

# DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN COLOMBIA

Nubia Murcia Riaño<sup>1</sup>, Jairo Antonio Osorio<sup>2</sup>, Álvaro Caicedo<sup>1</sup>, Lee Calvert<sup>3</sup> y Francisco Morales<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> CORPOICA Centro de Investigación Palmira; <sup>2</sup> Programa Manejo Integrado de Plagas – CORPOICA; <sup>3</sup> Unidad de Virología, CIAT – Colombia.

107007

## RESUMEN

En Colombia se registró la aparición de la tristeza de los cítricos en el año 1940, causando síntomas de acanaladuras en el tallo y declinamiento rápido de árboles; otros trabajos ilustraron la presencia del vector *Toxoptera citricida* (Kirkaldi) y de razas severas del virus, en diferentes regiones del país. Frente a la complejidad de la problemática, se planteó la presente investigación con el propósito de generar una colección de razas del virus de la tristeza de los cítricos y a partir de sus correspondientes perfiles serológicos y biológicos, identificar y conservar aislamientos tipo tenue de uso potencial para protección cruzada contra razas severas de CTV. Para tal fin se realizó la colección de 139 aislamientos en áreas productoras de cítricos de los departamentos del Meta, Valle del Cauca, Quindío, Risaralda, Cundinamarca, Tolima, Atlántico y Magdalena. Los aislamientos colectados fueron analizados con pruebas serológicas utilizando un antisuero policlonal general (IgG-CTV) y el antisuero monoclonal MCA13 que genera una reacción positiva frente a aislamientos severos. Adicionalmente, los aislamientos colectados fueron inoculados por medio de injerto en plantas de lima mexicana libres del virus para evaluar la expresión de síntomas típicos de la enfermedad. Los síntomas más comunes observados en condiciones de campo en las distintas zonas productoras fueron las acanaladuras en el tallo, la clorosis de nervaduras y el declinamiento en variedades de limas ácidas. Los análisis serológicos confirmaron la presencia del virus en el 95% de las muestras en la mayoría de zonas evaluadas; con excepción de Risaralda y Quindío, donde la frecuencia de muestras positivas fue de 76%. La reacción con el antisuero MCA13 fue negativa para algunos aislamientos procedentes de la zona cafetera, sugiriendo su posible naturaleza tenue. La ausencia de síntomas severos en plantas de lima mexicana inoculadas y el resultado negativo con el antisuero MCA13 permitieron identificar tres aislamientos de la colección con características de aislamientos suaves, los cuales pueden considerarse como potenciales para desarrollar a partir de ellos cepas útiles en futuros programas de protección cruzada.

**Palabras claves:** cítricos, tristeza, caracterización serológica, Citrus Tristeza Closterovirus.

## SUMMARY

In Colombia the occurrence of CTV infected trees showing decline and stem pitting was reported since 1940; and later reports indicated the presence of *Toxoptera citricida* (Kirkaldi) an efficient vector of severe strains of the virus. This paper describes results from a 3-year study whose objective was to build a collection of CTV isolates from different regions of Colombia, characterize it by serological and biological procedures, and to identify mild virus isolates for testing in cross protection studies. 139 field isolates were collected from citrus orchards in eight department (Valle del Cauca, Quindío, Risaralda, Cundinamarca, Tolima, Atlántico, Meta and Magdalena). The samples were analyzed with the polyclonal antiserum IgG CTV and the specific monoclonal antibody MCA13, to determine the presence of virus particles and the virulence profile of the strains. In order to determine the biological severity of these field isolates, they were grafted onto virus-free Mexican lime seedlings which were grown inside an aphid-proof greenhouse, and evaluated for CTV symptoms (including vein-clearing, vein corking, epinasty and stem pitting). Over 95% of the samples from all the regions were infected by the virus. When analyzed with the MCA13 monoclonal antibody, all samples from six out of the eight sates reacted positive, approximately 24% of the isolates from Quindío and Risaralda were negative for this severe strain-specific antibody. Only three isolates out of 130 failed to induce severe CTV symptoms on Mexican lime and gave negative reaction with the MCA13 monoclonal antibody. These isolates may be potential donors of mild strains which could be useful in cross protection studies.

