

Detección del *virus de la tristeza de los cítricos* por serología, microscopía e hibridación *in situ*

In situ serological, microscopy and hybridisation detection of CTV

Patricia Rodríguez¹, Gloria Romero de Pérez², Mónica Guzmán³

Resumen

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es perjudicial para la citricultura y causa la enfermedad llamada tristeza de los cítricos. Infecta las especies del género *Citrus* ocasionando la muerte de millones de árboles. Los síntomas son decaimiento rápido (QD) y acanalamiento de tallo (SP). En el trabajo se diagnosticó molecular y serológicamente al CTV en aislados provenientes de *Citrus aurantifolia* o Lima Tahití (LT) y *Citrus madurensis* (Lour) o Calamondino (Ca), y se realizaron estudios preliminares de detección viral por medio de microscopía óptica e hibridación *in situ*. Se utilizó IC-RT-PCR e inmunopresión de tejido (IMI) expuesto a los anticuerpos monoclonales 3DF1+3CA5, y con el anticuerpo discriminante MCA 13 con técnica de Enzyme Linked Immunosorbent Assay Doble Sándwich (*Elisa*-DAS). La detección por microscopía se realizó sobre secciones de pecíolo de LT y C que se tiñeron con Azure A, y con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para la hibridación *in situ* se empleó una sonda marcada con digoxigenina dirigida hacia el gen de la proteína mayor de la cápside. Los resultados de IC-RT-PCR, IMI y Elisa fueron positivos para LT y C, indicando la presencia de variantes virales de tipo severo. Con microscopía de luz se detectaron inclusiones citoplasmáticas en las células acompañantes y del floema, confirmado con IMI y por hibridación *in situ*. Se visualizaron inclusiones de partículas virales en el tejido vegetal con microscopía electrónica con cambios en la ultraestructura celular como presencia de grandes vacuolas propias de la infección viral. Este trabajo integra distintas técnicas diagnósticas sobre dos especies cítricas exóticas.

Palabras clave: inmunopresión, *Elisa*, hibridación, microscopía, CTV, IC-RT-PCR.

Abstract

Citrus tristeza virus (CTV) is deleterious for citriculture and causes citrus tristeza disease. CTV infects all citrus species thereby causing the death of millions of trees. Its main symptoms are quick decline (QD) and

1 Bióloga, M. Sc., Universidad Nacional, Instituto de Biotecnología, Bogotá, Colombia. parodriguezb@unal.edu.co

2 Bióloga, M.Sc., Laboratorio de Microscopía Electrónica, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia. hgsperez@andinet.com

3 Bióloga, Ph. D., coordinadora Laboratorio de Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional, Bogotá. Colombia. mmguzmanb@unal.edu.co

stem pitting (SP). Serological, molecular and microscopy techniques were used in this work for diagnosing CTV in *Citrus aurantifolia* or Tahiti Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) (TL) and *Citrus madurensis* (Lour) or Calamondin (Ca) isolates. Petioles were tissue printed (IMI) and exposed to 3DF1+3CA5 monoclonal antibodies; they were then ELISA buffer extracted and exposed to a discriminant MCA 13 monoclonal antibody in a double-antibody sandwich indirect enzyme-linked immunosorbent assay (DASI-ELISA). Immunocapture reverse transcriptase-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) amplification, using specific major coat protein gene (CPG) primers, was used on the ELISA buffer extracts as template. Optical and electron microscopy were used for detection on transversal sections of petiole and stained with azure A, uranyl acetate or lead citrate. Digoxigenin-labelled major CPG CTV probes were used for *in situ* hybridisation of petioles printing. All IC-RT-PCR, IMI and ELISA results were positive for both LT and C, indicating the presence of severe viral variants. Light microscopy cytoplasm inclusions were detected in the phloem and accompanying cells, confirmed by IMI and *in situ* hybridisation. Electron microscopy analysis revealed cellular abnormalities with changes in ultrastructure and the presence of big vacuoles which are characteristic of cytoplasmic viral infection. This is the first work integrating all available diagnostic techniques on these two exotic citric species.

Key words: immunoimpression, *Elisa*, hybridisation, microscopy, CTV, IC-RT-PCR.

Recibido: octubre 1 de 2008

Aprobado: junio 18 de 2009

Introducción

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (*Closteroviridae-Closterovirus*) es causa de una de las enfermedades más destructivas para los cítricos, y está presente en todos los países cítricos, con distintos niveles de incidencia. Es endémico en Asia, Sudáfrica, Australia, Sudamérica, México y Estados Unidos, y se ha detectado con incidencias menores en los países del Mediterráneo. Los huéspedes están restringidos a la familia *Rutaceae* (Bar-Joseph et ál., 1989; Cambra y Moreno, 2000), y el género *Poncirus* tiene genes de resistencia (Rai, 2006). El primer brote masivo de la enfermedad de la tristeza sobre patrón de naranjo agrio se observó en Argentina en 1930, y luego en Brasil en 1937 (Naranjo, 1997). La infección viral ocasiona un bloqueo de los vasos conductores impidiendo la nutrición y afectando fisiológicamente a sus huéspedes, implicando la pérdida de millones de árboles (Schneider, 1957; Cambra y Moreno, 2000). En general se reconocen tres tipos principales de síntomas: el declinamiento rápido (QD) de árboles que se encuentran injertados sobre patrón de naranjo amargo; el acanalamiento de tallo (SP) que no tiene restricciones en cuanto al patrón, y el amarillamiento de

plántulas (SY), que causa pérdidas en los semilleros de cítricos e invernaderos, e involucra clorosis en hojas y crecimiento atrofiado en plantas de naranjo dulce, toronja y limón. La gama de síntomas y la intensidad de los mismos depende de la combinación patrón-copa y cepa viral (Bar-Joseph et ál., 1989).

