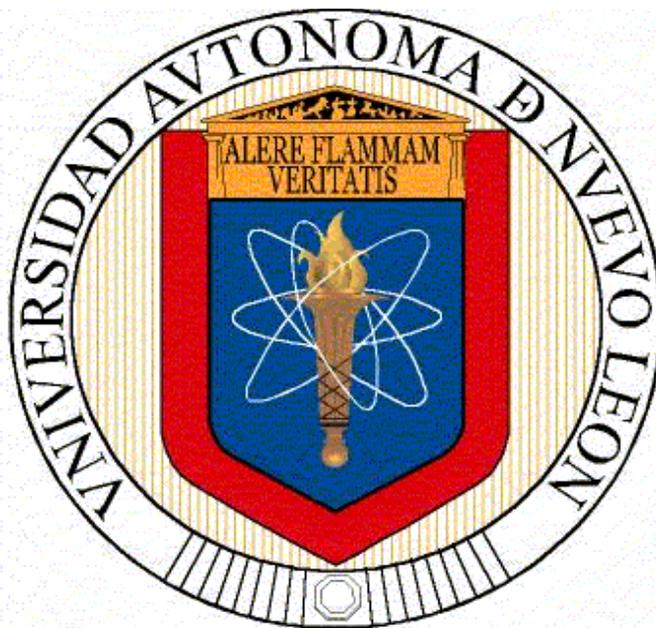


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**DESARROLLO DE UN SISTEMA SEROLÓGICO ELISA-DASI
PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL
p20 DEL VIRUS TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS**

POR

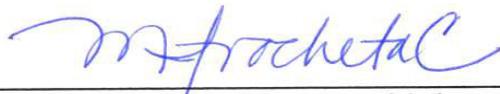
QBP. CLAUDIA BERENICE LÓPEZ ALVARADO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA JUNIO DE 2014

**DESARROLLO DE UN SISTEMA SEROLÓGICO ELISA-DASI PARA LA
DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL p20 DEL VIRUS
TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS**

COMITÉ DE TESIS



Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas

Director de tesis



Dr. Mario Alberto Rocha Peña

Secretario



Dra. Patricia Tamez Guerra

Vocal



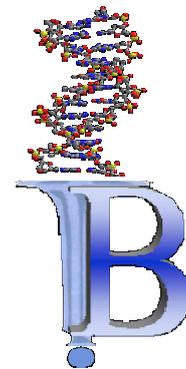
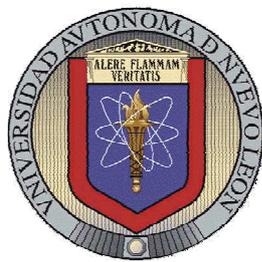
Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Vocal



Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio 4 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas.

ÍNDICE

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	1
1.0 Introducción	2
2.0 Hipótesis y Objetivos	5
2.1 Hipótesis	5
2.2 Objetivo general	5
2.3 Objetivos particulares	5
3.0 Antecedentes	6
3.1 Propiedades del virus	6
3.2 Inclusiones virales y su relación con la proteína p20	7
3.3 Métodos de detección del CTV	7
3.4 Producción de anticuerpos contra el CTV	8
3.4.1 Preparaciones purificadas del virus	8
3.4.2 Proteínas recombinantes	9
3.5 Desarrollo de anticuerpos contra proteínas no estructurales para la detección de virus fitopatógenos	11
4.0 Materiales y Métodos	15
4.1 Anticuerpos utilizados	15
4.2 Purificación de anticuerpos	15
4.3 Evaluación de los anticuerpos anti-p20 - Western blot	16