**Key words:** Citrus, Citrus Tristeza Closterovirus, serological differentiation, Stem Pitting.

## INTRODUCCIÓN

La tristeza, causada por el closterovirus de la tristeza de los cítricos (CTV) es una enfermedad de amplia distribución mundial, que ha causado pérdidas cuantiosas en varios países productores; entre ellos, Argentina, Brasil, Estados Unidos, España, Japón y Australia (Aubert et al, 1992; Bar Joseph et al, 1989; Cambra et al, 1988; Koizumi y Kuhara, 1987). La enfermedad disminuye la longevidad del huerto, su capacidad productiva y es de carácter destructivo cuando se tiene naranjo agrio (*Citrus aurantium* L) como patrón.

Así mismo, la tristeza causa deterioro muy rápido de árboles de lima ácida Tahití, especialmente en regiones de clima medio, como la zona central cafetera, obligando a erradicaciones prematuras de los huertos. Los principales factores que influyen en la manifestación de los síntomas son: la presencia de razas severas en el complejo viral, alta concentración de partículas del virus en la planta, combinaciones sensibles injerto-patrón, edad de la planta, condiciones ambientales como temperaturas moderadas y presencia de especies de vectores eficientes (Garnsey et al, 1997).

Para el estudio y diagnóstico de esta enfermedad, así como para la caracterización del agente patógeno y su relación con las especies de cítricos, se ha recurrido principalmente al empleo de la técnica serológica Elisa, a pruebas de infectividad sobre plantas indicadoras y al análisis del genoma del virus (Guzmán et al, 1994; Rocha et al, 1991). La tecnología ELISA se ha considerado un método rápido y confiable para la detección de la enfermedad, cuando se utilizan antisueños monoclonales producidos bajo distintas tecnologías y con capacidad para discriminar razas tenues y severas del virus. Uno de los

antisueros, el MCA13, ha demostrado su utilidad para diferenciar entre razas severas y razas suaves del virus, con un 95% de confiabilidad. (Cambra et al, 1992; Nikolaeva et al, 1998; Permar et al, 1990).

La utilización de pruebas biológicas con plantas indicadoras es una herramienta necesaria para determinar las propiedades biológicas de los aislamientos del virus y especialmente, para indexación de material de siembra de cítricos, sometido a procesos de certificación sanitaria (Moreno et al, 1991). Las técnicas moleculares aplicadas al estudio, detección y caracterización del virus de la tristeza de los cítricos, han dado como resultado un conocimiento detallado sobre su genoma, lo cual ha permitido desarrollar protocolos para el diagnóstico y caracterización de razas del patógeno (Cheng et al., 1994; Dequifang y Roose, 1996; Gillins, 1996; Gutiérrez; Luth y Moore, 1997)

La acción de razas suaves del CTV que protegen contra la infección de aislamientos más severos (protección cruzada) es un fenómeno natural ampliamente documentado en cítricos (Barkley, 1996; Costa y Muller, 1980; Koizumi y Kuhara, 1987). El resultado de esta estrategia ha sido benéfico en la mayoría de los casos, al obtenerse una mayor longevidad y productividad de los árboles protegidos (Powell et al, 1992; 1999). El mecanismo de protección cruzada subyacente en esta medida de control, exhibe características de alta especificidad entre el aislamiento a utilizar y la variedad a proteger.

En Colombia, se han observado razas severas del CTV desde 1940 causando síntomas de acanaladuras en el tallo y declinamiento en el Valle del Cauca, Niblett (1988). Los recientes trabajos de investigación desarrollados por Acosta et al (1994) reportan una incidencia del 95% de cepas severas en varias regiones del país y la existencia de posibles razas suaves, principalmente en la zona de Mompos. La tristeza de los cítricos representa un grave riesgo para nuestra citricultura, agudizado por la distribución generalizada de vectores muy eficientes como *T. citricida*, y por la inexistencia de un programa de certificación de material de siembra.