El virus es transmitido por diferentes áfidos, entre ellos, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) que es el más eficiente para la transmisión de cepas severas (Roistacher y Moreno, 1991; Brlansky et ál., 2004; Broadbent et ál., 1996). La partícula viral es filamentosa y flexuosa con 2000 x 11 nm, y posee dos proteínas de cápside: p25 o proteína mayor, y p27 o proteína divergente de cápside. Ambas proteínas son inmunogénicas y se relacionan con la virulencia o transporte viral (Pappu et ál., 1993; Febres et ál., 1996; Karasev, 1995). Varios anticuerpos anti CTV se han obtenido, entre policlonales y monoclonales (Vela et ál., 1986; Zemzami et ál., 1993), sin embargo, pocos son útiles para discriminar entre aislados severos y suaves, como MCA 13 de USA, 109/110 de USA, 4G12 y 110E 3 de Taiwan (Permar et ál., 1990; Tsai y Hsu, 1991; Nikolaeva et ál., 1997). Diferencias de detección serológica dependiendo del anticuerpo de

cubrimiento utilizado, han sido informadas por diferentes autores (Cambra et ál., 1991; Nikolaeva et ál., 1998; Martínez et ál., 2005; Martínez y Guzmán, 2007; Lbida et ál., 2005).

El CTV se acumula en el citoplasma como inclusiones citoplasmáticas (IC), que incluyen agregados virales y proteína p20 (Gowda et ál., 2000). Además, la infección viral puede conllevar la formación de vacuolas de gran tamaño, anormales para el funcionamiento celular adecuado. Las IC se localizan en las células asociadas al floema, tienen utilidad diagnóstica, y se pueden observar con microscopio de luz, en cortes de tejido coloreados con Azure A o por inmunodetección (Christie y Edwardson, 1977; Brlansky, 1987; Brlansky y Lee, 1990). La IC es uno de los 49 criterios para la clasificación grupal de los virus de plantas (Brlansky, 1991); además, se han informado diferencias en cuanto al número de inclusiones dependiendo de la cepa, suave o severa, para algunos huéspedes (Ecale Zhou et ál., 2002). Por microscopía electrónica se ha estudiado la morfología de la partícula viral a partir de purificados (Kitajima et ál., 1964; Ecale Zhou, et ál., 2002). También, la microscopía electrónica serológicamente específica (SSEM) ha sido utilizada para detectar viriones con anticuerpos específicos (Roberts y Harrison, 1979; Derrick y Timmer, 2000).

En Colombia, el CTV se ha detectado desde el año 1985 (Aubert et ál., 1992; Acosta et ál., 1994) en diferentes departamentos citrícolas, especialmente en cultivos de naranja dulce, utilizando tanto pruebas serológicas como moleculares. Los trabajos indican alta incidencia del CTV con porcentajes que varían entre el 80 y 100%. Los estudios serológicos y moleculares han determinado la presencia de algunos aislamientos suaves y otros severos (Guzmán et ál., 1993-1994; Peñaranda et ál., 1996; Oliveros et ál., 2001., Delgado et ál., 2004) incluyendo aislados con variantes virales tipo SP (Martínez, et ál., 2005), que representan una fuerte amenaza para la citricultura nacional. Algunas Limas Tahití (*Citrus aurantifolia*), especie reconocida como moderadamente susceptible a este virus, han sido evaluadas recientemente encontrando alta

incidencia del CTV y mezcla de variantes (Guzmán et ál., 2006; Guzmán y Rodríguez, 2007).

El objetivo del presente trabajo fue ampliar las herramientas de diagnóstico y de discriminación de aislados de CTV provenientes de Lima Tahití y de Calamondino (Ca) que son especies cítricas poco estudiadas en nuestro país e interesantes para la exportación (LT), utilizando diferentes aproximaciones serológicas, moleculares-hibridación, evaluando también la disposición celular del CTV y el efecto del mismo en la estructura celular, por medio de microscopía de luz y electrónica.

Metodología

Material vegetal

Se utilizaron aislados de 8 árboles de Lima Tahití de 8 años de edad injertados en patrón de mandarina Cleopatra, y recolectados en la Corporación Colombiana para la Investigación Agropecuaria (Corpoica Meta), y dos plantas ornamentales de Calamondino, mantenidas en macetas. Los árboles (LT) y las plantas (Ca) presentaban síntomas de acanalamiento de tallo (SP) (figura 1). Se colectaron ramas del contorno y hojas jóvenes. Como controles se emplearon muestras de plantas cítricas obtenidas en invernadero a partir de semilla –control negativo C-: Mandarina (*Citrus reticulata*) libre de CTV–, y como controles positivos se utilizaron aislados colombianos de CTV: B128 (severo), B272 y B274 (suaves) mantenidos y donados por la colección de Bestville Maryland USA. Se debe aclarar que en estudios previos los aislados LT y los 2 Ca se reportaron como positivos para variantes SP utilizando la sonda específica marcada con digoxigenina (B3A) que detecta variantes severas de CTV tipo Madeira que ocasionan SP en naranjos y toronjas (Guzmán y Rodríguez, 2007).

Pruebas serológicas

Se utilizó modificación de la técnica de inmunopresión (IMI) reportada por Garnsey



Figura 1. Síntoma de SP manifestado por las Limas Tahití de campo e injertadas sobre patrón de mandarina Cleopatra (A) y SP en planta de Calamondino (B)

et ál. (1993) y Guzmán et ál. (2001), a partir de impresiones de pecíolos sobre membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm . En resumen, se utilizó una solución de BSA al 5% en PBS-Tween para bloquear los sitios inespecíficos durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Para la detección viral se utilizaron los anticuerpos monoclonales 3CA5 + 3DF1 (1:1000) (donados por Pedro Moreno) disueltos en buffer ECI (Agdia) por 3 horas. El anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (Goat anti Rabbit AP Sigma®) se utilizó en dilución 1:10000 en buffer ECI, durante 1 hora. Los lavados se realizaron con PBS-Tween por 3 min. El revelado se realizó con Nitro Blue Tetrazodium/Bromo Cloro Indol Fosfato (NBT/BCIP). La localización del virus se determinó bajo estereoscopio (40X) (Konus®), por la coloración violeta resultante de la reacción fosfatasa alcalina-sustrato.

