



NAPPO

North American Plant Protection Organization
Organización Norteamericana de Protección a las Plantas
MEXICO - USA - CANADA

PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO DE LA NAPPO

PD 01

Virus tristeza de los cítricos (Citrus Tristeza virus - CTV)

Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas
1431 Merivale Road, 3rd. Floor, Room 140
Ottawa, Ontario, Canadá, K1A 0Y9
19 de marzo de 2013

Índice

Página

Revisión	3
Aprobación	3
Implementación	3
Registro de enmiendas	3
Distribución	3
1. Información de la plaga	4
1.1 Transmisión	4
2. Información taxonómica.....	5
3. Detección e identificación	5
3.1 Plantas hospedantes	5
3.2 Síntomas	5
4. Riesgo de dispersión de la plaga.....	6
5. Métodos para la detección e identificación	7
5.1 ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas	7
5.2 Inmunoimpresión- ELISA.....	15
5.3 Técnicas biológicas	16
6. Registros	18
7. Puntos de contacto para información adicional	18
8. Referencias	19

Revisión

Los Protocolos de Diagnóstico de la NAPPO están sujetos a revisiones y enmiendas periódicas. La fecha de la próxima revisión de este Protocolo de Diagnóstico de la NAPPO es en el año 2018. De solicitarlo un país miembro de la NAPPO, se pueden llevar a cabo revisiones de cualquier Protocolo de Diagnóstico de la NAPPO en cualquier momento.


Aprobación

El presente Protocolo de Diagnóstico fue aprobado por el Comité Ejecutivo (CE) de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO) el 19 de marzo del 2013 y entrará en vigor a partir de esta fecha.

Aprobado por:



Greg Wolff
Miembro del Comité Ejecutivo
Canadá



Rebecca A. Bech
Miembro del Comité Ejecutivo
Estados Unidos



Javier Trujillo Arriaga
Miembro del Comité Ejecutivo
México

Implementación

No aplica.

Registro de enmiendas

Las enmiendas a este protocolo serán fechadas y archivadas en la Secretaría de la NAPPO.

Distribución

La Secretaría de la NAPPO distribuye esta norma a los Miembros Asociados, al Grupo Consultivo de la Industria y, la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) y a otras Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria (ORPF).

1. Información de la plaga

El citrus tristeza closterovirus (CTV) es la causa de una de las enfermedades económicamente más importantes de los cítricos. El CTV probablemente es originario de Asia y fue diseminado por material propagativo infectado a muchos de los países productores de cítricos. Posteriormente, la dispersión por áfidos vectores causó epidemias en el siglo XX. Millones de árboles plantados en naranjo agrio se han perdido por la variante de “declinamiento” en muchos países, incluyendo Estados Unidos, España, y Brasil. Los portainjertos tolerantes ó resistentes pueden ser afectados por las razas de picado de tallo, mismas que causan reducción de la producción o calidad (Bar-Joseph et al. 1989; Garnsey et al. 1998, Lee y Bar-Joseph 2000).

El CTV probablemente está presente en todos los países citrícolas, aunque la incidencia es muy variada. El CTV es usualmente detectado en árboles aislados y no es aún considerado epidémico en muchos países como Albania, Argelia, Chipre, Egipto, Francia, Grecia, Italia, Jordania, Líbano, Libia, Marruecos, Palestina, Portugal, Siria, Túnez y Turquía y en algunos países de América Central y del Sur como Belice, Chile, Ecuador, El Salvador, Honduras, México y Nicaragua. El CTV causa la enfermedad viral más dañina de los cítricos. En Argentina, durante su aparición en 1945, provocó la muerte de aproximadamente 10 millones de árboles y para 1959 esta cifra aumentó a 18 millones. En Brasil se reportaron más de 10 millones de árboles perdidos en 1958. En España, durante la década de los sesenta y en Venezuela en los años ochenta murieron 16 millones de árboles (Rocha-Peña et al. 1995).

En México, el CTV se detectó por primera vez en 1983 en el Estado de Tamaulipas y en 1986 en Veracruz; ambos brotes fueron eliminados oportunamente. Sin embargo, posteriormente el virus fue reportado en otros estados de la República mexicana.

Desde el año 1939, esta enfermedad ha sido observada en California, Estados Unidos. Las observaciones realizadas por Halma, Smoyer y Schwalm (1944, 1945) indicaron que “quick decline” reportado de California era similar a la enfermedad “tristeza” reportada en Brasil. Fawcett y Wallace (1946) simultáneamente con Meneghini (1946) en Brasil reportaron que la tristeza era causada por un virus. Se puede concluir que esta raza virulenta de tristeza ocasionó la muerte de al menos 3 millones de árboles en California. En Florida, Grant y Schneider (1951) reportaron por primera vez la presencia de CTV aunque sin duda existió muchos años antes de su identificación. Las razas de tristeza identificadas en el estado de Florida son diferentes de las razas presentes en California. En Texas, Olson y Sleeth (1954) y Olson y McDonald (1954) encontraron unos árboles de limón ‘Meyer’ infectados con tristeza. Limón ‘Meyer’ también fue el hospedante del primer reporte del estado de Arizona (Carpenter 1956).

1.1 Transmisión

El CTV puede transmitirse fácilmente por injerto y de manera semipersistente por una de varias especies de áfidos incluyendo *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), *T. aurantii* (Boyer de Fonscolombe), *Aphis gossypii* (Glover) y *A. spiraeicola* (Patch) (Moreno et al. 2008). La eficiencia de la transmisión por áfidos puede ser afectada por el donador o receptor, por el aislamiento del virus y su habilidad para replicarse en un hospedante dado, por las especies del vector, por su biología y por factores hortícolas y de medio ambiente. El vector más eficiente es el áfido *T. citricida* Kirkaldy (pulgón café); sin embargo, la transmisión por otras especies de áfidos es suficientemente eficiente para causar la

dispersión de CTV con un impacto económico significativo (Rocha-Peña et al. 1995). *T. citricida* fue detectado en febrero del 2000 en la parte norte de los estados de Quintana Roo y Yucatán. Actualmente, se ha detectado en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Puebla y Campeche. En los Estados Unidos, *T. citricida* ha sido reportado en Florida pero no en California, Arizona o Texas. Se han realizado investigaciones exhaustivas sobre la epidemiología de CTV en diferentes áreas cítricas y cómo está influenciada por factores como el áfido, hospedante y aislamiento de virus (Gottwald et al. 1999). Se han desarrollado y probado técnicas para el monitoreo y la predicción de patrones y rangos de dispersión (Hughes et al. 2001). En general, una vez que el rango de infección alcanza 0.1% a 0.5%, el grado de infección se incrementa rápidamente y se dificulta el control con la eliminación de árboles. En áreas con dispersión natural activa, el nivel de infección excederá lo determinado por las pruebas, debido a que algunas infecciones recientes no podrán detectarse. No se ha demostrado que el CTV se transmita por semilla. Se han reportado muchas especies de cítricos y géneros relacionados con rutáceas (subfamilia Aurantioideae) como hospedantes de CTV; sin embargo, los trifoliados (*Poncirus trifoliata*) y muchos de sus híbridos son resistentes a CTV.