Considerando la diversidad y heterogeneidad de la producción cítrica nacional y la existencia de razas severas en todas las zonas productoras se hace necesario desarrollar, entre otras estrategias, la protección cruzada en siembras futuras, para lo cual el país aún no cuenta con información amplia y completa sobre la presencia y distribución de razas potencialmente tenues del virus en Colombia, ni con una colección caracterizada del patógeno. En el presente escrito se describen y discuten los resultados de una investigación realizada con el propósito de generar una colección de razas del virus de la tristeza de los cítricos, observar sus características serológicas e identificar aislamientos potencialmente tenues para futura utilización en pruebas de protección cruzada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reconocimiento de campo y colección de aislamientos

El trabajo de campo se realizó desde el año 1999 hasta el 2001 mediante visitas a huertos de cítricos en municipios representativos de la producción de cítricos en los Departamentos del Valle del Cauca, Quindío, Magdalena, Atlántico, Risaralda, Meta, Tolima y Cundinamarca, donde se tomaron muestras de las principales variedades cultivadas de naranjas (*Citrus sinensis* Osbeck), tangelos (*Citrus reticulata* x *Citrus Paradisi*), mandarinas (*Citrus reticulata* Blanco) y limas ácidas (*Citrus aurantifolia* Swing).

En cada sitio de muestreo se seleccionaron huertos con edades entre 10 y 15 años y en cada huerto se identificaron árboles que presentarían un desarrollo vigoroso, así como características sobresalientes de producción, calidad y estado fitosanitario. Adicionalmente en cada zona se tomaron muestras de árboles que exhibieron presencia de síntomas de tristeza. Las muestras tomadas consistieron de cuatro varetas funcionales de 20 centímetros de largo tomadas de cada árbol, las cuales debidamente identificadas y envueltas en papel humedecido y bolsas plásticas, se colocaron en neveras de icopor conteniendo hielo para su conservación y transporte al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Palmira. Adicionalmente, y con el fin de realizar análisis serológicos a muestras de campo, de los mismos árboles se tomaron cuatro rebrotes tiernos que se transportaron refrigerados al Laboratorio de Virología del CIAT.

### Evaluación Serológica de aislamientos de campo

Estas pruebas se realizaron con brotes jóvenes recientemente colectados en las distintas regiones. Las muestras se prepararon a partir de brotes mantenidos a 4°C desde el momento del muestreo. Se utilizó la corteza desprendida y nervaduras, finamente fraccionadas y maceradas en tampón de extracción a una dilución 1:20. Se emplearon los antisueros Policlonal IgG CTV (Bioreba INC.) que detecta partículas de un amplio espectro de razas severas y suaves de CTV, y el monoclonal MCA13 (Nokomys CORP.) que detecta una amplia gama de razas severas del virus y no reacciona con razas suaves del patógeno.

Se utilizó la técnica DAS - ELISA para determinar la presencia del CTV (Bar Joseph y Garnsey, 1979). Para ello, placas de Elisa Dynatech se cubrieron con 100 µL del antisuero IgG CTV a una dilución 1:1000 en tampón de carbonato pH 9,6 y se incubaron a 30°C por 4 horas, realizando tres lavados de cinco minutos con el tampón PBS (1x) adicionando 0.1% de volumen de Tween 20 e incubando por 16 horas a 4°C. Posteriormente

se aplicó una dilución 1:1000 de inmunoglobulina conjugada con fosfatasa alcalina y se continuó con una incubación por 5 horas a 37°C. Para observar la reacción de color se utilizó una solución de P-nitrofenil fosfato a una concentración de 1 mg/mL en buffer sustrato, y las lecturas colorimétricas se realizaron en intervalos de tiempo de 30 y 60 minutos en un lector ELISA equipado con un filtro de luz calibrado a 405 nanómetros.

El método de DAS ELISA Indirecto se empleó para determinar la presencia de razas severas del virus en las muestras de campo. Para ello, las placas de Elisa se cubrieron con el antisuero policlonal IgG en una dilución de 1:1000 y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente.

El antisuero secundario (monoclonal MCA13) se utilizó en una dilución de 1:20.000 en tampón de conjugado incubando por 1 hora; después de lavados consecutivos se adicionó la inmunoglobulina conjugada con fosfatasa alcalina a una dilución 1:30.000 y se incubó a 37°C por tres horas. Finalmente las lecturas de reacción de color se realizaron a los 60 y 120 minutos (Dekkers, 1999), en un lector ELISA equipado con un filtro de luz calibrado a 405 nanómetros. Como muestras testigo con reacción positiva y negativa al antisuero monoclonal MCA13 se utilizó tejido liofilizado de dos aislamientos de CTV (T36 y T26) correspondientes a una raza severa y una suave del virus respectivamente, suministrados por el laboratorio de virología del Citrus Research and Education Center (CREC) University of Florida, Estados Unidos. Como control negativo (sano) se utilizó tejido fresco de lima mexicana proveniente de semilla.