La técnica Elisa-DAS se realizó siguiendo protocolos de Cambra et ál. (1989), y Guzmán et ál. (2002). Básicamente, las muestras se maceraron en buffer de extracción (Agdia) en relación 1:10 (p/v). El sobrenadante se empleó como antígeno y el anticuerpo policlonal SP6 (donado por G. Nolasco) en dilución 1:1000 en buffer de cubrimiento (ECI Agdia) como anticuerpo primario. Como anticuerpo secundario se utilizó el MCA13 en relación 1:1000 en buffer (ECI Agdia) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se empleó GAM (Goat

anti Mouse AP Sigma®) en dilución 1:10000 como anticuerpo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, y el sustrato para-nitro-fenil-fosfato (1mg/ml) (Sigma®). Las densidades ópticas (DO) de las muestras por duplicado de la reacción enzimática se midieron a 405 nm a los 90 min y 16 horas en lector de Elisa Biorad®.

Microscopía de luz y electrónica

Se realizaron cortes transversales semifinos (4 μm de grosor aproximadamente, a mano alzada) de las mismas secciones de pecíolos empleadas en IMI; estos cortes se tiñeron con Azure A según Christie y Edwardson (1977), y se revisaron en microscopio de luz (Nikon Labophot-2). Para microscopía electrónica se obtuvieron cortes ultrafinos (60 nm de grosor) de pecíolos embebidos en resina Epón-araldita, los cuales se montaron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo 1% y citrato de plomo Reynolds, se revisaron en microscopio electrónico (Jeol EM-BGM-1).

IC-RT-PCR y RT-PCR

Se realizó una IC-RT-PCR en un solo tubo según lo reportado en Nolasco et al., (1993) y Guzmán et ál. (2001-2002), empleando el anticuerpo SP6. Brevemente, se utilizaron extractos de las plantas LT y Ca en buffer de

extracción, se incubaron por 12 horas, se lavaron con PBS-Tween y se aplicó el mix de RT-PCR, utilizando 10 pmol de cebadores forward (CTV1) y reverse (CTV10) específicos para la amplificación del gen de la proteína mayor de la cápside (CPG-p25) de CTV reportados en Nolasco et ál. (2002), con enzimas MMLV (200 U Fermentas®) y Taq (2.5 U Fermentas®), MgCl₂ (2,5 mM), DTT (100 mM), dNTPs (10 mM), Buffer PCR 10X, a un volumen final de 25 µl con 35 ciclos de amplificación.

Para el RT-PCR se utilizó extracción de dsRNA con fenol cloroformo y purificación con columna de Sephadex (Guzmán et ál., 1994), tomando 10% (v:v) del extracto de dsRNA viral para realizar la amplificación en un solo tubo, con los mismos cebadores y mezcla para amplificación por RT-PCR ya indicada para la reacción de IC-RT-PCR. En estudios previos se utilizó la sonda (B3A) específica para SP de CTV tipo Madeira sobre productos de PCR del CPG-p25 marcado con dUTP digoxigenina (Guzmán y Rodríguez, 2007) basados en los informes Cevik et ál. (1996) de PCR bidireccional y PCR asimétrica de Nolasco et ál. (2002) para detectar variantes suaves y severas del virus, y mezclas en los aislados.

Hibridación in situ

Se obtuvieron cortes transversales de pecíolo de LT, Ca y C-, y se realizaron impresio-

nes en membrana de nitrocelulosa, las cuales fueron tratadas según Kanemitsu y Koji (2000); brevemente, fijación en paraformaldehído 4% y HCl 0,2 M, formamida 40% en 4xSSC, e hibridación con una sonda marcada con digoxigenina, específica para el reconocimiento del gen de la proteína de cápside mayor (p25) de CTV, obtenida mediante PCR utilizando los cebadores CTV42 y CTV43 informados en Nolasco et ál. (2002). La hibridación se realizó durante toda la noche a 50 °C y la membrana se lavó 3 veces con formamida al 50% en 2XSSC para limpiar residuos inespecíficos. El bloqueo se realizó con suero bovino fetal (BSA, Sigma) al 5% en PBS, durante una hora. Luego se expuso la membrana al anticuerpo antidigoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (1: 1000 Roche ®) en buffer ECI (Agdia). El revelado se realizó con el sustrato NBT/BCIP.

Resultados y discusión

Las LT se detectaron como positivas para la infección con CTV por la sencilla y rápida técnica IMI con grados variables de intensidad, es decir, que algunos cortes de pecíolo de hojas del entono del árbol presentaban más acúmulos virales y otras menos (figura 2).

Con el anticuerpo monoclonal MCA13 (técnica ELISA-DAS) discriminante de aislados severos de suaves con un 95% de confiabilidad, se determinó positividad con un rango de

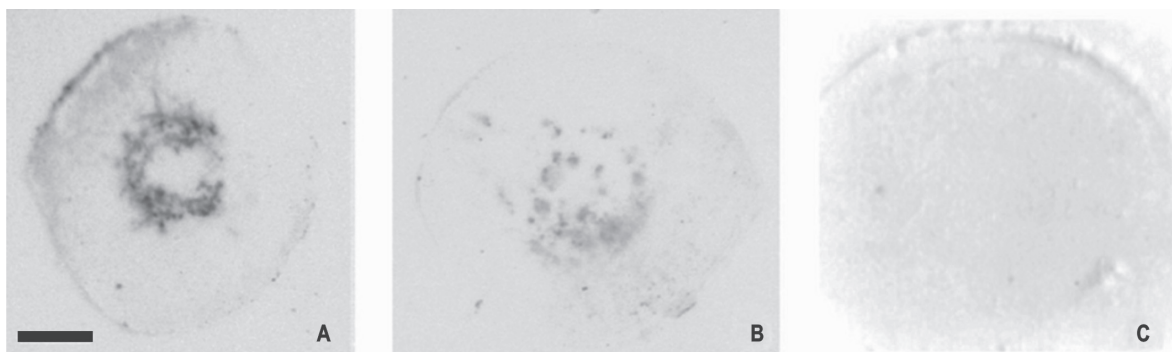


Figura 2. Inmunoimpresiones de cortes transversales de pecíolo de Lima Tahití y Calamondino. Las regiones oscuras indican positividad al CTV. A) Lima Tahití; B) Calamondino con diferentes niveles de infección. C) control negativo. Barra = 1mm

DO entre 0,600 y 1,5, densidades que fueron 2 veces superiores a la DO presentada por el control negativo (DO = 0,150) (tabla 1). Los aislados controles positivos para CTV B272 y B274 fueron negativos para este anticuerpo (DO = 0,200) confirmando la condición de aislados suaves, como bien se conoce por su expresión de síntomas en plantas indicadoras, mientras que el aislado severo B128, que produce SP en Toronja, tuvo una OD = 1,2 positiva para el anticuerpo MCA13. Es decir, que los aislados de las LT y de los Ca están conformados por variantes de CTV de tipo severo, que pueden expresar en campo diferentes síntomas severos dependiendo de las condiciones ambientales y del huésped. Es de anotar que las LT utilizadas presentaban en campo una sintomatología de SP, que es considerada como severa en la medida en que reduce el vigor de la planta, el tama-

ño del fruto y la producción. De igual manera, en la corteza de los Ca se observó SP, como se muestra en la figura 1.