2. Información taxonómica

El CTV es un miembro de la familia Closteroviridae y tiene el binomial de Closterovirus citrus tristeza virus. El patógeno es un virión flexible de aproximadamente 2000 x 11 nm. El genoma del CTV es de cadena sencilla de ácido ribonucleico (ARN) de sentido positivo y no segmentado, con un tamaño de 20 Kb. Los estudios realizados sobre las propiedades moleculares del CTV han revelado que este es de un grupo complejo de virus. Se han reconocido tres grupos principales de genotipos del virus con algunas variantes entre ellos. La recombinación entre los diferentes genotipos y el hecho de que un simple aislamiento "puro" es en realidad poblaciones de variantes de RNA, incrementan aún más su complejidad (Rubio et al. 2001).

Se han establecido relaciones entre las reacciones biológicas y varios marcadores genéticos. Sin embargo, hasta la fecha no se han establecido determinantes moleculares específicos de patogenicidad para el declinamiento o el picado de tallo (Nikolaeva et al. 1998, Hilf y Garnsey 2000, Moreno et al. 2008)

3. Detección e identificación

3.1 Plantas hospedantes

Los hospedantes naturales de CTV esencialmente incluyen especies del género *Citrus* y *Fortunella*, pero la infección se ha detectado en géneros relacionados con el de *Citrus* que se han inoculado experimentalmente como *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hesperthusia*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* y *Swinglea*. También se lograron inoculaciones experimentales en especies no cítricas como *Passiflora gracilis* y *Passiflora coerulea* por medio del áfido vector (Moreno et al. 2008).

3.2 Síntomas

Los diferentes aislamientos del CTV varían ampliamente en los síntomas que provocan en los diferentes hospedantes cítricos. Algunos son extremadamente ligeros en daño, otros causan daño medio de acuerdo a la sensibilidad del hospedante, algunos son severos en hospedantes específicos y en otros son benignos y algunos pueden causar

reacciones muy severas en un amplio rango de hospedantes. Los aislamientos diferentes pueden tener un amplio rango de severidad en algunos hospedantes, mientras que el mismo aislamiento puede variar en la expresión de los síntomas en diferentes hospedantes. La inoculación por injerto en un rango de plantas indicadoras se utiliza comúnmente para el desarrollo del perfil de las propiedades biológicas del CTV y para predecir una posible severidad en hospedantes comerciales (Garnsey et al. 2005). Los síntomas comunes del CTV incluyen aclaramiento de nervaduras, achaparramiento, clorosis, varios tipos de picado de tallo y clorosis de plántulas (Moreno et al. 2008).

Los aislamientos del CTV y la fenología de los síntomas pueden ser categorizados como sigue: i) declinamiento o razas de declinamiento rápido, las cuales inducen un colapso de los cítricos injertados en portainjertos (patrones) de naranja agria; ii) razas moderadas (o débiles) que son asintomáticas en cítricos cultivados en portainjertos tolerantes o resistentes al CTV; iii) razas de amarillamiento de plántulas las cuales provocan achaparramiento y clorosis en plántulas de naranja y toronja o limón Eureka indexadas con el virus y bajo condiciones de invernadero (generalmente considerados para indicar razas severas); iv) razas de picado de tallo que inducen picaduras moderadas a severas en la corteza y en la madera adyacente de ramas y troncos de naranja dulce, toronja y mandarina independientemente de su portainjerto.

Esencialmente existen dos enfermedades de CTV comercialmente importantes en cítricos. Una es la clásica tristeza o declinamiento que está asociada con un declinamiento de árboles injertados en naranja agria, causados por un virus que induce necrosis del floema en la unión de la yema (Figuras 1a y 1b). La variante de declinamiento ha causado pérdidas serias en muchas áreas de cultivo de cítricos, incluyendo California, representando aún una amenaza pasiva a la industria citrícola debido a que la naranja agria es el portainjerto principal. El CTV que induce declinamiento puede disminuirse con el uso de portainjertos tolerantes o resistentes en lugar de naranja agria; sin embargo, el uso de estos portainjertos puede originar la aparición de otras enfermedades y problemas hortícolas (Moreno et al. 2008).

La segunda enfermedad principal de CTV es la que induce picado de tallo. A diferencia del declinamiento, el picado de tallo puede reducir el vigor y la producción del injerto, independientemente de su portainjerto. Algunos portainjertos pueden verse afectados por aislamientos de picado de tallo incluso cuando el injerto no lo esté. Los aislamientos de picado de tallo del CTV han causado pérdidas serias en muchas áreas citrícolas (Moreno y Garnsey 2005; Rocha-Peña et al. 1995).

4. Riesgo de dispersión de la plaga

El CTV puede diseminarse a distintas áreas citrícolas dentro de un mismo país o bien, a distintos países en el mundo como consecuencia de la propagación por injerto y la consecuente transmisión del virus por esta vía, aunado a la dispersión por medio del vector.

5. Métodos para la detección e identificación

El CTV puede detectarse con indexación biológica y varios métodos no biológicos incluyendo microscopía óptica y electrónica, serología y una variedad de técnicas moleculares. Estas últimas, incluyen varios tipos de reverso transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que incluyen inmunocaptura-PCR con múltiples marcadores moleculares (MMM) (Hilf et al. 2005) y PCR en tiempo real (Ruiz-Ruiz et al. 2009), análisis con SSCP (Rubio et al. 1996), oligosondas (Narvaez et al. 2000), análisis de RFLP (Gillings et al. 1993). Las siguientes técnicas son las aprobadas por la NAPPO: indexado biológico, ELISA y ELISA- inmunopresión.

Es importante considerar que la toma de muestra para detectar CTV en material propagativo debe realizarse cuando los períodos de brotación coinciden con los meses menos cálidos (cuando la temperatura media mensual es alrededor de los 27 °C y con poca fluctuación durante el año). En el caso de México, cuando se desea movilizar plantas, se realiza el muestreo independientemente de la temperatura que se tenga. Cada muestra consiste en brotes de 10-15 cm de cinco árboles, tomados de los cuatro cuadrantes del árbol. En caso de que las plantas sean muy pequeñas y no presenten brotes, se pueden utilizar pecíolos.