### Conservación y evaluación biológica de aislamientos en lima mexicana

Para este estudio se seleccionaron plántulas de lima mexicana provenientes de semilla sexual con seis meses de desarrollo. La inoculación se realizó colocando dos secciones de corteza extraída de cada una de las varetas colectadas en campo, en forma de injerto de escudete sobre plántulas de lima mexicana (dos plántulas por aislamiento). Después de inoculadas, las plántulas se ubicaron en una casa de malla a prueba de áfidos, con temperaturas diurnas promedio de 27 a 28°C y humedad relativa del 70%. Estas plantas se sometieron a poda intensa para inducir brotación y facilitar más adelante la evaluación de síntomas en brotes jóvenes.

En estudios previos con plantas de lima mexicana inoculadas por injerto, las partículas virales se detectaron entre 16 y 28 días después (Rocha-Peña et al., 1993); por tanto en el presente estudio, las plantas de lima mexicana inoculadas se sometieron a un análisis serológico con los antisueros policlonal IgG y monoclonal MCA13 a los 30 días después de la inoculación. Las evaluaciones biológicas para determinar el desarrollo de

síntomas de CTV en las plantas inoculadas se realizaron durante dos años, calificando la expresión de los siguientes síntomas en brotes jóvenes: amarillamiento de nervaduras, suberización de venas, disminución del crecimiento, epinastia y acanaladuras del tallo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Reconocimiento de campo y colección de aislamientos

Durante 1999 y 2000 se realizaron 8 visitas de reconocimiento a las principales zonas productoras de cítricos del Valle del Cauca, Quindío, Magdalena, Atlántico, Risaralda, Tolima, Meta y Cundinamarca, en las cuales se colectaron 139 aislamientos en cuatro variedades de mandarina (Arrayana, Oneco, Robinson y Clementina), cinco de naranjas (Valencia, Washington, Salustiana, Nativa y Pera del Río), tres variedades de limas ácidas (Tahití, Mexicana y Urumita), dos híbridos de Tangelo (Mineola y Orlando) y una variedad regional de Toronja. Se obtuvo información relacionada con el estado sanitario, vigor, edad del árbol y condiciones del clima en el sitio de muestreo. Los principales síntomas observados en campo asociados al CTV, fueron acanaladuras en el tallo y aclaramiento (clorosis) de nervaduras con mayor frecuencia en las variedades lima Mexicana, lima Tahití y Toronja.

Al analizar la información colectada en los sitios de muestreo se encontró que en huertos jóvenes (de cinco ó seis años) de las especies lima mexicana y lima Tahití se presentaron síntomas avanzados de la enfermedad como acanaladuras del tallo y aclaramiento de nervaduras, evidenciando infecciones con razas severas del virus, hecho que ya había sido detectado por Aubert et al., (1992) en el Valle del Cauca y otras zonas. Algunos árboles de los dos híbridos de Tangelo, presentaron acanaladuras en el tallo. Huertos jóvenes así afectados evidenciaron una notable pérdida de productividad y reducción de la longevidad de los árboles, que obliga a los productores a erradicar el huerto a los 5 y 7 años en regiones como la zona central cafetera. Algunos factores externos pueden influir en la manifestación de síntomas de árboles jóvenes, entre ellos las condiciones climáticas favorables, combinaciones copa-patrón sensibles y la presencia de poblaciones altas de vectores del virus.

En Colombia, la mayor área de cultivos tecnificados de cítricos se encuentra sobre los patrones Citrange Troyer, limón rugoso, Volkameriana, Mandarina Cleopatra y lima Rangpur, considerados como tolerantes al virus (Foner-V y Pina, 1992; Acosta et al., 1994); sin embargo, puede existir una alta presión de inóculo del virus en todas las zonas, debido al uso de material de siembra infectado y la existencia de altas poblaciones de *Toxoptera citricida*, vector muy eficiente

de razas severas del virus.

