



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

20249

15 p. (MS)
-able
diagram...
i3. dielina
Final Report
(no 52/084
Proy. No
20/RCA/83/023

INFORME TECNICO PROYECTO
"RESISTANCE TO VIROSIS IN POTATO, DEVELOPMENT OF POTATO
PLANTS BEARING RESISTANCE TO POTATO VIRUS PVX, PVY AND
PLRV BY COMBINED MOLECULAR AND IN VITRO PLANT CULTURE
TECHNIQUES" (ABRIL 1993)

ONUDI PROJECT "REGIONAL PROGRAMME OF BIOTECHNOLOGY
FOR LATIN AMERICA AND THE CARIBBEAN"

DR. MIGUEL JORDAN, CONTRACT N°92/084 - INFOPME FINAL



Departamento de Ecología
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile
Casilla 114-D
Fax: 56 - 2 - 2225515
Santiago
Chile

A : Coordinador Técnico. Dr. Rodolfo Quintero/ONUDI,
Presidente Masaryk 20 - 14° Piso. Col. Polanco
11570, México

c.c.: Marcela Millán, CONICYT

UV por 10, 20 y 30 min. cuyos explantes fueron irradiados en capsulas Petri de cuarzo en campana de flujo laminar. (Jordan, 1991; 2º Informe Técnico, -Contrato 90/92, Mayo) El efecto negativo de la luz UV y agentes mutagénicos sobre desarrollo radicular y morfología de los brotes también está detallado en dicho informe.

A través de la visita en Enero 1993 del Dr. Alejandro Mentaberry de INGEBI en Santiago, se discutieron algunos métodos para la detección de virosis. Una estadía por mayor tiempo en B. Aires no se justificó debido a que primordialmente había sido concebida en relación al supuesto uso de nuevos plásmidos o construcciones disponibles, generadas en algunos de los otros países participantes. Hasta fines de Abril 1993, se evaluaron respuestas para detectar presencia de PVX y PVY en parte del material en estudio. Se evaluó un total de 225 muestras. Se probaron el cv. Desirée traído de Mexico (CINVESTAV, Dr. L. Herrera-Estrella) y cvs. chilenos N°s 1005, 1079 y 1200 proporcionados por el Dr. Andrés Contreras, de la Colección de Germoplasma de Papa de la Universidad Austral.

MATERIALES Y METODOS

La técnica de detección correspondió al test ELISA cuyo kit fue cedido gentilmente por el Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú). atención del Dr. Luis Salazar (metodología adjunta). Las plantas fueron inoculadas de acuerdo al protocolo indicado por Tozzini et al 1991, los controles positivos de PVX y PVY fueron cedidos por el Coordinador Dr. Esteban Hopp (como hojas liofilizadas), protegidas debidamente. Para su uso, este material fue macerado y sometido a buffer de extracción a razón de 5 ml de buffer por cada 0,05 g de material liofilizado. Esta suspensión fue centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos agregándose al sobrenadante 100 mg de carborundum por ml.

Los explantes de papa de los diferentes cvs. y tratamientos, fueron inoculados con tórula de algodón y se mantuvieron a lo menos 3 semanas en crecimiento *in vitro* en cámara de cultivo a 25°C, con 57 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Posteriormente, las muestras para la prueba ELISA fueron recolectadas

en bolsas de polietileno y maceradas con buffer de extracción en relación 1:2, centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min.; el sobrenadante (200 ul aprox) fué empleado para la prueba.

Cada muestra (dentro de un grupo) corresponde básicamente a una plántula regenerada a partir de brotes de un explante foliar de 1 cm² de papa, del cual pueden originarse simultáneamente hasta 15 plántulas en forma directa, morfogénesis que evita y no requiere el paso intermedio de formación de callo (Jordan, 1990, Contrato 90/92, 1er Informe Técnico, Octubre).