En California, donde las temperaturas ambientales son más variables que las de México, la concentración de CTV es muy baja en los meses de invierno y verano (cuando las temperaturas son extremas) en la mayoría de las regiones. La época ideal para detectar CTV es entre abril y junio u octubre/noviembre. Esto permite que las pruebas se realicen cuando la concentración es alta, lo cual resulta en diagnósticos más confiables (Dodds et al. 1987).

5.1 ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas)

Para la detección del CTV, se emplea la técnica serológica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) que está basada en la capacidad de ciertas proteínas, conocidas como anticuerpos, para reconocer y enlazar un antígeno específico asociado con el patógeno. Es una técnica confiable y rápida para la detección de fitopatógenos. Se han desarrollado algunas variantes, pero hasta el momento el método directo de DAS-ELISA (double antibody sándwich) es el más utilizado (Salazar 1990). Esta técnica consiste en la absorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno en la que posteriormente se añade el antígeno que reacciona con los anticuerpos adheridos a la placa, complementado con la adición de un conjugado enzimático (segundo anticuerpo) para formar el complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

La especificidad de los anticuerpos monoclonales y su facilidad de comercialización (por ser homogéneos y estables), aunado a las ventajas que ofrece la técnica como sensibilidad, bajo costo, rapidez, fiabilidad y capacidad de uso masivo, han favorecido que la técnica ELISA sea utilizada en todos los países citrícolas para la detección de CTV, utilizando anticuerpos monoclonales que son capaces de reconocer a cualquier aislado del virus sin reacción alguna con componentes de la planta hospedante.

5.1.1. Procedimiento

Se podrán utilizar los anticuerpos desarrollados por Nikolaeva et al. (1995) y/o Lee et al.(2005) (anticuerpos primarios CREC 1052, CREC 27, CREC 28, CREC 29, CREC 30, o CREC 31 y el anticuerpo secundario G604), comúnmente usados en California. Los kits comerciales para CTV de Agdia y de BioReba son utilizados en México.

En los Estados Unidos, se utilizan dos técnicas distintas: una por el Citrus Clonal Protection Program (CCPP) usando los anticuerpos de Gumpf y la otra utilizada por el Germplasm Repository (NCGRCD) usando los anticuerpos de Lee et al. (2005).

5.1.1.1. Procedimiento del Citrus Clonal Protection Program (CCPP) (Clark y Adams 1977, modificado para tristeza por J.M. Díaz de CCPP)

A. Preparación de la muestra

1. Colectar ramitas tiernas de los cuatro cuadrantes del árbol (o de ocho cuadrantes en el caso de árboles en peligro de infección en el campo).
2. Desprender la corteza de las ramitas, estimar cerca de 1.0 g y cortar en trocitos de 1-2 mm.
3. Preparar las muestras a 1:10 (p/v) en amortiguador de extracción, usando el pulverizador de tejido de KLECO o el Ultra T25 Tissumizer de Turraz¹.

Amortiguador PBS	
NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2.17 g
KCl	0.2 g
NaN ₃	0.2 g
Ajustar el pH a 7.4, 1 L de H ₂ O.	

Amortiguador PBS-Tween: Amortiguador PBS + Tween 20 2 ml/L

Amortiguador de Extracción: Amortiguador PBSTween + 20 g/L PVP40 polivinylpirrolidona (Sigma)

4. Las muestras pueden congelarse y descongelarse antes de cargar la placa. Esto ayuda a bajar el fondo de densidad óptica (recomendado pero no requerido).

B. Preparación de placas de ELISA²

1. Colocar 200 µL de γ -globulina en amortiguador de cobertura a cada pozo de la placa. Incubar por 4 horas a 37°C. La concentración normal es 1–2 µg/mL. La concentración óptima debe determinarse por diluciones limitantes.

Amortiguador de cobertura	
Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g
Ajustar el pH a 9.6, en 1 L de H ₂ O	

2. Lavar la placa con PBS-Tween. Dejarla reposar durante 3 minutos. Repetir el lavado 3 veces, vaciando la placa cada vez.

¹ Fabricante: Kleco Tissue Pulverizar, 14097 Ave 272, Visalia, CA 93292, 559-732-3785 o Tissuemizer, Ultra Turraz T25, Janke & Kunkel

² Placas de Microtiter: Immulon IV Flat plates, Fisher #14245153 (50 plates/pack)

- C. Adición de la muestra
1. Colocar alícuotas de 200 µl de las muestras a los pozos por duplicado. Incubar a 6 °C por toda la noche o 37 °C por 4 horas.
 2. Lavar la placa 3 veces como en el paso B.2 y lavar la placa 3 veces con agua destilada, lo cual ayuda a bajar el fondo de densidad óptica.
- D. Adición de anticuerpo secundario y conjugado
1. Colocar alícuotas de 200 µl del anticuerpo secundario [de acuerdo a los Drs. A y O Karasev (Nikolaeva et al. 1995)] a cada pozo a la dilución óptima predeterminada. Incubar a 37 °C por 4 horas. Usar el amortiguador conjugado para este paso. Amortiguador de conjugado enzimático: Amortiguador PBS-Tween + 20 g/L PVP40 polivinylpirrolidona + 2 g/L ovalbumin (Sigma A-7030)
 2. Lavar la placa 3 veces como en paso B.2.
 3. Colocar alícuotas de 200 µl de conjugado comercial (Sigma A-8025 Anti-Rabbit Igl Alkaline Phosphatase Antibody, desarrollada en cabras), lo cual generalmente tiene una dilución de ~1:8,000 a ~1:10,000. Incubar a 37 °C por 4 horas.
- E. Adición de sustrato (P-nitrofenilfosfato disodio, Sigma S-0942, pastillas de 5 mg)
1. Lavar la placa 3 veces como en paso B.2.
 2. Colocar alícuotas de 200 µl de sustrato recién preparado a una concentración de (0.6 – 1.0 mg/ml) de p-nitrofenilfosfato en amortiguador de sustrato.

Amortiguador de sustrato	
Dietanolamina	97.0 mL
NaN ₃	0.2 g
Ajustar el pH a 9.8, en 1 L de H ₂ O.	

- F. Evaluación de la placa
1. Incubar a temperatura ambiente hasta que se observe la reacción. El tiempo de reacción es normalmente ~ 30 minutos.
 2. Evaluar los resultados para medir la absorbancia a 405 nm en el lector de placas³. Las muestras son consideradas positivas cuando éstas son dos veces la densidad óptica (DO) del control negativo (testigos sanos)..