La influencia de la temperatura en la expresión de síntomas del virus de la tristeza de los cítricos está ampliamente documentada (Roistacher et al, 1974 ); encontrándose que las temperaturas por debajo de 24 °C permiten una rápida expresión de síntomas como aclaramiento y suberización de venas, acanaladuras del tallo, epinastia y enanismo (Morera, 1997).

La citricultura colombiana está ubicada en diversos pisos térmicos, desde el nivel del mar hasta los 1400 m.s.n.m. Algunos huertos de Limón Pajarito y Limón Tahití que crecen a temperaturas por encima de 26 °C, en la Costa Atlántica y el Tolima, manifestaron síntomas como acanaladuras del tallo y aclaramiento de nervaduras; asimismo, huertos ubicados entre 400 a 1380 m.s.n.m. correspondientes a Cundinamarca, la Zona Cafetera Central y Valle del Cauca, donde las temperaturas son menores, presentaron síntomas severos en las limas ácidas y tangelo, pero no en naranjas y mandarinas. Esta situación sugiere que algunos componentes severos de aislamientos de CTV han evolucionado para adaptarse a condiciones de alta temperatura media prevalentes en las zonas cálidas de Colombia, y que los cortos períodos de temperatura moderada (menor de 24 °C) en las noches son suficientes para la inducción de síntomas de la enfermedad en esos ambientes.

### Evaluación serológica de los aislamientos de campo

Para conocer los niveles de concentración del virus en las muestras de campo se hicieron valoraciones de reacción colorimétrica, utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda a 405 nanómetros. En estos ensayos, se tomaron como valores de referencia para las muestras de campo e invernadero las lecturas de un control negativo calificado con valores de Densidad Óptica inferiores a 0,100 y los controles positivos con valores mayores de 0,100. Las lecturas de Densidad Óptica de las muestras calificadas como positivas en el método de Das Elisa utilizando el antisuero policlonal IgG CTV alcanzaron valores desde 0,11 a 2,9, mientras que los controles negativos mostraron valores desde 0,02 a 0,07. La reacción en el método Das Elisa indirecto con el antisuero monoclonal MCA-13 presentó unos valores de densidad óptica de 0,23 con los aislamientos de CTV colectados en este estudio; estos son valores inferiores a los obtenidos para los controles positivos de referencia (T36 y T26) los cuales fueron superiores a 0,40. Estos resultados se pueden atribuir a muy diversas causas como la edad del tejido foliar ó efectos de las altas temperaturas de las zonas de origen (Bar-Joseph et al., 1979; Permar et al., 1990, y Morera, 1997).

Los resultados del análisis serológico con el antisuero policlonal IgG CTV confirmaron la presencia del virus de la tristeza de los

cítricos en todas las zonas evaluadas; con una frecuencia de muestras positivas al virus del 97% en Risaralda, Magdalena, Costa Atlántica, Tolima, Meta, Cundinamarca, y de 85% y 76% en el Valle del Cauca y Quindío, respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Niblett (1988), Aubert et al, (1992) y Acosta et al, (1994), quienes señalaron que el virus es endémico en nuestro País y que existe una amplia diseminación por vectores. Adicionalmente, muestreos y observaciones realizadas en este estudio permitieron determinar que todas las zonas presentan infestaciones elevadas de los áfidos *Toxoptera citricida* (100%), *Toxoptera aurantii* (23%), *Aphis gossypii* (38%) y *Aphis citricola* (31%). La ausencia en nuestro medio de extremos climáticos garantizaría la continuidad de la presencia y actividad de estas plagas en los huertos, contribuyendo de manera notable a la distribución y perpetuación del inóculo.

Los análisis realizados con el antisuero monoclonal MCA13 mostraron que el 100% de los aislamientos del Magdalena, Atlántico, Tolima y Meta albergaron razas potencialmente severas, mientras que la frecuencia de estas fue menor con los aislamientos del Quindío, Valle del Cauca y Risaralda. Estas razas fueron además predominantes en las variedades de Toronja y Limas Ácidas confirmando la alta sensibilidad de estas especies observadas en los estudios realizados por Niblett (1988), Aubert (1992) y Acosta et al. (1994). La reacción negativa con el antisuero MCA13 únicamente para algunos aislamientos procedentes de zonas de clima medio es de mucho interés si se considera que en estos climas la multiplicación del virus y la expresión de síntomas pueden ser más favorecidos.

