos y tejidos ensayados mediante las dos técnicas. Los mejores resultados, zonas teñidas más delimitadas y con coloración más intensa, se obtuvieron empleando los botones florales y los frutos recién cuajados o incluso ya desarrollados en pimiento y botones florales y tallos jóvenes en tomate. La detección del LMV coincidió mediante las dos técnicas. Cuando se utilizaron las bases de las hojas jóvenes o los nervios de hojas jóvenes con síntomas, la inmunopresión fue más clara.

Los resultados obtenidos al revelar, para detección de CTV, membranas recién impresas o conservadas durante 1, 6 ó 12 meses con los antígenos impresos, no mostraron diferencias de tinción ni casos de disparidad con respecto al diagnóstico efectuado inmediatamente.

El revelado de membranas utilizando ASB y anticuerpos específicos de CTV y de TSWV conjugados con fosfatasa alcalina recuperados una o dos veces (de dos o tres usos), proporcionó los mismos resultados en intensidad y calidad del diagnóstico que la primera vez. Idénticos resultados se produjeron al reutilizar dos y tres veces los anticuerpos monoclonales de CTV y las inmunoglobulinas de cabra anti conejo marcadas con fosfatasa alcalina, al realizar IIP-ELISA indirecta.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La técnica de la inmunopresión-ELISA permitió localizar, por vez primera, antígenos estructurales de los virus ACLSV, PNRSV y PDV en cortes de tejidos de plantas leñosas. La realización de la IIP-ELISA en secciones de brotes de plantas leñosas como albaricoquero, ciruelo, melocotonero, rosál o cítricos, ha permitido la localización inequívoca de antígenos de virus en la zona floemática.

Algunos de los inconvenientes que suelen presentar los tejidos de frutales de hueso, ricos en compuestos fenólicos que se oxidan fácilmente produciendo coloraciones que enmascaran los cúmulos de precipitado específico, han sido superados mediante el método descrito, que permite la obtención de impresiones claras e imágenes finales bien definidas.

El uso de anticuerpos monoclonales específicos permite facilitar la localización de los antígenos virales en cortes de tejidos. No obstante, el uso de anticuerpos policlonales de antisueros que posean mediana especificidad, también posibilita la observación de zonas teñidas en la zona floemática siendo una prueba fiable de la presencia de células infectadas por virus.

Cuando se emplea material craso como tomate, pimiento u hojas de lechuga, las improntas que dejan los cortes del material vegetal no permiten observar claramente las estructuras y diferentes tejidos, pero aún así es posible distinguir zonas teñidas intensamente que a veces abarcan todo el tejido impreso y que indican una alta concentración de antígenos virales. El uso de botones florales, y de frutos, suele simplificar el problema y ayuda a obtener diagnósticos claros que en tallos u hojas de plantas crasas, a veces no son tan fiables.

La observación de más zonas teñidas en cortes de tejidos infectados por algunos aislados concretos de virus suele indicar una mayor multiplicación de ciertos aislados, que frecuentemente se correlaciona con una mayor agresividad. Así el caso de cítricos infectados por el aislado agresivo T.388 de CTV, cuyos tejidos

muestran muchas más zonas coloreadas que los demás aislados ensayados, implicando una mayor capacidad de multiplicación como ya había sido mostrado mediante otras técnicas serológicas (Cambra *et al.*, 1989).

La sencilla distinción de aislados de PPV tipo M o D (Kerlan, Dunez, 1979) es otra posibilidad que ofrece la técnica IIP-ELISA. La distinción en función de la agresividad también se ha demostrado para el CTV (Garnsey *et al.*, 1993).

La idoneidad de la época primaveral posterior a la brotación, para el análisis, ya ha sido múltiples veces señalada en la bibliografía y ello justificaría los resultados obtenidos con todos los virus excepto con CTV. Con este virus se obtuvieron mayor número de positivos en invierno, muy probablemente porque entonces se estaban detectando las infecciones ocurridas en primavera mediante pulgonos.

La coincidencia del diagnóstico por ambos métodos en primavera fue del 100 p. 100 para ACLSV, PNRSV y PDV, del 96,3 p. 100 para CTV, y del 88,3 p. 100 para PPV. En invierno la coincidencia fue del 100 p. 100 para PNRSV y PDV, del 99,3 p. 100 para CTV, del 95,2 p. 100 para ACLSV y del 85,2 p. 100 para PPV. La coincidencia de resultados para TSWV y LMV fue del 100 p. 100. Así pues la coincidencia fue muy buena y algo más baja para PPV que se distribuye irregularmente y son conocidos los problemas que plantea su detección (Cambra *et al.*, 1994).

Los resultados obtenidos con las membranas impresas pero conservadas sin revelar, demuestran la posibilidad de realizar las impresiones en campo y proceder a su fácil envío por correo para su análisis posterior. Esta posibilidad tiene además la ventaja de permitir el uso de virus de cuarentena como controles, ya que impresos en la membrana no revisten ningún riesgo.

La recuperación y reciclado de reactivos y anticuerpos en la inmunopresión-ELISA, permite abaratar todavía más una técnica sencilla que no requiere instalaciones costosas y que puede ser realizada en condiciones de campo siendo tan sensible y fiable como ELISA convencional. La inmunopresión puede ser empleada de forma masiva para la realización de miles de muestras y además puede aplicarse cuando se desee conocer la localización de antígenos virales en cortes de tejidos vegetales, ya que proporciona información de la distribución del virus en la planta. La inmunopresión es una técnica muy rápida que en 3 horas puede detectar con fiabilidad antígenos virales sin necesidad de realizar extractos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido efectuado con financiación del Instituto de la Pequeña y Mediana Industria de la Generalidad Valenciana (IMPIVA) y del INIA (Proyecto SC94-035).