4.4. Muestras de tejido de plantas de cítricos infectadas por el CTV	16
4.5 Evaluación de los antisueros anti-p20 - ELISA indirecta	18
4.6 Establecimiento de las condiciones óptimas de ELISA-DASI	19
4.7 Modelo estadístico	21
5.0 Resultados	22
5.1 Purificación de anticuerpos	22
5.2 Evaluación de los anticuerpos anti-p20 - Western Blot	23
5.3 Evaluación de los antisueros anti-p20 - ELISA indirecta	26
5.4 Establecimiento de las condiciones óptimas de ELISA-DASI	29
5.5 Evaluación de los anticuerpos con diversos aislamientos del CTV de diferentes regiones citrícolas del Estado de Nuevo León, California y Florida.	35
6.0 Discusión	36
7.0 Conclusiones	43
8.0 Literatura citada	44
Apéndice A	55
Apéndice B	58

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme seguir adelante con mis estudios y llevar a cabo un nuevo reto en mi vida, dejándome compartirlo con mis seres queridos, gracias por ser mi luz y guía, por estar conmigo en cada momento difícil y por ayudarme a seguir en este camino de la vida.

A mis Abuelitos, aunque ya no están conmigo siempre han compartido mis logros, triunfos y tropiezos. Donde quiera que estén gracias por haberme hecho tan feliz.

A mis padres Refugio López García y Blanca Lilia Alvarado Monsiváis, Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha ayudado a ser una persona de bien, y sobre todo por su amor incondicional. ¡Gracias por darme la vida!

A mis hijas Emma Ramiro López y Aída Ramiro López, Por ser una parte importante de mi vida y la máquina que me da la fuerza y me impulsa a seguir a delante para buscar nuevos retos en mi vida; por hacerme sentir especial, por darme todo su amor y por prestarme su tiempo para yo dedicarlo a la investigación. Las amo preciosas.

A mi esposo Adrián Ramiro Carretero, Por darme los mejores regalos de mi vida (su amor y mis chiquitas), por ser una persona tan especial e importante en mi vida, por su apoyo y motivación. TE AMO.

A mis hermanas Dulce Patricia López Alvarado e Irasema Lilián López Alvarado, por su apoyo incondicional y por estar siempre conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL, por permitirme desarrollarme profesionalmente.

Al CONACYT por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas, por confiar en mí y permitirme ser nuevamente parte de su equipo de trabajo, por su confianza y amistad, por todas las enseñanzas que me ha dado, por haberme encaminado en una línea de investigación que es muy bonita y además muy práctica; pero sobre todo gracias por su paciencia y actitud cuando veía que no avanzaba con lo experimental. Es una mujer excepcional y mi ejemplo a seguir.

Al Dr. Mario Alberto Rocha Peña, por nuevamente integrarme a su lista de alumnos, por compartir conmigo su conocimiento y experiencias, pero sobre todo gracias por su amistad.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, que aunque ahora no le tocó ser parte de mi comité de tesis, para mí es una persona importante, le doy las gracias por ser tan apreciable y amable desde que me integre al laboratorio L4, por brindarme su conocimiento, experiencias y consejos, por ayudarme con mi formación académica y sobre todo por la amistad que me ha dado durante estos años.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra, gracias por ser parte de la comisión de tesis, por todos los consejos que me dio en las clases, por brindarme su apoyo y amistad. Por ser una mujer ejemplar y excelente investigadora.

Al Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, gracias por ser nuevamente parte de mi comité de tesis, por sus consejos, por su amistad y por estar siempre pendiente de mí.

*A la **Dra. Katuska Arévalo Niño**, gracias por permitirme seguir preparándome académicamente, por ser parte de la comisión de tesis, por brindarme su amistad todos estos años y por ser una mujer ejemplar la cual admiro mucho.*

*A la **Familia Ramiro Carretero**, por permitirme ser parte de ella y por brindarme su apoyo y confianza.*

*A mi cuñado **Aldo Ramiro Carretero**, por ser mi amigo antes que nada, por brindarme su confianza, por estar siempre disponible cuando lo necesito, por todos los consejos que me ha dado y por ayudarme en los momentos difíciles y motivarme a seguir adelante.*

*A mis amigos del laboratorio L4, **Astrid, Jessica, Hugo, Laura, Saúl, Chuy y Wilfrido** gracias por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por sus conocimientos y amistad brindada.*