Los cortes observados en microscopía de luz con la tinción Azure A permitieron detectar la presencia de inclusiones citoplasmáticas de coloración azul en todo el tejido conductor, conformadas por acumulaciones de proteínas virales o partículas virales. Mediante la IMI se comprobó que las regiones reconocidas por el colorante Azure A corresponden a regiones positivas al CTV a través de la detección con los anticuerpos monoclonales 3CA5 + 3DF1, teniendo en cuenta que el corte de tejido analizado por Azure A fue el mismo que se imprimió en la membrana de nitrocelulosa (figura 3).

En el presente trabajo se encontraron algunas inclusiones, aumento de vacuolas y célu-

Tabla 1. Elisa-DAS. Densidades ópticas obtenidas con anticuerpo MCA13

Aislado	MCA13 DO	IMI	Resultado MCA13
LT1	1,223	2	Positivo muy alto
LT2	1,239	2	Positivo muy alto
LT3	1,244	2	Positivo muy alto
LT4	1,432	2	Positivo muy alto
LT5	0,534	2	Positivo muy alto
LT6	1,336	3	Positivo muy alto
LT7	1,357	3	Positivo muy alto
LT8	1,061	2	Positivo muy alto
Ca1	1,510	3	Positivo muy alto
Ca2	1,804	3	Positivo muy alto
C-	0,150	0	Negativo
C+B128	1,200	3	Positivo muy alto
C+B272	0,200	2	Negativo
C+B274	0,200	2	Negativo

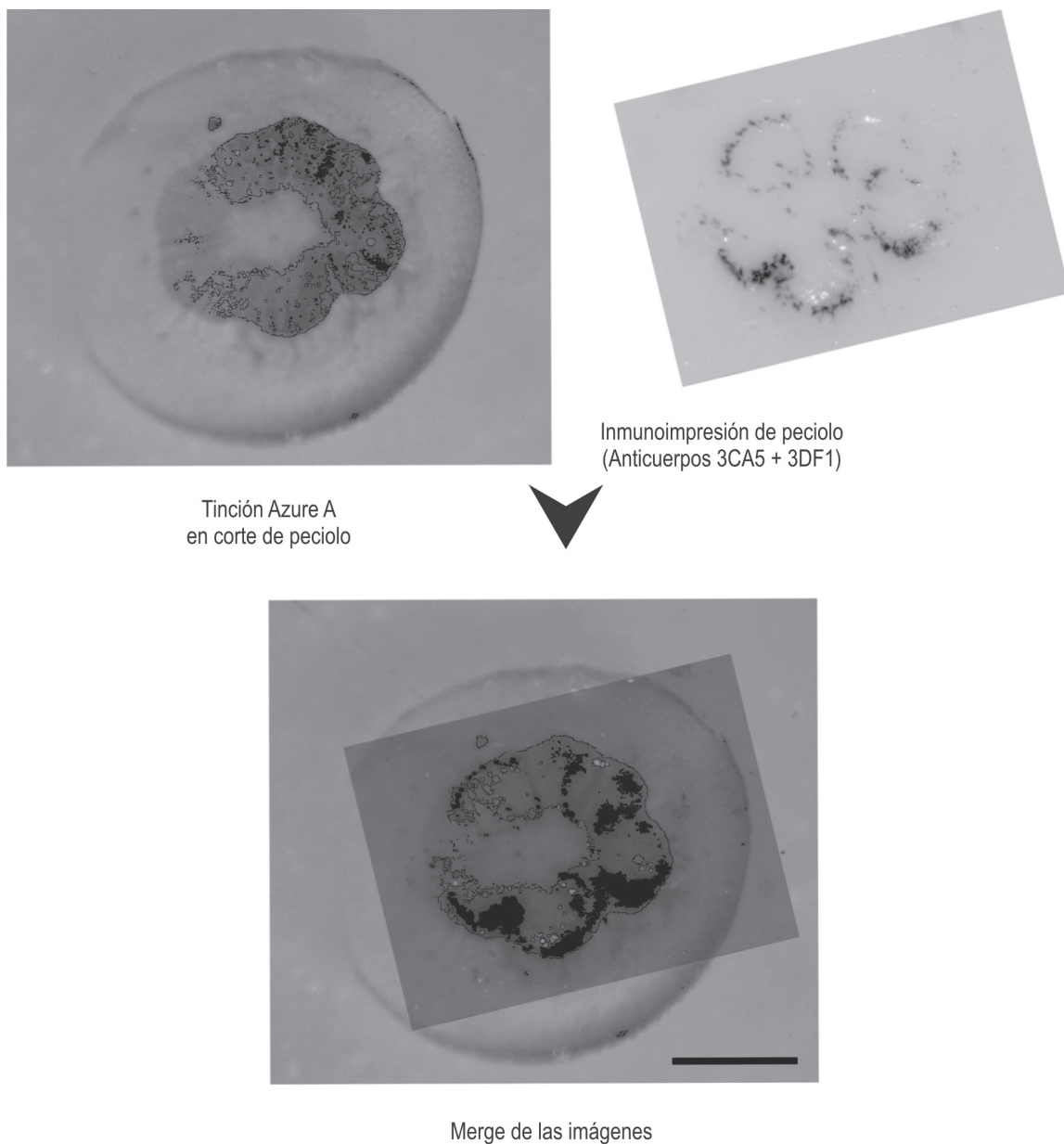


Figura 3. Detección de inclusiones citoplasmáticas por microscopía de luz con tinción Azure A, y comprobación mediante IMI. Nótese que en la sobreposición de las imágenes las regiones coloreadas presentan correspondencia con los sitios detectados serológicamente por los anticuerpos 3CA5+3DF1. Barra = 1 mm.

las colapsadas en los campos analizados en el microscopio electrónico que no se observaron en el control negativo (figura 4).