SUMMARY

Detection of structural proteins of virus by immunoprinting-ELISA and its use for diagnosis

The immunoprinting-ELISA (direct and indirect variants) was applied to detect and localize viral antigens in tissue sections. The following viruses were assayed: Apple chlorotic leaf spot (ACLSV), Prunus necrotic ring spot (PNRSV), Prune dwarf (PDV), Plum pox (PPV), Citrus tristeza (CTV), Tomato spotted wilt (TSWV) and Lettuce mosaic (LMV). The diagnosis in plant sections using polyclonal and specific monoclonal antibodies, has been compared with the conventional ELISA-DAS or DASI, in spring and winter time. There was a high coincidence of results obtained by both procedures.

The immunoprinting-ELISA is a very simple and sensitive technique that can be used to routinely analyze samples. In addition the technique is very fast (3 h) and the imprinted membranes can be stored for long periods before reacting them with antibodies. The technique also enables reusing reactives and antibodies, which implies a reduction of the cost.

KEY WORDS: Immunoprinting-ELISA. Reusing. ACLSV-Apple chlorotic leaf spot virus. PNRSV-Prunus necrotic ring spot virus. PDV-Prune dwarf virus. CTV-Citrus tristeza virus. PDV-Plum pox virus. TSWV-Tomato spotted wilt virus. LMV-Lettuce mosaic virus.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BANTTARI E. E., GOODWIN P. H., 1985. Detection of potato viruses S, X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). *Plant Dis.*, 69, 202-205.
- CAMBRA M., LLACER G., PEREZ DE SAN ROMAN C., MORENO P., DURBA V., 1983. Diagnóstico rápido de virus en frutales de hueso mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-DAS. *Bol. Serv. Plagas* 9, 45-59.
- CAMBRA M., SERRA J., VILLALBA D., MORENO P., 1988. The present situation of the citrus tristeza virus in the Valencian community. In: *Proc. 10th Conf. IOCV*, ed. IOCV, Riverside, pp. 1-7.
- CAMBRA M., BALLESTER-OLMOS J. F., PINA J. A., LAVIÑA A., CAMARASA E., 1989. Distinction of populations infected with severe and common strains of the citrus tristeza virus in Spain, by the ELISA-DAS (quantitative). *Fruits* 44, 335-341.
- CAMBRA M., GARNSEY S. M., PERMAR T. A., HENDERSON C. T., GUMPH D., VELA C., 1990. Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopath.*, 80, 103.
- CAMBRA M., CAMARASA E., GORRIS M. T., GARNSEY S. M., CARBONELL E., 1991a. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. In: *Proc. 11th Conf. IOCV*, ed. IOCV, Riverside, pp. 38-45.
- CAMBRA M., GORRIS M. T., CAMARASA E., ASENSIO M., 1991b. Detección y localización del virus de la tristeza (CTV) y del virus de la sharka (PPV) mediante inmunopresión directa-ELISA. In: *III Reunión Científica de la Soc. Esp. de Fitopatología*. Ed. SEF, Diputación General de Aragón. Zaragoza, p. 55 (resumen).
- CAMBRA M., CAMBRA M. A., GORRIS M. T., LOPEZ M. M., 1992. Localization of phytopathogenic bacterial antigens in plant tissue sections by immunoprinting ELISA using biotinylated monoclonal antibodies. In: *Plant Pathogenic Bacteria*. Les colloques. Lematre M., Freigoun S., Rudolph K., Swings J. G., eds. ORSTOM/INRA Editions, Paris, pp. 331-335.
- CAMBRA M., ASENSIO M., GORRIS M. T., PEREZ E., CAMARASA E., GARCIA J. A., MOYA J. J., LOPEZ-ABELLA D., VELA C., SANZ A., 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24, in press.
- CLARK M. F., BAR-JOSEPH., 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. In: *Methods in Virology Vol. VII*, Maramorosch K., Koprowski, H. ed. Academic Press, Inc., Orlando, pp. 51-85.
- GARNSEY S. M., CAMBRA M., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In: *Graft transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis*. Roistacher, C. N. ed. FAO, Roma, pp. 193-216.
- GARNSEY S. M., PERMAR T. A., CAMBRA M., HENDERSON C. T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: *Proc. 12th Conf. IOCV*, ed. IOCV, Riverside, pp. 39-50.
- HAMPTON R., BALL E., DE BOER S., 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. APS Press, St. Paul, pp. 389.
- HAWKES R., NIDAY E., GORDON J., 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.*, 119, 142-147.
- HIBI T., SAITO Y., 1985. A dot immunobinding assay for the detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *J. Gen. Virol.*, 66, 1191-1194.
- HSU H. T., LAWSON R. H., 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in Impatiens. *Plant Dis.*, 75, 292-295.
- KERLAN C., DUNEZ J., 1979. Différentiation biologique et sérologique de souches du virus de la sharka. *Ann. Phytopathol.*, 11, 241-250.
- KOENIG R., PAUL H. L., 1982. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *J. Virol. Methods* 5, 113-125.
- LIN N. S., HSU H. Y., HSU H. T., 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopath.*, 80, 824-828.