*Al **IEIN** por cuidar a mis hijas todo este tiempo y por ayudarme con su formación.*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Colección de aislamientos del CTV del estado de Nuevo León, California y Florida evaluados mediante ELISA-DASI utilizando los antisueros anti-p20 de conejo clave 201 como tapizado y de rata clave R1 como intermedio.	17
2	Evaluación de la reactividad de anticuerpos anti-p20 contra el CTV en pruebas de ELISA indirecta.	18
3	Evaluación de combinaciones de anticuerpos específicos anti-p20 desarrollados en animales inmunizados con la proteína recombinante no estructural p20 del CTV en ensayos de ELISA-DASI.	19
4	Distribución de los anticuerpos anti-p20 en la microplaca, en la parte superior se observa el anticuerpo empleado como tapizado y en la parte inferior el anticuerpo empleado como intermedio con sus diferentes diluciones; en el costado se muestran las concentraciones empleadas con el anticuerpo de tapizado y los controles internos del experimento.	20
5	Densidades ópticas obtenidas por ELISA indirecta con extractos crudos de tejido de cítricos sanos e infectados con el CTV, utilizando antisueros policlonales anti-p20 y anti-p25.	27
6	Evaluación de los antisueros anti-p20 de conejo y rata (202 y R1) empleando ELISA indirecta con extractos crudos de tejido de cítricos sanos e infectados con el CTV homogenizados con dos diferentes buffer de extracción y tratados con tritón X-100 al 2.5%.	28
7	Establecimiento de las condiciones óptimas mediante ELISA-DASI empleando anticuerpos anti-p20 y anti-p25 (referencia del experimento) con extractos crudos de tejido de cítricos sanos e infectados con el CTV.	30
8	Evaluación de los anticuerpos anti-p20 y anti-p25 mediante ELISA-DASI, variando el buffer del anticuerpo intermedio.	33
9	Comparación de los sistemas serológicos de detección para la proteína no estructural p20 (anti-p20) y proteína mayoritaria de la cápside p25 (anti-p25) empleando ELISA-DASI.	34

10 Valores de media (X), desviación estándar (S) y número de muestras (N) para la prueba “T de student” para muestras independientes de 2 colas para la combinación anti-p25 CB/C9 (cabra y conejo) y anti-p20 201/R1 (conejo y rata).

35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Purificación de los antisueros anti-p20 y anti-p25, electroforesis de poliacrilamida al 8%.	23
2	Evaluación de la reactividad de los antisueros anti-p20 mediante Western-Blot.	24
3	Reactividad con anti-p20 y anti-p25 con tejido de cítricos de diferentes orígenes (Nuevo León, California y Florida) mediante Western-Blot.	25

Abreviaturas

Xg	Fuerza centrífuga relativa
anti-p20	anticuerpo p20
anti-p25	anticuerpo p25
anti-CTV	anticuerpo del Virus tristeza de los cítricos
anti-IgG	anticuerpo anti inmunoglobulina
AP	alkaline phosphatase
BSA	bovine serum albumin
CsCl	Cloruro de cesio
CTV o VTC	Virus de la tristeza de los cítricos
DO	Densidad óptica
DTBIA	Ditect tissue blot immunoassay
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzime-Liked Immunoorbent Assay
ELISA-DASI	Double Antibody Sandwich Indirect-Enzime Linked ImmunoSorbent Assay
FCB-UANL	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
GPV	Goose parvovirus
GRSV	Groundnut ringspot virus
IgG	Inmunoglobulina G
kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
MDL	Marco de lectura
MDPV	Moscoy duck parvovirus
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3indolyl phosphate
NCP	Proteína no estructural
PBST	Buffer de fosfatos con Tween 20
PMTV	Potato mop-top virus

pNPP	p-Nitrophenyl Phosphate
prb	Proteína recombinante
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PWV	Passionfruit woodiness virus
RNA	ribonucleic acid
RNAg	Genomic ribonucleic acid
RNAsg	subgenomic ribonucleic acid
rPC	Proteína recombinante de la cápside
rPC-CTV	Proteína recombinante de la cápside del Virus tristeza de los cítricos
TBS	Buffer tris
TBS-T	Buffer Tris con Tween 20
TSWV	Tomato Spotted Wild Virus
UTR	Región no traducible
WB	Western Blot

RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV; género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*) es el agente causal de una de las enfermedades de mayor importancia económica de los cítricos a nivel mundial. El CTV se detecta en las plantaciones mediante pruebas serológicas basadas en el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima conocido como ELISA, para lo que existen kits comerciales que se utilizan rutinariamente en los diversos laboratorios de diagnóstico que existen en el México. El virus está compuesto por partículas virales largas y flexibles de 2000 x 12 nm de tamaño; su genoma consiste de RNA de cadena sencilla, con polaridad positiva con una talla molecular entre 19,226 a 19,302 nucleótidos dependiendo del aislamiento. El RNA genómico (RNAg) del CTV contiene 12 marcos de lectura que codifican por lo menos para 17 productos de expresión con diferentes funciones en el ensamblaje de partículas virales y multiplicación del RNAg. En la porción terminal 3' se ubica el gen *p20* el cual codifica una proteína no estructural con un peso molecular aproximado de 16.5-19.9 kDa; esta proteína denominada p20 tiene una alta afinidad por sí misma y se acumula en forma de inclusiones amorfas en el floema de plantas infectadas. El presente trabajo consistió en evaluar anticuerpos de conejo y rata desarrollados contra la proteína no estructural p20 recombinante del CTV expresada en *E. coli*, con fines de detección. Los anticuerpos anti-p20 evaluados, tanto de conejo (clave 201) y de rata (clave R1), reaccionaron en ensayos de inmunodetección en Western Blot en forma específica con la proteína p20 de cultivos de *E. coli* transformados con el gen *p20*, así como la proteína p20 presente en tejido de cítricos infectado por el CTV. Posteriormente, se evaluó la reactividad de los anticuerpos anti-p20, en pruebas de ELISA-DASI con tejido de árboles de cítricos previamente analizados y considerados positivos y negativos del CTV. Se emplearon dos anticuerpos anti-p20 desarrollados en conejo clave 201 el cual tuvo reactividad como tapizado a una concentración de 6µg/ml y rata clave R1 como intermedio a una dilución 1:3,000. En la combinación óptima 201/R1 los valores de densidad óptica (DO₄₀₅) oscilaron entre 0.170 y 0.550 para las muestras de tejido infectado por el CTV y fueron menores de 0.100 con tejido de plantas sanas. Mientras que con otras combinaciones tales como: R1 6µg/ml (tapizado) / 201 1:3000 (intermedio), los valores de absorbancia fueron de 0.008-0.012 para las muestras de tejido infectado por el CTV y con la combinación 202 6µg/ml (tapizado) / R1 1:3000 (intermedio), los valores de densidad óptica (DO₄₀₅) oscilaron entre 0.157-0.171 para las muestras de tejido infectado por el CTV, por lo que no se logró diferenciar entre una muestra positiva y negativa del CTV.

1.0 INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV) es el agente causal de una de las enfermedades de mayor importancia económica de cultivo de los cítricos a nivel mundial (Bar-Joseph *et al.*, 1989a; Moreno *et al.*, 2008; Rocha-Peña *et al.*, 1995; 1998). El CTV es un closterovirus de distribución cosmopolita que infecta a casi todas las especies y géneros relacionados del género *Citrus* (Bar-Joseph y Lee, 1989; Garnsey y Müller, 1988; Moreno *et al.*, 2008); sin embargo, su efecto más dramático ocurre en los cultivos de naranja, toronja y mandarina injertados en patrón de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) y limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] independientemente de ser crecido de semilla o del portainjerto utilizado (Rocha-Peña, *et al.*, 1995, 1998).

La introducción del CTV en una plantación se efectúa comúnmente mediante el empleo inadvertido de material de propagación infectado (yemas, plantas de vivero, etc.), motivo por el cual se requiere métodos de detección confiables para evitar el empleo de material de propagación infectado y la posterior diseminación del virus en el campo (Roistacher y Bar-Joseph, 1989).