La amplificación positiva por IC-RT-PCR del gen de la proteína mayor de la cápside de CTV con un fragmento de 679 pb aproxima-

damente se muestra en la figura 5. Por medio de RT-PCR se obtuvieron resultados similares sobre las mismas muestras (la imagen no se incluye), demostrando reproducibilidad de la amplificación del GPC de LT y Ca, en las dos metodologías. Existiendo cebadores específicos para la detección de variantes de CTV suaves y

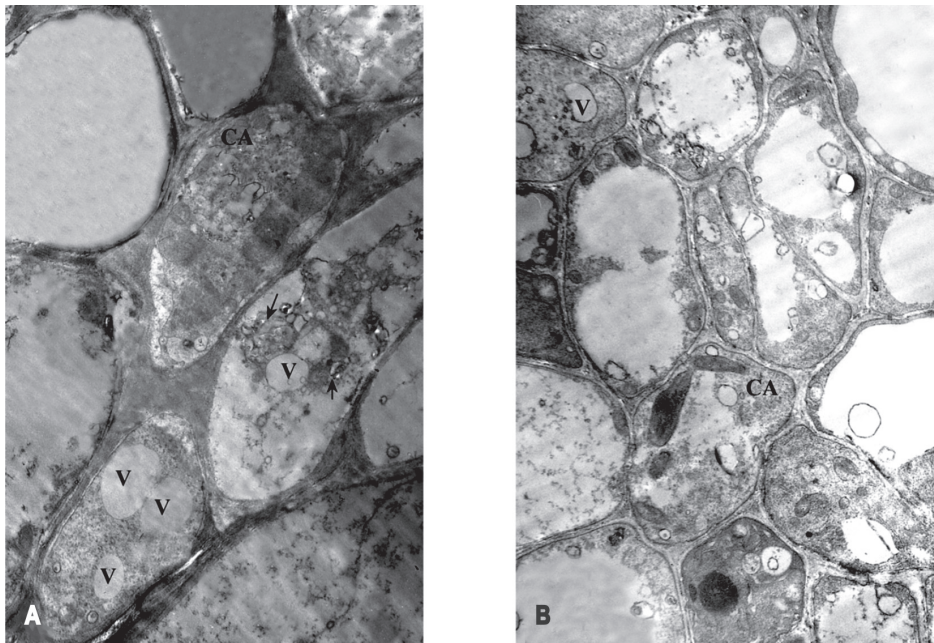


Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión de **A)** Lima Tahití infectada con CTV y **B)** Mandarina (*Citrus reticulata*) obtenida de semilla y libre de CTV. Las flechas indican las inclusiones y las células colapsadas. Barra: 5 micras; CA: Célula acompañante; V: vacuola.

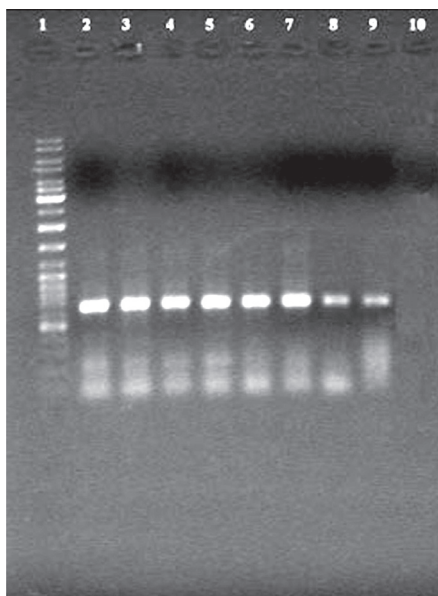


Figura 5. Amplificación por IC-RT-PCR del gen de la proteína mayor de la cápside de aislados de Lima Tahití (carriles 2, 3, 4, 5) controles positivos (carriles 6 y 7) (B128 y B272 respectivamente), Calamondinos (carriles 8 y 9), control negativo (Carril 10). Migración en gel de agarosa 1%. Tinción con bromuro de etidio. Marcador de peso gen ruler 1 kb (Fermentas®)

severas, estos cebadores se pueden utilizar ya sea con la técnica de PCR bidireccional (Cevik et ál., 1996) o con la técnica de IC-RT-PCR en un solo tubo para obtener dos bandas de tamaño diferente en la migración de fragmentos en el gel de agarosa.

Con la hibridación *in situ* empleando una sonda marcada con digoxigenina, sintetizada para detectar el gen de la cápside de CTV a partir de los cebadores CTV específicos (CTV 42 y 43), se identificaron regiones de hibridación en los vasos conductores en los cortes de pecíolo (figura 6).

Las diferentes técnicas utilizadas en este trabajo de tipo serológico (IMI, Elisa-DAS), moleculares (IC-RT-PCR, hibridación *in situ*) y ópticas (microscopía de luz y microscopía electrónica), permitieron detectar al CTV en los aislados de Lima Tahití mantenidos por Corpoica-Meta, y en las plántulas de Calamondino. El uso conjunto de estas metodologías es interesante, algunas de ellas son propuestas de implementación original como la hibridación *in situ* y el “merge” o sobreposición entre el resul-

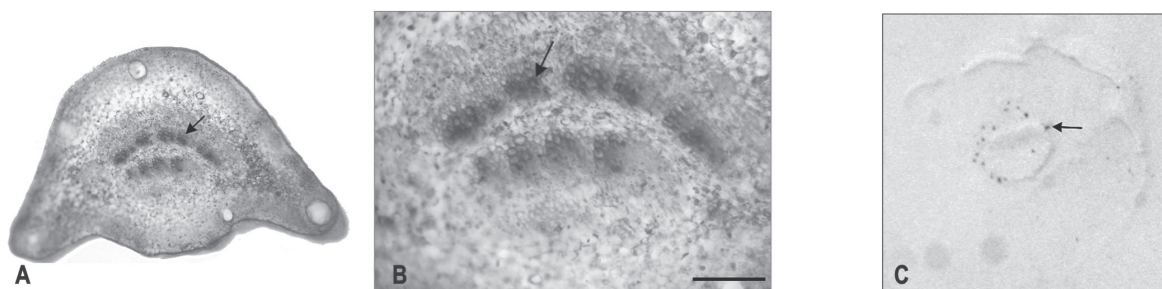


Figura 6. Hibridación *in situ*. A y B) localización del CTV en cortes de peciolo de Calamondino 1 (Barra = 500 μ m). C) localización del CTV sobre membranas impresas con tejido (Barra = 1 mm). Las flechas indican las señales de hibridación.