RESULTADOS

De acuerdo a los antecedentes indicados por Meza 1991, (Informe correspondiente al sub-contrato N°90-91 del mismo Proyecto) al evaluar resistencia a diferentes virus en la colección de germoplasma de la Universidad Austral el clon 1005 es considerado resistente a PVX y sensible a PVY de acuerdo a la detección NCM-ELISA (membrana nitrocelulosa-ELISA) y también dicha resistencia a PVX había sido detectada antes por serología y determinaciones visuales (Contreras y Banse, 1982; Contreras,1987). Nuestros resultados, igualmente con ELISA, (Microplates) indicaron que para los explantes regenerados in vitro del clon 1005,(sin tratamientos inductores de mutación) se mantiene inalterable la resistencia a PVX preexistente (Tabla 1), mostrando algunas muestras resistentes a PVY (Tabla 10). Paralelamente para Desireé en ninguno de los tratamientos inductores posibles de mutagénesis se alteró la condición de aparente resistencia visualizada de las muestras ante PVX (Tablas 2 y 3). Sin embargo, siendo este cultivar susceptible a PVY, nuestros análisis mostraron una eventual inducción de resistencia en algunos regenerantes, especialmente por Bromuro de Etidio y UV30 min.(Tabla 6 y 7).

En forma paralela, el clon 1079 referido en la literatura como resistente a PVX y susceptible a PVY (susceptible en pruebas hechas por Meza,1991 aunque resistente por serología e inspección visual, Contreras y Banse, 1982); muestra la mantención de esta resistencia al virus X

posterior infección con PVX y detección con ELISA (Tabla 4). Por otro lado, aparece resistencia ante PVY dadas las reacciones negativas con PVY (Tabla 8). Un efecto similar de variación hacia resistencia a PVY causada por UV se observa en la Tabla 9. La producción de plantas PVY+ y PVY- se observa también en el cv. Desirée después de la aplicación de luz UV, Naranja de Acridina, o en presencia de Bromuro de Etidio (Tablas 6 y 7). Concluyendo, la comparación de las intensidades de la reacción de coloración para la prueba ELISA obtenidas para el control original de PVY (+2) y el clon 1079, en relación a las plántulas expuestas a agentes mutagénicos y a distintos tiempos de luz UV, presume que la exposición a estos últimos reduce la susceptibilidad a la infección (PVY+), es decir existe un aparente aumento de la resistencia a la infección.

También el clon 1200 que es resistente según la literatura para PVX y sensible para PVY (Meza, 1991; Contreras y Banse, 1982) mantiene esta condición en los resultados observados en nuestro laboratorio, aunque aparecen algunos cambios en ensayos de plantas transformadas por pGV 2260, aspecto que debe ser estudiado en mayor detalle (Tablas 5 y 11). Ilustraciones y detalles de respuestas morfogénicas y variaciones morfológicas observadas en las plantas de algunos clones tratados con luz UV y agentes mutagénicos, fueron informados anteriormente.

Evaluación de los resultados expuestos en tablas.

Los controles PVX y PVY positivos de cepas originales dieron reacción positiva en cada una de las series.

La intensidad de la reacción de las cepas y muestras que se presenta en las tablas 1 a 11, se codificó como sigue:

- 0= reacción negativa
 1= reacción positiva leve
 2= reacción positiva mediana
 3= reacción positiva intensa

Detección de PVX

Tabla 1: Detección de resistencia a PVX mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del clon 1005.

Nomenclatura	Nº Muestras	PVX Intens.	Observaciones
Exp.4*br.1	6	0	-
Exp.4 br.3	2	0	-
Exp.8 br.1	2	0	-
Exp.8 br.2	2	0	30 min luz UV
Exp.8 br.3	1	0	-

Total de la muestra 13.

*Los códigos 4 y 8 corresponden a dos explantes de hoja que *in vitro* originaron brotes identificados como 4-1, 4-3, 8-2 o 8-3. Cada muestra corresponde a réplicas de los brotes derivados de un explante original. De 13 muestras todas resultaron resistentes; como este clon es resistente, no debió ocurrir variación somaclonal *in vitro*.

Tabla 2: Detección de resistencia a PVX mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del cv. *Desirée* sometidas a diferentes tratamientos con luz ultravioleta.

Tratamiento	Nºmuestras	PVX+ Intens.
UV 30 min	8	0
UV 20 min	6	0
UV 10 min	7	0

De las 21 muestras todas resultaron negativas, es decir plántulas resistentes.