### Prueba Biológica de aislamientos en Lima Mexicana.

De las 139 muestras colectadas en campo, 9 de ellas presentaron problemas de bajo prendimiento mediante la metodología de injerto de parche. Los 130 aislamientos restantes inoculados con éxito en plántulas de lima mexicana se conservaron en una casa de malla a prueba de insectos en el Centro de Investigación Palmira. A cada planta se le realizaron labores de mantenimiento agronómico que incluyeron podas, fertilización química y riego permanente. Las evaluaciones de síntomas en lima mexicana indicaron que los aislamientos más severos indujeron síntomas como aclaramiento de nervaduras, enanismo, epinastia, suberización de venas y acanaladuras en tallos y ramas (Figura 1). De los 131 aislamientos portadores del virus, únicamente 24 reaccionaron negativamente con el antisuero MCA13. De estos 24 aislamientos, solamente tres (009, 049 y 079) permanecieron negativos en las evaluaciones de síntomas sobre la planta indicadora; sugiriendo que tiene naturaleza tenue. Otros

cuatro aislamientos de este mismo grupo (038, 050, 056 y 074) solamente indujeron síntomas leves de CTV (aclaramiento de venas ó epinastia) después de dos años de injertados sobre lima mexicana., indicando también una posible naturaleza tenue.

Finalmente, otros seis aislamientos procedentes de zonas cálidas (052, 059, 093, 101, 104 y 114) resultaron positivos frente al antisuero MCA13 pero no indujeron síntomas sobre lima mexicana después de dos años, mientras que otro grupo de aislamientos (015, 115, 134) reaccionó positivo con MCA13 y presentó todos los síntomas. Este hecho señala la importancia de las pruebas biológicas en la búsqueda de razas tenues, y sugiere además la posibilidad de que algunas razas severas no se hayan multiplicado adecuadamente en la planta indicadora; ó que de otro lado algunas razas tenues contienen el epitope reconocido por MCA13.

Durante dos años se realizaron evaluaciones serológicas a los aislamientos de la colección. Los resultados de los perfiles serológicos mostraron que únicamente tres aislamientos mantuvieron su reacción serológica negativa al antisuero MCA13 y aclaramiento de nervaduras o ausencia de síntomas en plantas de lima mexicana inoculadas en invernadero (Tabla 1). Estos resultados se consideran preliminares si se tiene presente que las condiciones ambientales de humedad relativa y temperatura en las cuales permanecieron estas plantas pueden modular la manifestación de los síntomas y la concentración del virus. Es importante mencionar que árboles calificados como asintomáticos en campo, manifestaron los síntomas del virus de la tristeza cuando se inocularon en la especie lima mexicana; esta respuesta parece indicar que puede haber un efecto de la condición ambiental y la combinación injerto patrón sobre la expresión de síntomas (Morera, 1997).

Los resultados aquí obtenidos sugieren varias posibilidades. Primero, que en condiciones naturales hay una alta manifestación de razas severas que resultaría en ausencia de síntomas en la planta infectada por el efecto de un patrón resistente sobre la diseminación del virus en la copa. Segundo, los aislamientos procedentes de estos árboles, al ser inoculados sobre una variedad sensible, expresan síntomas y por lo tanto causan reacción positiva. Tercero Los aislamientos positivos que no producen una reacción fuerte en una variedad sensible se debe a que el nivel del virus es más bajo que el normal. Esto sugiere que los resultados del análisis con el antisuero monoclonal MCA13 no son una evidencia suficiente de la ausencia de componentes severos del CTV. Finalmente, el MCA13 fue desarrollado a partir de una población adaptada a una región sub tropical (Florida USA) y no detecta todas las posibles variantes severas del virus existentes en nuestras regiones.