5.1.1.2. Procedimiento del *Germplasm Repository* (NCGRCD)

A. Selección y preparación de muestras

A1. Muestras de corteza

1. Colectar ramitas tiernas y maduras (frescas y verde oscuro) de los cuatro lados del árbol. La corteza debería poderse remover fácilmente en este tipo de tejido.
2. Colocar los brotes de cada árbol en una bolsa plástica etiquetada. Mantener las muestras en hielo si tardará más de algunos minutos antes de procesarlas.
3. En el laboratorio desprender la corteza de cada brote colectado.
4. Estimar cerca de 0.25 g de corteza y cortar en trocitos de 1-2 mm.
5. Vaciar el tejido en un tubo de 50 ml y agregar 5 ml de amortiguador de cobertura.
6. Licuar cerca de 15 segundos usando un homogenizador de tejido tipo polytron.
7. Para maximizar la extracción, almacenar a 4 °C durante la noche antes de colocar las muestras en la placa de ELISA.

³ Lector de placas de ELISA: Molecular Devices EMax

Método alternativo:

1. Estimar cerca de 0.20 g de tejido y corte en trocitos de 1-2 mm.
2. Colocarlos en un tubo de centrifuga de 2 ml con tapa de rosca, agregar 2 esferas y llenar el tubo (1.5 ml) con amortiguador de cobertura.
3. Homogenizar por 5 minutos en un agitador de esferas.
4. Para maximizar la extracción, almacenar a 4 °C durante la noche antes de colocar las muestras en la placa de ELISA.

Las nervaduras centrales o los pecíolos de las hojas también pueden ser usados en estos procedimientos.

Amortiguador de cobertura	
Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
Ajuste a pH 9.6 con HCl, en 1 Lt H ₂ O.	

A2. Muestras de hojas

1. Colectar dos hojas de cada uno de los cuatro lados del árbol. Deben ser hojas completamente expandidas del último flujo de crecimiento.
2. Enrollar una hoja de cada lado del árbol usando un rodillo de hojas . Colectar la savia en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Guardar las otras cuatro hojas como muestra de reserva.
3. Centrifugar por 5 minutos.
4. Pipetear 200 µl del sobrenadante en un tubo y diluir en 800 µl de amortiguador de cobertura. Mezclar bien pipeteando la solución para arriba y para abajo.

Extracción directa usando tejido de tallo de brotes tiernos.

1. Después del paso 4 (lavado), llenar todos los pozos de muestra de la placa con 200 µl de alícuota de amortiguador de cobertura conteniendo Tween-20 al 0.1%.
2. Cortar el tallo en trozos de 1-2 mm con tijeras de podar.
3. Colocar las piezas de tejido directamente en los pozos llenos con el amortiguador.
4. Incubar durante la noche a 4°C.

B. Preparación de los controles

Para BSD-ELISA el uso de controles preparados con glicerol almacenados a -20 °C es preferible para efectos de estandarización (Lee et al. 2005). Un control sano (CTV -) y un control positivo (CTV +) son incluidos en el kit de detección. Estos controles están listos para cargar en los pozos alrededor de la placa de ELISA. Alícuotas de 100 µl son cargadas en las pozos que han sido llenados previamente con 100 µl de amortiguador de cobertura + Tween-20 al 0.2%.

Alternativamente, se pueden preparar controles positivos y negativos de tejido liofilizado, seco o fresco. En este caso, usar cerca de 50 mg de tejido seco en 5 ml de amortiguador de cobertura. Dejar que el tejido seco se hidrate tanto como sea posible (hasta 24 horas antes de homogenizar). Se recomienda hidratar los controles temprano en la mañana, macerarlos al final de la tarde e incubar el extracto durante toda la noche a 4 °C con las muestras candidatas.

C. Preparación de las placas de ELISA

1. Cubrir las placas de ELISA con anticuerpo policlonal (preparado de IgG CREC27, CREC28, CREC31, CREC1051 o CREC 1052). Diluir el antisuero con amortiguador de cobertura a la concentración indicada en el tubo (usualmente 1:5,000). Adicionar 200 µl

del antisuero diluido a cada una de las pozos de la placa excepto a los pozos sin cobertura de anticuerpos; usualmente se dejan dos pozos como control negativo (sin anticuerpos) (pozos A11 y A12). Incubar 1 a 3 horas a temperatura ambiente ó toda la noche a 4°C. (Cuando se realiza la incubación por toda la noche, se puede usar una dilución mayor del antisuero de cobertura. Por ejemplo, si realiza el paso a temperatura ambiente, usar una dilución de 1:5000, si incuba toda la noche en el frío, usar una dilución de 1:10,000).

D. Lavado

1. Retirar la solución de la placa y lavar tres veces bajo un chorro de agua desionizada.
2. Llenar la placa con PBST, y dejar por 5 minutos o más (usualmente se deja 30 minutos en el primer lavado).

PBST	
NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g (anhidro)
KCl	0.2 g
Ajuste a pH 7.4 usando HCl, 1 Lt.	
Agregue 1 ml de Tween 20	

3. Repetir los pasos 1 y 2, dos veces.
4. Repetir el paso 1.
5. Invertir la placa y limpiar sobre una toalla de papel el exceso de agua inmediatamente antes del paso siguiente. Asegurarse que la placa no se seque.

E. Muestras

1. Llenar todos los pozos de la placa con 100 µl de amortiguador de cobertura conteniendo Tween-20 al 0.2%.
2. Agregar 100 µl de muestras usando dos pozos por muestra. Mezclar con el amortiguador en el pozo pipeteando varias veces.
3. Incubar durante la noche a 4 °C.
4. Lavar la placa siguiendo el procedimiento aquí descrito.

F. Anticuerpo secundario.

1. Diluir inmediatamente el anticuerpo secundario G-604 a 1:20,000 en amortiguador conjugado⁴.

Amortiguador conjugado (500 ml)	
PBST	500 ml
PVP-40	10.0 g
BSA (Albúmina de suero bovino, Fracción V).	1.0 g

2. Agregar 100 µl de esta solución a los pozos de la placa.
3. Incubar por 1 hora a 37 °C, o durante la noche a 4 °C.
4. Lavar la placa siguiendo el procedimiento descrito.

⁴ Cada lote de G-604 debe ser calibrado haciendo una serie de diluciones.

G. Conjugado

1. Diluir anticuerpo de conejo anti-cabra conjugado con fosfatasa alcalina a la dilución recomendada en el tubo (usualmente 1:30,000) en amortiguador de conjugado.
2. Agregar 100 µl de esta solución a los pozos de la placa.
3. Incubar por 3 horas a 37 °C o durante la noche a 4 °C.
4. Lavar la placa siguiendo el procedimiento descrito.