Tabla 3: Detección de resistencia a PVX mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del cv. Desirée sometidos a bromuro de etidio o naranja de acridina.

Tratamiento	Nº Muestras	PVX+ Intensidad
Control	18	0
Nar. Acrid. 0.01	4	0
Nar ^ acrid. 0.9	12	0
Brom. Etidio	7	0

Total 41 muestras

Tabla 4. Detección de resistencia a PVX mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del clon 1079 sometidas a luz UV.

Nomenclatura	Número Muestras	PVX+ Intens.	Observaciones
Expl. 5 br1	1	0	-
Expl. 5 br2	4	0	-
Expl. 4 br1	15	0	-
Expl. 4 br2	4	0	-
Expl. 5 br1	6	0	30 min luz UV
Expl. 5 br2	1	0	30 min luz UV
Expl. 5 br3	2	0	30 min luz UV

Total 33 muestras

Tabla 5: Detección de resistencia a PVX mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del clon 1200.

Nomenclatura	Número Muestras	PVX+ Intens.	Observaciones
Exp. 2 br. 1	3	0	-
Exp. 7 br. 2	15	0	-
Exp. 7 br. 2	3	0	(Agrobacterium, pGV 2260)

Total de Muestras= 21; todas resultaron resistentes. Dado que este clon es resistente, no debió ocurrir variación somaclonal in vitro.

Detección de PVY

Tabla 6. Detección de resistencia a PVY mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del cv. Desirée sometidos a tratamientos con luz UV.

Tratamiento	Numero de Muestras	PVY+ Intensidad	Observaciones
Control PVY, cepa original		2	
UV 10 min.	3	1	
UV 20 min	6	2	
UV 30 min	3	0	Con mayor tiempo de exposición UV, aparecen explantes resistentes

Total de muestras= 12

Tabla 7. Detección de resistencia a PVY mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del cv. Desirée sometidos a tratamiento con los agentes mutagénicos naranja de acridina o bromuro de etidio.

Tratamiento	Numero de Muestras	PVY+ Intens.	Observaciones
Control PVY, cepa original.		2	
Sin tratamiento	19	1	
Nar. Acrid. 0.1	6	1	Br. de Etidio y Nar. Acr. reducen la intensidad de tinción; en algunos casos habría muestras con resistencia a PVY (*)
Nar. Acrid. 0.9	2	1	
Brom. Etidio	2	0*	
Brom. Etidio	2	1	

Total de muestras= 31

Tabla 8. Detección de resistencia a PVY mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del clon 1079 no sometidas a tratamientos mutagénicos.

Nomenclatura	Numero de Muestras	PVY+ Intens.	Observaciones
Expl.4 br.2	2	0	Las muestras corresponden a explantes de 2 hojas, (Exp.4 y 5). Por ello las diferencias de reacción, atribuibles a plantas resistentes puede haber sido originado por variación somaclonal.
Expl.4 br.2	2	2	
Expl.4 br.2	1	3	
Expl.5 br.1	3	0	
Expl.5 br.1	2	1	
Expl.5 br.1	2	2	
Expl.5 br.2	1	2	

Total de muestras=13.

Tabla 9. Detección de resistencia a PVY mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del clon 1079, controles y sometidas a UV.

Nomenclatura	Mumero de Muestras	PVY+ Intens.	Observaciones
Expl.4 brote 1	6	1	
Expl.4 brote 1	9	0	
Expl.5 brote 1	2	0	30 min UV
Expl.5 brote 1	1	1	30 min UV

Total de muestras 18.

Tabla 10. Detección de resistencia a PVY mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del clon 1005.

Nomenclatura	Numero de Muestras	PVY+ Intens.	Observaciones
Contro PVY, cepa original		2	Dos pruebas positivas
Expl.4 brote 1	1	0	La mayoría de las muestras indica reacción negativa indicando posible resistencia.
Expl.8.brote 1	1	0	
Expl.4.brote 2	2	0	
Expl.8.brote 3*	1	1	

Total de muestras= 5.