tado de Azure A y detección con anticuerpos (IMI) que permitieron el diagnóstico y la visualización del CTV tanto en algunos aspectos biológicos de localización viral en el tejido *in situ* (microscopía, IMI, hibridación *in situ*, serología) como en algunos aspectos bioquímicos como la amplificación y detección del gen de la proteína de la cápside por IC-RT-PCR, e hibridación *in situ*, debidos a la infección con el CTV. Es importante mencionar que los aislados utilizados en este trabajo tenían expresión de SP y se había informado previamente la detección de variantes SP severa utilizando sondas CTV específicas (B3A). Entonces, puesto que ya se conocía la presencia de variante SP en estos aislados, no era el interés ahondar en este aspecto sino presentar otras propuestas metodológicas simples para la detección del CTV. Tanto en LT como en Ca, se estableció la presencia de variantes de tipo severo al usar el anticuerpo monoclonal discriminante MCA13, que como ha sido reportado es un anticuerpo que discrimina entre variantes severas y suaves del CTV con un 95% de confiabilidad. Hay que tener en cuenta que la detección con este anticuerpo es a “grosso modo”, es decir, que incluye la positividad a todas las variantes sintomáticas severas de CTV como son SP o SY o QD, las cuales pueden estar presentes en un mismo aislado. A partir de los resultados de severidad utilizando anticuerpos anti CTV, y las técnicas IMI y de Elisa-DAS, se prosiguió a realizar las metodologías para la detección viral por microscopía, sobre muestras de peciolo positivas y severas

para la infección por CTV. Con la tinción con Azure A y con la observación bajo microscopía de luz se pudo visualizar un gran campo de inclusiones citoplasmáticas a nivel del floema y de las células acompañantes típicas de la localización del CTV, que es una partícula viral que se limita a la zona de vascularización (floema) de la planta. Sin embargo, con esta tinción no se pudo delimitar cuáles regiones corresponden a la presencia de inclusiones virales y cuáles pueden corresponder al virus o a otro tipo de restos de la planta. Por tanto, al utilizar de manera original la superposición del mismo tejido expuesto a tinción con Azure A, y expuesto a anticuerpos anti CTV sobre la sección impresa en membrana de nitrocelulosa por la técnica IMI, se determinó que no existe una completa correspondencia entre los tejidos detectados por las dos técnicas, y que los anticuerpos delimitan más la localización espacial en el tejido de las inclusiones virales. Una posible razón sería que IMI solamente está detectando las regiones en las cuales está presente la cápside viral, puesto que los anticuerpos empleados están dirigidos a esta proteína específicamente, mientras que para la tinción con Azure A se reporta que la unión de este colorante se realiza frente a acumulaciones de nucleoproteína localizadas en los haces vasculares, por tanto la detección pudo ser más amplia o, por otro lado, más inespecífica incluyendo fragmentos propios de la planta. De otra parte, por microscopía electrónica en los microcortes de peciolo se observaron vacuolas gigantes e inclusiones

que hacen parte de las malformaciones citopáticas informadas con esta infección, y para los efectos citoplasmáticos de otros virus (Ecale Zhou et ál., 2002, Brlansky et ál., 2002). Las técnicas utilizadas miden aspectos diferentes por lo que no son exactamente comparables entre sí pero pueden servir, individualmente o en conjunto, para estudios investigativos o de diagnóstico viral. IMI es altamente sensible y sencilla, y aunque cualitativa, permitió un rastreo rápido de la infección en el órgano-pecíolo analizado, ubicando claramente la acumulación viral en las zonas correspondientes al floema, con correspondencia con aquellas con la tinción Azure A. La técnica Elisa-DAS proporcionó información cuantitativa del título viral en el tejido, en la medida en que se utilizó la misma muestra para realizar Elisa, IMI, IC-RT-PCR. La hibridación *in situ* y la microscopía electrónica son útiles para estudios morfológicos o de expresión de genes virales durante la infección (Ecale Zhou et ál., 2002; Borlido et ál., 2002; Takeshita et ál., 2004). Es bastante posible que estas metodologías se puedan utilizar en propuestas investigativas o de diagnóstico para otras especies virales utilizando los cebadores y anticuerpos virus específicos requeridos.

Conclusiones

La tinción con Azure A permite localizar “inclusiones virales” en el floema y células asociadas, pero con poca claridad sobre la presencia de las acumulaciones virales en los haces vasculares; por tanto, de manera original, para la detección específica del CTV en el floema en este trabajo se utilizó de una parte microscopía de luz y tinción con Azure de los cortes transversales de pecíolo continuando con la superposición “merge” de imágenes de la misma sección expuesta a anticuerpos anti CTV a través de la técnica serológica de “tissue printing” o inmunopresión. De otra parte, la sonda específica de hibridación utilizada, derivada de secuencias del gen de la proteína mayor de la cápside del CTV, permitió reconocer de manera original la especificidad de infección con CTV en las células de floema y acompañantes de los cortes de