H. Reacción

1. Agregar 0.6 a 1.0 mg/ml de sustrato (4-nitrofenil fosfato hexahidrato) al amortiguador de cobertura. Asegurarse que el amortiguador sea de reciente preparación, que haya sido preparado usando NaN_3 o que tenga sólo unos pocos días almacenado a 4 °C.
2. Agregar 200 µl a cada pozo.
3. Incubar a temperatura ambiente.
4. Leer la placa después de una o dos horas, y/o durante la mañana siguiente. El color usualmente se revela muy lentamente. Para calibrar, colocar el lector de placas sobre el pozo del control negativo (sin anticuerpos). Esto restará la absorbancia de luz causada por la placa y por los amortiguadores. En este pozo no deberá desarrollarse una reacción inespecífica significativa durante el desarrollo del revelado de la placa durante la noche. Si este es el caso, el anticuerpo secundario debe diluirse un poco más.

I. Evaluación.

1. Primero evaluar los controles. El control negativo (sin anticuerpos) no debe dar ninguna reacción porque el lector está ajustado a cero en estos pozos. Una reacción en el pozo sin anticuerpos indica un lavado incorrecto de la placa después del paso del conjugado, preparación no apropiada de los amortiguadores o pérdida de especificidad de los antiseros contra el antígeno.
2. No es raro que los pozos con amortiguador solo den alguna reacción, a veces más que los controles negativos (sin anticuerpos).
3. Los pozos de controles negativos no deben de mostrar reacción o mostrarla muy baja.
4. Una buena placa ("buena corrida") mostrará un valor de OD405 alrededor de 0.050 para los testigos sanos y valores sobre 1.000 para los controles positivos. En este caso la muestra es considerada positiva si el valor promedio de OD es más de 0.100. Las diluciones de anticuerpos deberán ser ajustadas cuando valores mayores sean obtenidos para los controles negativos o cuando se obtengan valores más bajos para los controles positivos.

Nota: Para todos los protocolos, el volumen final de reacción en cada paso es el mismo; en este caso, 100 µl.

5.1.1.3. Procedimiento utilizado con el kit comercial de Agdia.

1. Preparación de la muestra

- a. Desprender la corteza de cada brote⁵ de la muestra colectada. Pesar 0.2 g de corteza y corte en trocitos de 1-2 mm.
- b. Vaciar el tejido a un tubo de 50 ml y agregar 2 ml de amortiguador de extracción.

⁵ Nervaduras centrales o pecíolos de hojas también pueden usarse en la detección.

Solución amortiguadora de extracción (macerado de muestras vegetales)	
Sulfito de sodio (anhidro)	1.3 g
Polyvinylpyrrolidona (PVP) Peso molecular de 24 - 40,000	20.0 g
Azida de sodio	0.2 g
Albúmina de huevo (pollo) en polvo, Grado II	2.0 g
Tween-20	20.0 g
Disolver en 1 lt de solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBST)	

Nota: Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2). Almacenar a 4°C en refrigeración

- c. Licuar cerca de 15 segundos usando un homogenizador de tejido.
 - d. Para máxima extracción, almacenar a 4 °C durante la noche antes de colocar las muestras en la placa de ELISA.
2. Preparación de las placas de ELISA
 - a. Sensibilizar la placa de poliestireno. Colocar 100 μ l en cada pozo de la dilución anticuerpo específico para CTV (Dilución 1:200⁶) más solución amortiguadora de cobertura tomando en cuenta el formato de distribución de muestras, considerando las muestras y testigos negativos y positivos con sus repeticiones.
 - b. Incubar en cámara húmeda 2 horas a 37 + - 2 °C o durante toda la noche a 4 °C.

Solución amortiguadora de cobertura	
Carbonato de sodio (anhidro)	1.59 g
Bicarbonato de sodio	2.93 g
Azida de sodio	0.2 g
Ajustar el pH a 9.6 (+/- 0.2). Almacenar a 4°C	
Disolver en 1 Lt de agua destilada	

3. Lavado de la placa
 - a. Lavar la placa de 3 a 5 veces⁷ con PSTB-T 1X

Solución amortiguadora de fosfatos (lavado) PBST	
Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de sodio, dibásico (anhidro)	1.15 g
Fosfato de potasio, monobásico (anhidro)	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Tween 20	0.5 g / ml
Disolver en 1Lt de agua destilada	
Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2), la solución de lavado puede prepararse concentrada y posteriormente diluirse. Preparar una concentración 20X (20 veces concentrada).	

4. Adición de la muestra

⁶ Dilución que generalmente se utiliza. Se recomienda atender las instrucciones del fabricante.

⁷ Tomar la placa y tirar su contenido en una tarja, sacudir con vigor en repetidas ocasiones sobre hojas de papel. Llenar cada uno de los pozos sensibilizados con el amortiguador de lavado, empezando por los de la primera línea, posteriormente la segunda y así sucesivamente, hasta cubrir todos los necesarios, dejar reposar durante 1 minuto y tirar nuevamente el contenido de la placa, sacudir vigorosamente sobre el papel secante.

- a. Macerar u homogenizar la muestra vegetal con amortiguador de extracción. Adicionar 100 μ l por pozo del macerado, con sus repeticiones, en los pozos previamente seleccionados.
5. Preparación de los controles
 - a. Colocar en los pozos correspondientes a los testigos negativos 100 μ l por pozo de solución de extracción o control negativo comercial. Se recomienda no utilizar los pozos cercanos a los bordes ya que pueden desarrollar reacciones no específicas (Salazar 1990).
 - b. Diluir el testigo positivo y colocar 100 μ l de éste en los pozos.
 - c. Incubar en cámara húmeda durante 2 horas a 37 +/- 2°C o toda la noche a 4 °C.
 - d. Lavar la placa de 6 a 10 veces con PSTB-T 1X.
 6. Adición del anticuerpo + conjugado
 - a. Realizar una mezcla del anticuerpo monoclonal (Botella A) y el conjugado enzimático (Botella B) en amortiguador ECI en proporción 1:200⁸ para ambos antisueros. Depositar 100 μ l de esta mezcla en cada pozo y mantener la placa en cámara húmeda 2 horas a 37 +/- 2 °C.
 - b. Disolver en 1000 ml de solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBST):

Solución de conjugado (ECI)	
Albúmina de suero de bovino (BSA)	2.0 g
Polivinylpirrolidona (PVP) Peso molecular de 24-40,000	10.0 g
Azida de Sodio	0.2 g
Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2), almacenar a 4°C.	