Tabla 11 Detección de resistencia a PVY mediante la prueba ELISA de plantas regeneradas a partir de explantes de hojas del clon 1200 no sometidos a tratamiento aunque infectados con *Agrobacterium tumefaciens*(pGV 2260).

Nomenclatura	Numero de Muestras	PVY+ Intens.	Observaciones
Expl.7 br.2	7	1	
Expl.7 br.2	5	0	
Expl.4 br.4	3	0	Inf. con Agrobact.
Expl.2 br.1	2	0	Inf. con Agrobact.

Total de muestras=17

Conclusión: Los resultados indicados más arriba están referidos en su conjunto a datos de una muestra de 225 pruebas. Dado que en el contexto de este proyecto estos resultados iniciales de muestras derivadas de condiciones de laboratorio corresponden todavía a una muestra pequeña, la apreciación de conclusiones debe ser cuidadosa y considerar que las variaciones en resistencia encontradas en un momento, no necesariamente reflejan cambios de manera permanente.

Sin embargo en papa, la detección de variación somaclonal derivadas del uso de fitohormonas y condiciones de cultivo in vitro solamente, aparece bastante frecuente, permitiendo una selección rápida mediante diferencias morfológicas; en el caso de algunas plantas del cv. Desiree el carácter "pigmentación" en tubérculos (con y sin presencia de antocianinas) se logró transmitir en forma estable (Wheeler et al, 1985)

Esto permite suponer que es posible se hubiesen generado algunos cambios, en porciones de tejido en división que fueron inducidos por condiciones de cultivo in vitro o derivados por efecto de luz UV y/o agentes mutagénicos. Algunos de estos cambios se habrían manifestado en los explantes de papa en estudio afectando parámetros normales de expresión de resistencia de los cultivares en estudio frente a la infección con PVX y PVY.

Otras actividades relacionadas con el Proyecto: Asistencia de Maritza Obando (estudiante de Postgrado) al curso Internacional de Biotecnología: "Aspectos técnicos y económicos de la aplicación de la genética genómica en Biotecnología", patrocinado por UNIDO y UNU (United Nations University), el cual se desarrolló en Campinas, Brasil, en el Centro de Biología Molecular e Ingeniería Genética, Universidade Estadual de Campinas, entre el 30 de Marzo y el 10 de Abril de 1992.