pecíolo. Es decir, que la sonda reconoció en los viriones “parcialmente descubiertos” secuencias del gen de la proteína de cápside impresas en las membranas de nitrocelulosa que mostraron correspondencia de localización en el floema de la planta. Sobre los cortes transversales de pecíolo realizados con micrótopo se detectaron con microscopía electrónica los cambios en la estructura y ultraestructura celular, con presencia de grandes vacuolas debidas a la infección con este fitopatógeno confirmando los resultados de la literatura sobre vacuolización para otros cítricos infectados por el virus. Las metodologías utilizadas en conjunto por primera vez, algunas de manera original, son sencillas y permiten observar la localización y la distribución viral dentro de la planta infectada, y pueden ser útiles para detección de otras especies virales. Se señala la importancia de las técnicas serológicas y de amplificación por IC-RT-PCR para la detección viral rápida y masiva. Según nuestro conocimiento es la primera vez que se realiza la detección del CTV en plantas ornamentales y en Lima Tahiti utilizando este conjunto de técnicas –serológicas, moleculares y ópticas–, las cuales no son per se comparables entre sí por cuanto evalúan aspectos bioquímicos y biológicos distintos, y se pueden utilizar independientemente ya sea para efectos de investigación básica o de diagnóstico de plantas únicas (microscopía electrónica, hibridación *in situ*, Azure A y serología) o de diagnóstico masivo (serología, IC-RT-PCR, hibridación *in situ*). En Colombia, la Lima Tahiti es una especie interesante para la exportación, y es poco lo que se ha estudiado con relación a la susceptibilidad al CTV. También es poco lo que se sabe sobre los efectos del CTV en cítricos ornamentales como los calamondinos, que se utilizan en los bancos de germoplasma, viveros y cultivadores como patrones de injerto a pesar de ser reservorios del CTV incluyendo variantes de tipo severo, lo que puede potenciar la expresión de síntomas severos. Es importante continuar estudios de diferente orden (serológicos, moleculares, biológicos y de microscopía) para ampliar la caracterización de cepas virales y vislumbrar estrategias futuras de control viral.

Agradecimientos

Las autoras expresan sus agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia (DIB, Instituto de Biotecnología, y al Laboratorio de Microscopía) por la financiación del presente trabajo; al doctor Javier Orduz y a Corpoica-Meta por la colaboración con las muestras cítricas; al doctor G. Nolasco de la Universidad de Algarbe, Portugal, por la donación del anticuerpo SP6; al doctor S. Garnsey por la donación del anticuerpo MCA13, y al doctor Pedro Moreno por la donación de los anticuerpos 3CA5 + 3DF1.

Referencias bibliográficas

- Acosta, O., Alegría, A., Guzmán, M., Lee, R., Niblett, C., Peñaranda, J. 1994. El Virus de la Tristeza de los Cítricos: una grave amenaza para la citricultura colombiana. Bogotá: Ed. Científica.
- Aubert, B., Etienne, J., Cottin, R., Leclant, F., Cao Van, P., Villaume, C., Jaramillo, C., Barneau, G. 1992. Citrus tristeza virus a new threat for the Caribbean basin. Report of a survey to Colombia, Dominican Republic, Guadeloupe, Martinique and Trinidad. *Fruits* 3: 393-404.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R. F. 1989. The continuous challenge of Citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27: 292-316.
- Borlido, J., Pereira, S., Ferreira, R., Coelho, N., Duarte, P., Pissarra, J. 2002. Simple and Fast *In Situ* Hybridization. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 219-229.
- Brlansky, R. H., 1987. Inclusion Bodies produced in citrus spp. by citrus Tristeza virus. *Phytophylactica* 19: 211-213.
- Brlansky R. H., Lee, R. 1990. Numbers of inclusion bodies produced by mild and severe strains of citrus tristeza virus in seven hosts. *Plant Disease* 74: 297-299.
- Brlansky, R. H. 1991. Detection of citrus tristeza virus inclusion bodies using azure A staining and *in situ* immunofluorescence. In: *Grtaf-Transmissible diseases of citrus*. Handbook for detection and diagnosis. Roistacher editor. California: University of California, Riverside, USA IOCV, FAO. Rome.
- Brlansky, R. H., Howd, D. S., Broadbent, P., Damsteegt, V. D. 2002. Histology of Sweet Orange Stem Pitting Caused by an Australian Isolate of Citrus tristeza virus. *Plant Disease* 86:1169-1174.
- Brlansky, R. H., Roy, A., Damsteegt, V. D. 2004. Aphid transmission of stem pitting citrus tristeza virus from mixed virus infections. *Phytopathology* 94:100.
- Broadbent, P., Brlansky, R. H., Indsto, J. 1996. Biological characterization of australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by aphid transmissions. *Plant Disease* 80: 329-333.
- Cambra, M., Camarasa, E., Gorrís, M., Garnsey, S., Carbonell, E. 1991. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV specific monoclonal and polyclonal antibodies. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, pp. 38-45.
- Cambra M., Ballester-Olmos J. F., Pina J. A., Lavina A., Camarasa E. 1989. Distinction of populations infected with severe and common strains of the citrus tristeza virus in Spain, by the ELISA-DASc (quantitative). *Fruits* 44: 335-41.
- Cambra, M., Moreno, P. 2000. Tristeza. En: Duran-Vila, N., Moreno, P. 2000. *Enfermedades de los Cítricos: Monografía de la sociedad fitopatológica española No. 2*. Madrid: Ediciones Mundi.
- Cevik, B., Pappu, S. S., Pappy, H. P., Benschler, D., Irey, M., Lee, R. F., Niblett, C. L. 1996. Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: detection and strain differentiation. In: *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus virologists*. Riverside: IOCV. University of California, pp. 17-24.
- Christie, G. G., Edwardson, J. R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. Ser.* 9.
- Delgado, J., Guzmán, M., Caicedo, A., Ordúz, J. 2004. CTV screening of Colombian germplasm banks kept in Palmira (Valle del Cauca) and Villavicencio (Meta) and preliminary estimation of CTV variants by RFLP and SSCP. 44 Meeting of the American Phytopathological Society Caribbean Division. La Habana, mayo 24-28. *Memorias*.
- Derrick, K. S., Timmer, V. 2000. Citrus blight and other diseases of recalcitrant etiology *Annual Review of Phytopathology* 38: 181-205.
- Ecale Zhou, C. L., Ammar, E. D., Sheta, H., Kelley, S., Polek, M., Ullman, D. E. 2002. Citrus tristeza virus ultrastructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia*. *Canadian Journal of Botany* 80:512-525.