- c. Lavar la placa de 6 a 10 veces.
7. Adición del sustrato.
 - a. Preparar la solución amortiguadora de sustrato de la enzima diluyendo el para-nitrofenil fosfato en amortiguador de extracción en una proporción de 1mg/ml (generalmente una pastilla/5ml).
 - b. Colocar 100 μ l en todos los pozos de trabajo, incluyendo los pozos objetivo e incubar en condiciones de oscuridad de 15 a 45 minutos.

Solución amortiguadora para PNP (revelado)	
Dietanolamina	97.0 ml
Azida de sodio	0.2 g
Ajustar el volumen final a 1 L con agua destilada estéril. Ajustar el pH a 9.8 con ácido clorhídrico. Almacenar a 4°C en refrigeración en frasco ámbar o envolver con aluminio para proteger de la luz.	

8. Evaluación de la placa
 - a. Encender y programar el lector de placas de ELISA.
 - b. Observar si hay coloración en los pozos. El cambio de color indica resultados positivos.
 - c. Leer en el lector de placas e imprimir la lectura del aparato.

⁸ Dilución que generalmente se utiliza. Se recomienda atender las instrucciones del fabricante.

- d. Interpretar los resultados y vaciarlos en la bitácora de registro de muestras del laboratorio, anotando la fecha emisión de respuesta. Capturar el resultado en base de datos.

Consideraciones

Para tener un diagnóstico con lecturas confiables, en la placa se incluirán los siguientes controles.

- Pozos no cubiertos
- Amortiguador de extracción
- Planta sana (testigo negativo)
- Planta enferma (testigo positivo)

En caso de contar con plantas infectadas con diferentes variantes de CTV, éstas podrán incluirse⁹ como control positivo. Deberá ser incluida un testigo negativo que corresponde a una planta sana de la misma especie. En ambos casos (controles positivos y negativos) deberán incluirse repeticiones.

Las lecturas positivas deben ser dos veces el valor del testigo negativo. Los resultados negativos deberán presentar valores de absorbancia similares a los controles negativos.

Si las muestras difieren de su repetición o presentan lecturas de 1.5 veces el valor del control negativo, deberá realizarse nuevamente el diagnóstico. Si el control positivo no reacciona apropiadamente, también debe ser repetido.

5.2 Inmunoimpresión- ELISA

La limitación más importante para la detección de CTV por ELISA convencional es la necesidad de preparar extractos de las plantas a diagnosticar. Por ello, se han desarrollado variantes como la inmunoimpresión-ELISA, que es una técnica que utiliza membranas de captura que no requieren la trituración y homogenización de las muestras, permitiendo el análisis de miles de muestras de forma sencilla y rápida (Cambra et al. 2000).

El proceso consta de cuatro etapas básicas y secuenciales:

1. Recolección e impresión de muestras de membrana.
2. Bloqueo de la membrana impresa y reacción.
3. Lavado
4. Revelado y lectura de resultados.

5.2.1. Procedimiento

1. Realizar cortes transversales u oblicuos en brotes¹⁰ tiernos, hojas, pedicelos o pedúnculos de frutos recién cuajados con instrumentos bien afilados.
2. Presionar los cortes de tejido con firmeza contra la membrana de nitrocelulosa de 0.45 m de poro, que se utiliza como inmunoabsorbente. Realizar dos impresiones por brote cortando de su base y de la parte más apical; así se realizarán 10 impresiones por árbol adulto. Incluir controles positivos y negativos.
3. Dejar secar la membrana unos minutos y conservarlas en ambiente seco y protegidas de la luz hasta su análisis.

⁹ Dos suaves y dos severas.

¹⁰ Se recomienda coleccionar brotes de 10-15 cm del material más joven que exista, dispuestos alrededor del árbol, preferiblemente de la parte mediana-alta de la copa ya que es la zona con mayor probabilidad de ser visitada por pulgones.

4. Bloquear los poros de la membrana (y el resto de la superficie) con una solución del 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en agua destilada. Las membranas deben permanecer a temperatura ambiente en la solución bloqueadora durante 1 hora o bien 16 horas si la operación se realiza a 4°C. Agitar levemente la membrana a fin de que quede perfectamente mojada y cubierta con la solución bloqueadora.
5. Sobre la membrana humedecida por la solución de albúmina, añadir una solución de anticuerpos monoclonales específicos de CTV, marcados con la enzima fosfatasa alcalina (0.1 mg/ml).
6. Incubar cubriendo bien las membranas con la solución durante 2 ó 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo de reacción, desechar la solución de anticuerpos conjugados.
7. Enjuagar la membrana¹¹ con amortiguador de lavado (PBS + Tween 20 al 0.05 %)
8. Añadir el sustrato (BCIP-NBT Sigma Fast Tablets)¹² específico de la enzima (10 tabletas en 100 ml de agua destilada). Cubrir las membranas ligeramente e incubar a temperatura ambiente hasta la aparición de precipitados de color violeta-púrpura.
9. Detener el revelado lavando las membranas con agua corriente, cuando los controles positivos hayan desarrollado color. Los precipitados aparecerán después de 3 -7 minutos de incubación a temperatura ambiente.
10. Tomar la lectura de las membranas que se puede realizar cuando ya estén secas. En muchos casos una primera lectura a simple vista es suficiente, pero debe hacerse con ayuda de una lupa o un microscopio de disección.

5.3 Técnicas biológicas

El indexado biológico es una técnica de diagnóstico que en condiciones óptimas garantiza un resultado preciso. El indexado biológico (bioindexado) para patógenos de cítricos se basa en la utilización de plantas indicadoras de especies de cítricos libres del patógeno, las cuales reaccionan ante la infección del virus, expresando diversos síntomas diferenciales según el patógeno y el aislamiento (Roistacher 1991). Cada muestra (yema ó vareta a analizar) se inocula en plantas indicadoras con repeticiones. Una planta sana no inoculada es usada como control negativo. Los controles positivos también pueden ser inoculados con diferentes aislamientos de virus que causan síntomas débiles a severos.

El indexado biológico requiere de condiciones ambientales apropiadas en un invernadero y de un mes a un año para evaluar los materiales probados, dependiendo del patógeno.

El bioindexado ha sido validado como una técnica confiable que permite identificar patógenos de cítricos en infecciones mezcladas, lo cual es muy común en el caso de cítricos (Vidalakis et al. 2004).

5.3.1. Procedimiento

Los procedimientos usados para el indexado biológico de CTV están bien establecidos (Roistacher 1991). Para el indexado biológico de CTV la planta indicadora recomendada es limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), el limón ácido de frutos pequeños. Las plántulas deben estar sanas (es decir, sin ningunas infecciones) con tallos de 4-10 mm de diámetro y 100 cm de crecimiento al momento de inocular. Las

¹¹ La etapa de lavado es esencial ya que permite eliminar todos los anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina que no hayan reaccionado. Así únicamente quedarán trazas de enzima sobre las secciones de material vegetal impreso que estuviera infectado por CTV.