REFERENCIAS

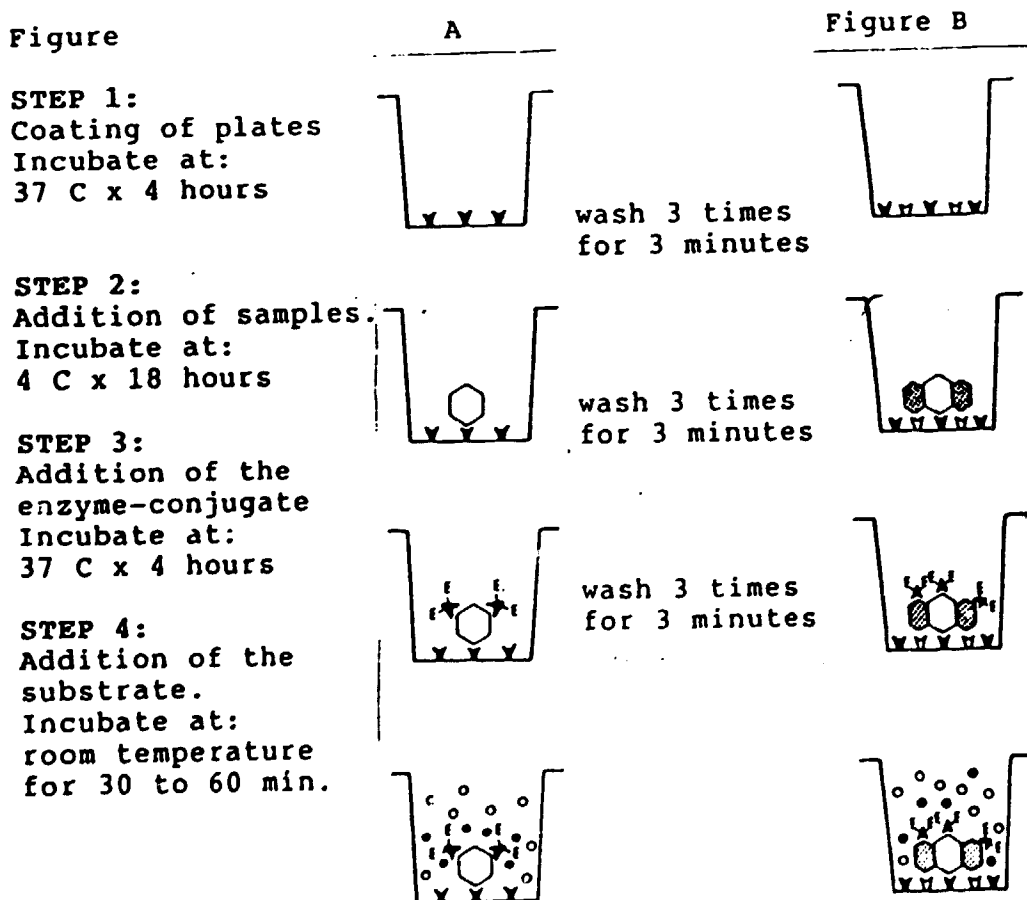
- Contreras, A y J. Banse (1982) Determinación de virus en el germplasma chileno de papas (Solanum sp.). Agro Sur 10:84-89.
- Contreras, A y V. Tapia (1983) Resistencia a virus en variedades antiguas de papa chilena (Solanum tuberosum L.). Virus Y. Agro Sur 11:69-73
- Contreras, A. (1987) Germoplasma chileno de papas (Solanum spp). (En: Contreras, A y J. Esquinas-Alcázar Eds.). Anales Simposio Recursos Fitogenéticos. Valdivia 1984. UACH-IBPGR, pg 43-75.
- Jordan, M (1990). Informe técnico N°1, proyecto "Resistance to virosis in potato"(PNUD/UNESCO/ONUDI-DP/RLA 83/003). Contrato 90/92, 13 pg.
- Jordan, M (1991). Informe técnico N°2, proyecto "Resistance to virosis in potato"(PNUD/UNESCO/ONUDI-DP/RLA 83/003). Contrato 90/92, 10 pg.
- Jordan, M.; Roveraro, C. Stipo, A.; Aguirre J., Velazquez, L. y B. Tesser (1991) Inducción de variantes somaclonales y transformación en papa (Solanum tuberosum) empleando Agrobacterium tumefaciens Cienc. Inv. Agr. 18, 129-136.
- Meza, L. (1991). Informe técnico proyecto "Resistance to virosis in potato"(PNUD/UNESCO/ONUDI-DP/RLA 83/003), Sub-contrato 90/91, 18 pg.
- Tozzini, A.C., Ceriani, M.F., Saladrigas, M.V. and E. Hopp (1991). Extreme resistance to infection by potato virus X in genotypes of wild tuber-bearing Solanum species. Pot. Res. 34
- Wheeler, V.A., Evans, N.E., Foulger, D., Webb, K.J., Karp, A., Franklin, J. and S.W.J. Bright (1985). Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants. Ann. Bot 55:309-320.

Introduction:

In general, the detection of plant viruses by serological techniques are based on the capacity of the antigens (virus particles) to react "in-vitro" with its specific antibody.

The direct double sandwich method of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is one of the most sensitive serological techniques, based on the use of an enzyme-antibody conjugate. The virus particles, if present in a sample, are first trapped by specific antibodies previously adsorbed to the wells of a microtitre plate (Fig. A.2) and then made to react with the antibodies of the conjugate (Fig. A.3). If the virus is not present, contents of the well will remain as in the Figure A.1, until the end of the test. The enzyme hydrolysis is specific to a substrate (Fig. A.4) and yields a colored product, whose intensity is proportional to the amount of virus present in the sample. The test is normally completed in around 2 days.