Los análisis serológicos con los antisueros MCA13 y IgG- CTV realizados a la colección de aislamientos de CTV incluyendo los testigos de referencia, indicaron que cerca del



**Figura 1.** Síntomas de CTV en plantas de lima mexicana con aislamientos severos a. Amarillamiento de nervaduras . b. Suberización de venas . c. Epinastia. d. Acanaladuras . e. Enanismo

3% de ellos exhibieron propiedades inmunológicas características de razas suaves del virus, estos resultados sugieren la existencia de razas suaves con potencial para proveer protección cruzada contra las formas severas del CTV existentes en campo. Es de la mayor importancia conservar este tipo de aislamientos y realizar futuras caracterizaciones exhaustivas de sus propiedades biológicas, serológicas y moleculares a fin de identificar, caracterizar y utilizar sus componentes tenues para programas de protección cruzada. Adicionalmente el conocimiento de tales propiedades permitirá desarrollar métodos de

diagnóstico específicos los cuales serían de utilidad en programas de vigilancia sanitaria y monitoreo de nuevos campos de producción.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a ASOHOFrucol por la financiación parcial del estudio; a la Unidad de Virología de CIAT, Agricultores y asistentes técnicos de las regiones visitadas y al personal de apoyo de CORPOICA.

Tabla 1. Reacción serológica y evaluación de síntomas en Lima Mexicana de aislamientos colombianos del virus de la tristeza de los cítricos. 2000 -2001

Aislamiento	Departamento	IgG	MCA	Evaluación síntomas			
				AN	SV	E	SP
009	Valle	+	-	-	-	-	-
015	Valle	+	+	+	+	+	+
038	Quindío	+	-	-	-	+	-
049	Quindío	+	-	-	-	-	-
050	Quindío	+	-	+	-	-	-
052	Magdalena	+	+	-	-	-	-
056	Magdalena	+	-	-	-	-	-
059	Magdalena	+	+	-	-	-	-
074	Risaralda	+	-	-	-	+	-
079	Risaralda	+	-	-	-	-	-
093	Tolima	+	+	-	-	-	-
101	Tolima	+	+	-	-	-	-
104	Tolima	+	+	-	-	-	-
114	Meta	+	+	-	-	-	-
115	Meta	+	+	+	+	+	+
134	Cundimarca	+	+	+	+	+	+

+ Reacción positiva - Reacción negativa An= aclaramiento de nervaduras; SV = Suberización de venas, E = Epinastia, SP = Acanaladuras del tallo