¹² Nitroblue de tetrazolio y bromo cloro indolil fosfato (NBT+BCIP)

plántulas de limón mexicano pueden estar tres por maceta, cada maceta tendrá dos plántulas inoculadas y una sin inocular. La planta no inoculada sirve como testigo sano. Deben realizarse entre 4 y 8 repeticiones de cada árbol diagnosticado y al menos dos testigos positivos (un aislado débil, un aislado severo) para cada prueba.

De las plantas bajo prueba, tomar varetas de un mínimo de cuatro cuadrantes de cada árbol. En el caso de árboles del campo donde hay un peligro de infección, tomar varetas de ocho cuadrantes. Esto es muy importante en el caso de árboles de parcelas de fundación. Dos yemas deberán ser injertadas en cada planta indicadora. Es importante que el inóculo contenga tejido de floema y que el floema del inóculo y del indicador estén en contacto ya que el CTV está limitado al floema. Si se emplean discos de hojas, un mínimo de cinco a seis deberían ser utilizados por planta. Las navajas usadas para los injertos deberán ser desinfectadas entre muestra y muestra con una solución hipoclorito de sodio comercial al 10%. Inmediatamente después de hacer las inoculaciones, las plántulas deben ser cortadas a una altura de 20-25 cm.

Una vez inoculadas las plantas, se debe favorecer la expresión de síntomas manteniendo temperaturas de 24-28 °C (día) y 17-21 °C (noche) por un período de dos a cuatro meses. Después de dos semanas, quitar las bandas que cubren el injerto y registrar la supervivencia del inóculo. Los brotes laterales de las plántulas no deben podarse durante las primeras tres brotaciones (más o menos ocho semanas) para obtener la cantidad máxima de hojas para observar síntomas.

La mayoría de plantas inoculadas muestran síntomas en cinco semanas y casi todas en ocho semanas. El síntoma primario de tristeza es el aclaramiento de nervaduras en hojas juveniles y maduras. Este síntoma es evidente si se observa la hoja a contra luz. La mejor época para observar este síntoma es cuando la hoja ha terminado de incrementar su tamaño. En el caso de razas severas de tristeza (razas “amarillamiento de plántulas”), el aclareo de nervaduras puede progresar a nervaduras con un exudado corchoso (“vein corking”).

Otro síntoma característico de tristeza en limón mexicano es el acucharado de hojas. Se presenta en casos con condiciones muy buenas para indexado. Puede persistir en las hojas maduras. En cambio, el acucharado de hojas también es un síntoma de protuberancia venal (“vein enation”) en limón mexicano y por eso el acucharado de hojas no es suficiente para el diagnóstico de tristeza en la ausencia de otros síntomas. Después de ocho semanas, puede quitarse la corteza y observarse el picado de tallo con ciertas razas de tristeza. Sin embargo, el picado de tallo en limón mexicano se evalúa mejor removiendo los brotes laterales después de la tercera brotación (como a las ocho semanas) y entrenando a las plantas para que tengan un crecimiento apical. De esta forma, el picado de tallo puede ser evaluado de cuatro a seis meses de haberse inoculado la planta.

Las plantas indicadoras también pueden utilizarse para biocaracterizar las razas de CTV (Garnsey et al. 1987; Roistacher 1991). Además de la intensidad de la reacción de limón mexicano, puede evaluarse si son razas que causan el picado de tallo (figura 1g), amarillamiento de plántulas (figura 1h) ó declinamiento rápido. Todos estos síntomas indican una raza severa que puede producir consecuencias económicas.

Aunque distintas razas de tristeza pueden causar el picado de tallo o amarillamiento de plántulas en varias plantas indicadoras, la toronja ‘Duncan’ es la idónea para este uso. El naranjo agrio sirve como una indicadora adicional por amarillamiento de plántulas y

el naranjo dulce 'Madame Vinous' o 'Pineapple' mostrará si una raza causa el picado de tallo en variedades de naranja dulce. Así, para biocaracterizar diferentes razas de tristeza, se necesitan cinco plantas indicadores: limón mexicano (síntomas básicos, el picado de tallo); naranjo agrio (amarillamiento de plántulas, enanismo); agrio dulce (el picado de tallo, enanismo); toronja 'Duncan' (amarillamiento de plántulas, el picado de tallo, enanismo); y naranja dulce injertada sobre naranjo agrio (necrosis de floema, enanismo). Para esto, se establecen tres plantas por maceta de toronja y 1 de naranjo agrio. En el pasado las observaciones de declinamiento en naranja agria se realizaban en 2-3 años. Recientemente un método de diagnóstico más rápido ha sido desarrollado (Pina et al. 2005) donde una disminución del crecimiento de yemas de naranjo agrio, injertado en naranjo dulce 'Madam Vinous' que ha sido inoculado con una raza inductora de declinamiento, se ha correlacionado con aislamientos que inducen declinamiento.

6. Registros

Se debería mantener un registro de las muestras analizadas, el cual debería contener:

- Código o número de referencia de la muestra.
- Variedad y origen de la muestra.
- Descripción de síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes) o su ausencia de éstos.
- Métodos utilizados en el diagnóstico y los resultados obtenidos con cada método, incluyendo los controles (fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico)
- Nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico.

Los registros y las evidencias de los resultados del diagnóstico deberían retenerse por lo menos durante un año.

7. Puntos de contacto para información adicional

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Guillermo Pérez Valenzuela No. 127 Col. Del Carmen, Coyoacán, Del. Coyoacán, México, DF 04100.

Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo Km. 35.5 Carr. México- Texcoco CP. 56230 Montecillo, Edo. de México, México.

Citrus Clonal Protection Program, Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, CA 92521, EE.UU.

USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository for Citrus & Dates, 1060 Martin Luther King Blvd., Riverside, CA 92507, EE.UU.

8. Referencias

Bar-Joseph, M., R. Marcus y R.F. Lee. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27:291-316.

Cambra, M., M.T. Gorris, M. P. Román, E. Terrada, E. Camarasa, S. M. Garnsey, E. Camarasa, A. Olmos y M. Colomer. 2000. Routine detection of Citrus Tristeza Virus by Direct Immunoprinting-ELISA Method Using Specific Monoclonal and Recombinant Antibodies. Fourteenth OICV Conference. Pp. 34-41.

Carpenter, J.B. 1956. Identification of tristeza in Meyer lemon in Arizona. *Plant Disease Reporter* 40:8.

Clark, M.F. y A.N. Adams. 1977. Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.

Fawcett, H.S. y J.M. Wallace. 1946. Evidence of virus nature of citrus quick decline. *California Citrograph* 32:88-89.