More than a single virus can also be detected at a same time by using a polivalent ELISA kit. A mixture of antibodies are used first to coat the plate, and after the addition of the samples, a polivalent conjugate is used to determine if the sample contains any of the viruses being tested (Figures B.1 to B.4).



This CIP ELISA KIT is for the simultaneous detection of potato virus X, Y and S (PVX, PVY and PVS respectively) in one plate and for the detection of potato leafroll virus (PLRV) alone in another plate.

Before performing the ELISA test, be sure to have everything needed for this purpose and read carefully the instructions.

MATERIALS NEEDED FOR PERFORMING THE ELISA TEST:

1. Materials included in the ELISA KIT (see attached lists).
2. A clean¹ container or bottle of 1000 ml (cm³).²
3. A clean container or bottle (glass or plastic) of 200 to 300 ml (cm³).
4. A marking pen or wax pencil for the identification of the samples and plates.
5. Pasteur pipettes.³
6. Refrigerator.⁴
7. Incubator 32-37 C.⁵
8. Distilled water.⁶
9. A thick test tube or a piece of fround wood (lenght 15 cm) like the ones in a broom.
10. Plastic bags similar to those included in the kit.

1 Wash the container thoroughly with a mild detergent and rinse several times with tap water and finally with distilled water. Let it dry completely before use. Follow the same washing procedure for all containers or pipettes used for this test.

2 According to the International Systems of Units, 1 ml = 1 cm³ and 1 liter = 1 dm³.

3 For accuracy, let drops fall with pipette held in vertical position. If not available, make a very small hole in the bottom on the bag using a pin for each sample, immediately before dropping the sap into the respectively well.

4 If not available, leave plates over a bench in a cold and dark place.

5 If not available, leave plates over a bench in a warm (no more than 38 C) and dark place.

6 If not available, use cool tap, well or rain boiled water, decanted carefully to avoid precipitates.

INSTRUCTIONS:

STEP 1:

Early in the morning:

- a.- Prepare the coating buffer, using the empty plastic bottle supplied in the kit. Mix well 5.0 ml (cm³) of buffer 1 with 20.0 ml (cm³) of distilled water for one plate.
- b.- To the above buffer add 0.10 ml (cm³) of each of the following antibodies (IgG): PVX-IgG, PVY-IgG and PVS-IgG. When testing only for PLRV, add 0.10 ml (cm³) of PLRV-IgG to the same amount of buffer. Mix well but gently, avoiding the formation of foam. This mixture is call "coating antibodies".
- c.- Using the blue marked pipette add 8 drops of the "coating antibodies" to each well of the microtitration plate. Make sure that all wells were filled.
Handle the plates with care, avoid to spill the content of the wells.
- d.- Cover the plate with a piece of adhesive tape or put it inside a plastic bag (similar to the ones included in the kit), seal with adhesive tape to prevent evaporation and incubate at 37 C for 3-4 hours or at room temperature for 5 hours.

STEP 2:

IMPORTANT : During the incubation period, prepare the samples to be tested following these instructions:

- a.- Collect and identify the samples in the plastic bags (this can be done one or two days ahead, if they can be stored at 4 C). For testing leaves, select those showing symptoms, or take one leaf from the top , middle and bottom of the plant for every sample. For testing tubers, use sprouts and a small section of the heel end. Dormant buds and tuber flesh are not suitable for detection of PVY by ELISA.