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, O., Alegría, A., Guzmán, M., Lee, R., Niblett, C y Peñaranda, J. 1994. El virus de la tristeza de los cítricos: una grave amenaza para la Citricultura Colombiana. Lecturas seleccionadas sobre Biología molecular del Virus. Editorial Científica. Santafé de Bogotá. 58 p.
- Aubert, B., Etienne, J., Cottin, R., Leclant, F., Caovan, Ph., Vuillaume, C., Jaramillo, C. y Barbeau, G. 1992. Citrus tristeza disease a new threat for the Caribbean Basin. *Fruits* V. 47 (3): 393-404.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R. y Lee, R. F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27:291-316.
- Bar-Joseph, M. y Garnsey, S. M. 1979. The Use of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of citrus tristeza. *Phytopathology* 69: 190-194.
- Barkley, P. 1996. Controlling tristeza disease in citrus by pre-immunization with mild strains. *ELDERS Report CT009*. 2p.
- Cambra, M., Gorris, M. T., Serra, J., Camarasa, E., Pina, J. A., Sanz, A., Vela, C., y Llaster, F. 1992. Diagnóstico y estudio del Virus de la Tristeza de los cítricos (CTV) utilizando técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos monoclonales. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Mimeografiado 27p.
- Cambra, M., Serra, J., Vilalba, D., Moreno, P. 1988. Present situation of the citrus tristeza virus in the Valencia community. *Proc. 10<sup>th</sup> Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* pp. 1-10.
- Costa, S. A. y Muller, G. W. 1980. Tristeza control by Cross Protection. *Plant disease* 64 (6): 538-541.
- Cheng, F. S., Roose, M. L., Federici, C. T. y Kupper, R. S. 1994. A detailed genetic linkage map including a CTV resistance gene derived from a cross between two intergeneric citrus x poncirus hybrids. *Plant Genome II*, January 1994. 2p. Abstract.
- Dekkers, M. 1999. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Selective detection of severe (Decline and Stem pitting) strains of Citrus tristeza virus using monoclonal antibody MCA 13. *Citrus research and Education Center. Mimeografiado* 4p.
- Dequifang, F. y Roose, M. L. 1996. Identification of RAPD markers linked to citrus tristeza virus resistance and fruit acidity in citrus. *Plant Genome IV*, January, 1996. Abstract.
- Foner-Valero, J. B. y J. A. Pina, 1992. Plantones tolerantes a la tristeza. 20 años de historia en: *Revista Internacional de Cítricos Levante Agrícola* 319: 88-92
- Garnsey, S. M., Gonsalves, D. Yokomy y R. Kobayashi, S. 1997. Location Effect on Incidence of Citrus Tristeza Virus in Hawaii. In: *Proc 11<sup>th</sup> Conf. IOCV. Riverside*. 171-177.
- Gillins, M. R. 1996. Evaluation of immunological and molecular methods for discriminating between Citrus Tristeza Virus. *ELDERS Report CT322*. 4p.
- Guzmán, M., Manjunath, K. L. Febres, V. I. Pappu, H. R., Lee, R. F y Niblett, C. L. 1994. Comparación de Secuencias del Gene de la Proteína de la Capside de Aislamientos Colombianos del virus de la tristeza de los cítricos. *Fitopatología Colombiana* 18(2):107 - 113.
- Gutiérrez, M. A., Luth, D. y Moore, G. A. 1997. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium*, L) plants expressing the coat protein gene of CTV. *Plant Cell Reports* 16 ( 11): 745-753.
- Koizumi, M. y Kuhara, S. 1987. Protection of pre-inoculated citrus trees against tristeza virus in relation to the virus concentration detected by ELISA. In: *Proceedings of the Ninth International Organization of Citrus Virologists Conference*. p 41-48.
- Morera, M. 1997. Reseña bibliográfica sobre la enfermedad Tristeza de los Cítricos. En: *Revista Internacional de Cítricos* 340: 227-238.
- Moreno, P. Guerry, J., Ballester, Olmos, J. K. y Martinez, M. E. 1991. Segregation of Citrus Tristeza Virus. Strain as Evidenced by Double Stranded RNA (ds RNA). Analysis in: *Proc 11<sup>th</sup> Conf IOCV. IOCV Riverside*. 20-24.
- Niblett, C. 1988. Incidence of citrus tristeza virus in Colombia. *Phytopathology* 78: 878 (abstract).
- Nikolaeva, O. Y Karasev, Alexander. 1998. Serological Differentiation of the Citrus Tristeza Virus Isolates Causing stem Pitting in Sweet Orange. *Plant Disease*. 82: 1276-1280.
- Permar, T. A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J. y

- Lee, R. F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80: 224-228.
- Rocha, M. A., Lee, F. R. y Niblett, C. L. 1993. Effectiveness of different Citrus Species as Donor Host for Graft transmission of Citrus Tristeza Virus. In: Proc 12<sup>th</sup> Conf. IOCV. Riverside. 84-92.
- Rocha, Peña, M., Lee, R.F., Permar T.A., Yokomi, R. K. y Garnsey, S. M. 1991. Use of Enzyme Linked Immunosorbent and Dot Immunobinding Assay To Evaluate Two Mild Strain Cross Protection experiments after Challenge With a Severe Citrus Tristeza Virus Isolate. In: Proceedings of the Eleventh IOCV Conference. P. 93-102.
- Roistacher, C. N., Blue, R. L., Nauer, E. M. y Calavan, C. E. 1974. Suppression of Citrus Tristeza Virus Symptoms in Mexican Lime Seedling Grow At Warm Temperatures. *Plant Dis. Rep.* 58: 757-760.
- Powell, C. A., Pelosi, R.R., Cohen, M. 1999. Cross-Protection of grape fruit from decline-inducing isolates of Citrus Tristeza Virus. *Plant Diseases* 83: 989-991.
- Powell, C. A., Pelosi, R. R. y Cohen, M. 1992. Superinfection of orange trees containing mild isolates of Citrus Tristeza Virus with severe Florida isolates of CTV. *Plant Diseases* 76: 141-144.

Reprinted with permission from Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI. Originally published in *Fitopatología Colombiana* 26(1-2): 21-26, Copyright 2002.