Garnsey, S.M., D. J. Gumpf, C.N. Roistacher, E.L. Civerolo, R.F. Lee, R.M. Yokomi, M. Bar-Joseph. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19:151-157.

Garnsey, S. M., T.R. Gottwald y R.K. Yokomi. 1998. Control Strategies for Citrus Tristeza Virus (CTV). pp 639-658. En: *Plant Virus Disease Control*. A. Hadidi, R. K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds.) APS Press, St. Paul, MN.

Grant, T.J. y H. Schneider. 1951. Initial evidence of the presence of tristeza or quick decline of citrus in Florida. *Phytopathology* 43:51-52.

Gillings M.P., Broadbent, J. Indsto y R.F. Lee. 1993. Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 44:305-317

Gottwald, T.R., G. Gibson, S.M. Garnsey y M. Irey. 1999. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by stochastic modeling. *Phytopathology* 89:603-608.

Halma, F.F., K.M. Smoyer y H.W. Schwalm. 1944. Quick decline associated with sour rootstocks. *California Citrograph* 29:245.

Halma, F.F., K.M. Smoyer y H.W. Schwalm. 1945. Rootstock in relation to quick decline of citrus. *California Citrograph* 30:150-151.

Hilf, M.E. y S.M. Garnsey. 2000. Characterization and classification of Citrus tristeza virus isolates by amplification of multiple molecular markers, Pp. 18-27. En: *Proc. 14th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, CA*.

Hilf, M.E., V.A. Mavrodieva, y S.M. Garnsey. 2005. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* 95: 909-917.

Hughes, G., T.R. Gottwald, y S.M. Garnsey. 2001. Development of methods and models and their application to disease problems in the perennial citrus crop system. En: Jeger M.J. and Spence N.J. (eds). Biotic interactions in plant pathogen associations. CABI Publishing Wallingford, UK.

Lee, R.F. y M. Bar-Joseph. 2000. Tristeza. Pp 61-63. En: Compendium of Citrus Diseases. 2nd edition. Timmer, L.W., S.M. Garnsey, and J.H. Graham (editors). St Paul (MN): American Phytopathological Association.

Lee, R.F., M. G. H. Dekkers y M. Bar-Joseph. 2005. Development of stable, uniform antigen controls for use in ELISA assays for *Citrus tristeza virus*. Pp 127-136 En: Proc. 16th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.

Meneghini, M. 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade do doencia "tristeza" do citrus. O Biologico 15:115-118.

Moreno P.S y S.M. Garnsey. 2010. Citrus Tristeza Disease -A Worldwide Perspective. Pp.27-49 En: Karasev, A.V. y Hilf, M.E. (eds.). Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases. American Phytopathological Society Press.

Moreno P.S., Ambros, M.R. Albiach-Marti, J. Guerri y L. Pena. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology 9: 251-268.

Narvaez, G., B.S. Skander, M.A. Ayllon, L. Rubio, J. Guerri, y P. Moreno. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridization with digoxigenin-labelled cDNA probes. J. Virol. Methods 85:83-92.

Nikolaeva, O.V., A.V. Karasev, D.J. Gumpf, R.F. Lee, S.M. Garnsey. 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*: application for immunodiagnosis. Phytopathology 85:691-694

Nikolaeva O.V., A.V. Karasev, S.M. Garnsey y R.F. Lee 1998. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. Plant Dis. 82:1276-1280.

Olson, E.O. y J.R. McDonald. 1954. Tristeza in satsuma varieties in Texas. Plant Disease Reporter 38:439-441.

Olson, E.O. y B. Sleeth. 1954. Tristeza virus carried by some Meyer lemon trees in Texas. Proceedings of the Rio Grande Valley Horticultural Institute 8:84-88.

Rocha-Peña, M.A. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Plant Disease 79:437-445.

Roistacher, C.N. 1991. Graft-Transmissible Diseases of Citrus: Handbook For Detection And Diagnosis. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations.

Rubio, L., M.A. Ayllón, J. Guerri, H. Pappu, C.L. Niblett y P. Moreno. 1996. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand

conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol.* 129: 479-489.

Rubio, L., M.A. Ayllón, P. Kong, A. Fernandez, M. Polek, J. Guerri, P. Moreno y B.W. Falk. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J. Virology* 75:8054-8062

Ruiz-Ruiz, S., P. Moreno, J. Guerri y S. Ambrós. 2009. Discrimination between mild and severe Citrus tristeza virus isolates with a rapid and highly specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Phytopathology* 99:307-315.

Salazar, L. F. 1990. Metodología Para La Detección De Virus De Papa: Pasado, Presente Y Futuro. *Revista Latinoamericana de la Papa.* 3(1):1-12

Vidalakis, G., S.M. Garnsey, J.A. Bash, G.D. Greer y D.J. Gumpf. 2004. Efficacy of bioindexing for graft-transmissible citrus pathogens in mixed infections. *Plant Disease* 88:1328- 1334.



Fig. a. Declinamiento repentino

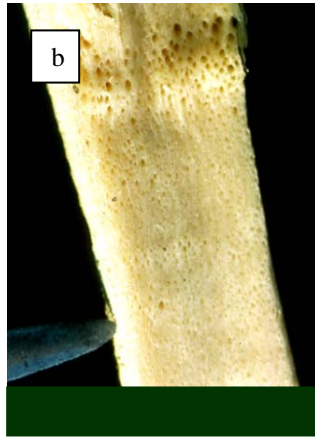


Fig. c. Acanaladura de la madera

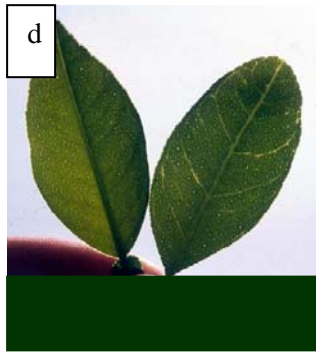


Figura 1.- Síntomas del Citrus Tristeza Colsterovirus, **a)** declinamiento de naranja dulce en portainjerto de naranja agria, **b) y c)** necrosis de floema y unión del injerto de naranja dulce-naranja agria infectada con variante de declinamiento del CTV, **d)** aclaramiento de nervaduras en hojas del indicador de limón mexicano, **e)** vena corchosa de variantes severas (amarillamiento de plántulas) de CTV en indicador de limón mexicano, **f)** hoja de cuchara en hojas del indicador limón mexicano **g)** picado de tallo en indicador limón Eureka, **h)** amarillamiento de plántulas reacción en indicador de toronja (todas las fotos proporcionadas por CN Roistacher).