- Use the data sheet supplied in the kit or a similar one, to identify the samples in the plate.
- b.- Prepare the PBS+Tween buffer: dissolve 1 pack of buffer 2A (PBS) in 1000 ml (cm^3) of distilled water. Using the white marked pipette add 20 drops of buffer 2B (Tween 20) and mix well.
 - c.- Prepare the PBS+Tween+PVP+EA buffer : with a very small amount of distilled water, dissolve 1 pack of buffer 3 (PVP-40 + EA). Complete to 200 ml (cm^3) with the PBS+Tween buffer . This is called "extraction buffer".
 - d.- To each bag, using the green marked pipette add about three times in volume (cm^3) the weight of the sample (g) of extraction buffer. Example: for approximately 1.0 g (approximately 3 to 4 leaflets) of tissue add 3.0 cm^3 of the extraction buffer. Save the remaining extraccion buffer (to use in step 2 h).
 - e.- Grind samples by rolling with slight pressure a thick test tube or something similar over the plastic bag, until the sample is completely macerated.
 - f.- Empty the plate, blot it immediately on absorbent paper (like paper towel). Using the washing bottle fill wells almost up to the top with PBS+Tween buffer. Soak for 3 minutes and drain. Repeat this procedure for three times.
 - g.- Using the green-marked pipette add 6 drops of the sample into a well, wash the pipette 10 to 15 times with tap water before proceeding to the next sample.
 - h.- Prepare individually each of the positive and healthy controls included in the kit (code 6): add 3 drops of each of the extracts into at least two wells in the corresponding plate and mix with the same amount of extraction buffer.
 - i.- Seal the plate as before and incubate it in a domestic refrigerator or at room temperature overnight.

STEP 3:

Early in the morning:

- a.- Prepare the conjugate buffer dissolving PVP-40 + EA (code 4) in 20 ml (cm^3) of PBS+Tween.
- b.- If you want to detect all virus at the same time (PVX, PVY and PVS): add 0.10 ml (cm^3) of the conjugate solution for each virus to be detected to the conjugate buffer but if you want to detect only PLRV, add 0.10 ml (cm^3) of the respective conjugate solution. Mix well but gently, to avoid foam formation.
- c.- Wash the plate as in step 2a, being careful not to allow contents of one well to flow into another. Note: If some wells still look green after 3 washings, repeat this procedure for two more times, or until all wells look completely clean.
- d.- Using the red marked pipette add 6 drops of the conjugate solution to each well of the plate.
- e.- Incubate as in step 1d.

STEP 4:

- a.- Wash the plate as in step 2a.
- b.- Prepare 30 ml (cm^3)/plate of the buffer 5 (substrate buffer): mix 5.0 ml of buffer code 5 with 25 ml of distilled water.
- c.- Dissolve 4 tablets of substrate tablets (if tablets or the solution gets in touch with your hands, wash them thoroughly with plenty running water: it is very toxic).
- d.- Using a yellow marked pipette add 10 drops of the substrate solution, to each well of the plate. Do not stop until the end.
- e.- Leave the plate for 30 to 60 minutes for the reaction occur. Identify first the healthy and the positive controls.
- f.- The infected samples (positive reaction) are those showing a yellow colour, whose intensity vary depending on the virus concentration in the sample. After one hour, non-specific reactions may begins to appear, therefore, the results should be recorded during this time.

REUTILIZATION OF THE ELISA PLATE:

A: Complete dissociation:

By this procedure, the plate is completely cleaned and is suitable for plates used for detecting PVX, PVY and PVS.

a.- If dissociation can not be done immediately, empty plate, fill wells with distilled water, drain and keep it in a plastic bag at -5 to -15°C as long as is being needed and then continue as in b.

b.- When dissociation can be done immediately:

Dilute 3.0 ml (cm^3) of buffer 7 with 27.0 ml (cm^3) of distilled water (10% NaOH). Wash the plate 3 times as in step 2a using PBS-Tween buffer and then wash the plate again for 3 times, but now using distilled water, without waiting 3 minutes between them. Using a clean pipette, add 8 drops of the dissociation buffer into each well of the plate. Incubate it for 60 minutes at room temperature. Wash plate 6 times as in step 2a using only distilled water (wait 3 minutes between wash). Store the plate until future use (start from coating step 1).

B: Partial dissociation:

By this procedure, the plate remains coated with the antibodies, ready to be use again for adding the samples. It is suitable for detecting PLRV.

a.- Same as for complete dissociation.

b.- Dissolve 1 pack of glycine in 30 ml (cm^3) of distilled water and add 0.6 ml (cm^3) of HCl (buffer code 6). Wash plate and add the buffer solution as for the complete dissociation (A-b). Load with the samples or store the plate in the freezer for future use.