- Febres, V. J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K. L., Lee, F. R., Niblett, C. L. 1996. The P27 Protein is present at one end of citrus tristeza particle. *Phytopathology* 86:1331-1335.
- Garnsey, S. M., Permar, T. A., Cambra, M., Henderson, C. T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza. In: Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, pp.30-50.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C. L., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M. R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., Dawson, W. O. 2000. The p20 gene product of citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274:246-254.
- Guzmán-Barney, M., Manjunath, K. L., Pappu, S., Pappu, H., Febres, V., Lee, R., Niblett, C. 1993. Characterization of coat protein genes of citrus tristeza strains from Colombia. *Phytopathology* 83: 1403.
- Guzmán-Barney, M., Manjunath, K. L., Pappu, S., Pappu, H., Febres, V., Lee, R., Niblett, C. 1994. Comparación de secuencias del gen de la proteína de la cápside de aislamientos colombianos del virus de la tristeza de los cítricos. *Revista Fitopatología Colombiana* 18: 107-113.
- Guzmán, M., Caro, M., García, Y. 2001. Técnica de inmunopresión en membranas de nitrocelulosa: una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PLRV, PVX, PVY y PVS que infectan a la papa *Solanum spp.* *Revista Colombiana de Biotecnología* 4: 45-51.
- Guzmán, M., Bermúdez, Y., Castro, C. 2001. Identificación del YMMV en muestras de *Disocorea alata* de la Costa Atlántica colombiana. Caracterización biológica, serológica y molecular. *Revista Colombiana de Biotecnología* 3: 72-79.
- Guzmán, M., Vernière, C., Niblett, C., Bové, J. M. 2002. Biological, Serological and molecular characterization of two CTV isolates from Corsica. In: Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, pp. 158-164.
- Guzmán, M., Rodríguez, P., Ordúz, J., Nolasco, G. 2006. Ponencia: Situación del virus de la tristeza de los cítricos en Limas colombianas (Mexicana y Tahití) -Una aproximación molecular. 46 Meeting of the American Phytopathological Society- Caribbean Division. Y XXVIII Congreso ASCOLFI. Memorias CD. Septiembre 12-16.
- Guzmán, M., Rodríguez, P. 2007. Uso de sondas específicas para la detección rápida de variantes y mezclas del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en aislados de campo. II Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical. La Habana. Abstract, CD. Septiembre 17-21.
- Kanemitsu, Y., Koji, T. 2000. *Molecular Histochemical Techniques*. Germany: Springer.
- Karasev, M., Boyoko, V., Gowda, V., Nikolaeva, O., Hilf, M., Koonin, M., Niblett, C., Cline, K., Gumpf, D., Lee, R., Garnsey, S., Levandowsky, D., Dawson, W. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Kitajima, E. W., Silva, D. M., Oliveira, A. R., Müller, G. M., Costa, A. S. 1964. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature* 201: 1011-1012.
- Lbida, B., Bennani, A., Serrhini, M. N., Zemzami, M. 2005. Biological, serological and molecular characterization of three isolates of *citrus tristeza closterovirus* introduced into Morocco EPPB BULLETIN 35: 511.
- Martínez, S., Guzmán, M., Oliveros, O., Acosta, O. 2005. Secuenciación de la proteína de la cápside de dos aislados colombianos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). XXVI Congreso Ascolfi. Bogotá. Memorias.
- Martínez, S., Guzmán, M. 2007. Serological analysis of Colombian Citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* 97: S175.
- Naranjo, M. 1997. Reseña bibliográfica sobre la enfermedad tristeza de los cítricos. *Levante Agrícola* 3: 227-240.
- Nikolaeva, O., Karasev, A., Powell, Ch., Garnsey, S., Lee, R. 1997. Modulation of the antigenic reactivity of the citrus tristeza virus coat protein *Journal of Immunological Methods* 206: 97-105.
- Nikolaeva, O., Karasev, A., Garnsey, S., Lee, R. 1998. Serological differentiation of the citrus tristeza virus causing stem pitting in sweet oranges. *Plant Disease* 82: 1276-1280.
- Nolasco, G., Blas, C. D., Torres, V., Pons, F. 1993. Method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods* 45: 201-218.
- Nolasco, G., Squeira, Z., Soares, C., Mansinho, A., Bailey, A., Niblett, C. L. 2002. Asymmetric PCR ELISA: Increased sensitivity and reduced costs for the detection of plant viral and other nucleic acids. *European Journal of Plant Pathology* 108: 293-298.
- Oliveros, O., Torres, J., Morales, G., Guzmán, M., Acosta, O., Peñaranda J. 2001. Two common haplotypes of

- the CPM gene(p27) in Colombian field isolates of the citrus tristeza virus. In: Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, Abstracts.
- Pappu, H., Pappu, S., Niblett, C., Lee, R., Civerolo, E. 1993. Comparative sequence analysis of the coat proteins of biological distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 7: 225-264.
- Peñaranda, J., Acosta, O., Guzmán, M., Alegría, A., Manjunath, K., Lee, R., Niblett, C. 1996. Biological and molecular characterization of mild and severe isolates of CTV from Colombia. In: Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, pp. 71-76
- Permar, T., Garsey, S., Gumpf, D., Lee, R. 1990. A monoclonal antibody that discriminate strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80: 224-228.
- Rai, M. 2006. Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (*CTV*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Molecular Biology* 61: 399-414.
- Roberts, I. M., Harrison, B. D. 1979. Detection of potato leafroll and potato mop-top viruses by immunosorbent electron microscopy. *Annals of Applied Biology* 93: 289-297.
- Roistacher, C. N., Moreno, P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus a review. In: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, pp. 7-19.
- Schneider, H. 1957. The Anatomy of Tristeza virus Infected Citrus. *Proc. Conf Citrus Virus Disease* 18-22.
- Takeshita, M., Shigemune, N., Kikuhara, K., Furuya, N., Takanami, Y. 2004. Spatial analysis for exclusive interactions between subgroups I and II of Cucumber mosaic virus in cowpea. *Virology* 328: 45-51.
- Tsai, M., Hsu, H. 1991. Development and characterization of monoclonal antibodies to Citrus tristeza virus (CTV) strains in Taiwan. In: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, pp. 46-50.
- Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Perez de San Roman. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for Citrus tristeza virus: and their use for diagnosis. *Journal of General Virology* 67: 91-96.
- Zemzami, M., Hill, J., Van Deusen, R., Nadori, E. 1993. Characterization of monoclonal antibodies raised against Citrus tristeza virus in Morocco. In: Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus virologists. Riverside: IOCV. University of California, pp. 93-99.