MATERIALS INCLUDED IN THE POLIVALENT ELISA KIT

CODE	NAME	CHEMICAL COMPOSITION	QUANTITY	PHYSICAL STATE	FOR 1 PLATE	REMARKS
I	BUFFERS:					
1	Coating	0.4 g Na ₂ CO ₃ 0.73 g NaHCO ₃ 0.05 g NaN ₃ 50.0 cm ³ dist. water.	1 bottle	Liquid: transparent	Mix 5 cm ³ of buffer 1 with 20 cm ³ of dist. water.	Store the bottle with the concentrated solution in a cold and dark place.
2A	PBS	8.0 g NaCl 0.2 g KH ₂ PO ₄ 0.2 g KCl 1.14 g Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	10 packets	Powder: white	Dissolve 1 pack in 1.0 liter distilled water.	Stable at room temperature.
2B	PBS-Tween	Tween 20 or Tween 80	1 bottle 10 cm ³	Liquid: yellow	PBS-Tween mix 20 drops of Tween with liter of PBS buffer.	Stable at room temperature.
3	Extraction buffer	4.0 g PVP-40,000 2.0 g Egg albumen	10 packets	Powder: milky	Dissolve 1 pack in 200 cm ³ of PBS+Tween.	Dissolve the powders, first with a very small amount of distilled water.
4	Conjugate buffer	0.4 g PVP-40,000 0.04 g Egg albumen	10 packets	Powder: milky	Dissolve 1 pack in 20 ml of PBS+Tween.	Same as for 3.
5	Substrate buffer	34.92 cm ³ Diethanolamine 20.28 cm ³ dist. water 4.8 cm ³ HCl (37%)	1 bottle 60.0 cm ³	Liquid: transparent.	Mix 5.0 cm ³ of buffer 5 with 25 cm ³ of distilled water.	Store the concentrated solution in a cold and dark room.
6	0.2M Glycine For partial dissociation	0.75 g Glycine 10 cm ³ HCl (18.5%)	5 packets 1 bottle	Powder: white Liquid: transparent	Dissolve 1 pack in 30cm ³ of dist. water. Add 0.6 cm ³ of HCl.	Prepare immediately before use. Never add the water after the HCl.
7	10% NaOH For total dissociation	20.0 g NaOH 20.0 cm ³ dist. water.	1 bottle	Liquid: transparent.	Dilute 3.0 cm ³ of buffer 7 with 27 cm ³ of dist. water.	Stable at room temperature for many months.

CODE	NAME	CHEMICAL COMPOSITION	QUANTITY	PHYSICAL STATE	FOR 1 PLATE	REMARKS
II	IgG	Proteins	4 vials	Liquid: transparent	Dilute 0.1 cm ³ of IgG in 25 cm ³ of buffer	Store in a cold and dark place. If possible at 4°C.
III	CONJUGATE	Proteins	4 vials	Liquid: transparent	Dilute 0.10 cm ³ of conjugate in 20 cm ³ of PBS+Tween+PVP+EA	Same as for IgG (II).
IV	SUBSTRATE	Crystals	48 tablets	Tablets: white	Dissolve 4 tablets in 30 cm ³ of buffer 5	Store in a dark and cold place. Close very well the vial.
V	CONTROLS	Inactivated plant extract	5 vials	liquid	Add 6 drops of each control sample in 2 wells of the plate	Store in a cold and dark place. Close well the vials tightly.
VI	ELISA PLATES	Polystyrene	4	Solid plastic		Reuse 2 times: PLRV: partial dissociation. PVY, PVX and PVS: total dissociation.
VII	PIPETTES	Glass	8 units	Solid		Use pipette of each color according with the instruc- tions.
VIII	BULB	Rubber	1	Solid		Use with pipettes.
IX	SYRINGE	Plastic: 5 cm ³	1	Solid		Use to measure the Tween and diethanolamine.
X	SYRINGE	Plastic: 1 cm ³	1	Solid		Use to measure the IgG and conjugate.
XI	CALIBRATED BOTTLE	Plastic: 30 cm ³	1	Solid		Use to measure the buffers Wash carefully each time.
XII	SAMPLE BAGS		100	Plastic polystyrene		Use one for each sample.
XIII	WASHING BOTTLE	Plastic: 30 cm ³	1	Solid		Use to wash the plates.