Para la detección del CTV en plantas de cítricos, el análisis masivo de muestras de cítricos se ha llevado a cabo históricamente mediante diversas variaciones de la técnica serológica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Bar-Joseph y Malkinson, 1980; Garnsey *et al.*, 1993) con anticuerpos específicos para el CTV basado tradicionalmente en el empleo de preparaciones del virus purificadas como inmunógeno (Rocha-Peña y Lee, 1991). En el transcurso del tiempo, se desarrollaron anticuerpos policlonales (Gonsalves *et al.*, 1978; Bar-Joseph y Malkinson, 1980; Garnsey y Henderson, 1984, datos no publicados; Gumpf, 1990; datos no publicados; Lee, 1986; datos no publicados), monoclonales de reacción poli-específica (Lin *et al.*, 2000; Vela *et al.*, 1986; Batista, 2001; Öztürk y Çirakoglu, 2003) y mono-específica (Permar *et al.*, 1990). Actualmente existen en el mercado a nivel comercial estuches serológicos para la detección del CTV de varias compañías principalmente de USA (Agdia y Biorad), España (INGENSA y Plan Print), Suiza (Bioreba) e Italia (Agritest). La mayoría de los estuches comerciales se basan tanto en

anticuerpos policlonales y monoclonales o mezclas de ellos preparados a partir de preparaciones purificadas del virus como inmunógeno.

En la década de 1990 se reportó la producción de anticuerpos policlonales para la proteína recombinante p25 de la cápside (rCP) del virus (Manjunath *et al.*, 1993; Nikolaeva, *et al.*, 1995; Targon *et al.*, 1997) como una estrategia para vencer lo laborioso y dificultades de purificación de las partículas virales del CTV. En términos generales; los anticuerpos desarrollados a partir de la proteína recombinante de la cápside del CTV originalmente tuvieron utilidad solo como anticuerpos intermedios en las pruebas ELISA DASI, debido a la reducida afinidad para poder ser empleados como anticuerpos primarios (de tapizado) en las placas de microtitulación (Bar-Joseph *et al.*, 1997). No obstante lo anterior, en el año de 2008 se reportó el desarrollo de anticuerpos contra la proteína recombinante p25 (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) con propiedades de ser empleados tanto como anticuerpos primarios y como anticuerpos intermedios en ensayos de ELISA DAS-indirecta, efectivos para el análisis masivo de muestras de cítricos a nivel de campo, así como con aislamientos del CTV de orígenes geográficos diversos (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2009).

Referente a los estudios de caracterización del genoma del CTV, éstos se han efectuado rutinariamente mediante la clonación y expresión en *Escherichia coli* de los genes en estudio, con el desarrollo subsecuente de anticuerpos contra la proteína recombinante y su detección en ensayos serológicos; por ejemplo los genes p27 (Febres *et al.*, 1994), p20 (Gowda *et al.*, 2000), p23 (Ghorbel *et al.*, 2001), p65 (Torres *et al.*, 2003); no obstante lo anterior, solo para el caso del gen p25 de la proteína de la cápside (Manjunath *et al.*, 1993; Nikolaeva *et al.*, 1995; Targon *et al.*, 1997; Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) se ha explorado la posibilidad de emplear los anticuerpos desarrollados con fines de diagnóstico. Al respecto, la proteína no estructural p20 del CTV ofrece una alternativa a explorar su uso con fines de diagnóstico, primordialmente por las cantidades considerables en que se acumula en plantas infectadas (Gowda *et al.*, 2000), así como la presencia consistente de las inclusiones que ella forma en el floema de plantas infectadas para diversos aislamientos del CTV (Brlansky y Lee, 1990).

En año 2008 en el laboratorio L4 del Instituto de Biotecnología de la FCB-UANL se desarrollaron anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante de la

cápside p25 (rCP) del CTV en conejos y cabras. Los anticuerpos anti-p25 desarrollados de cabra (T1) y de conejo (C3) fueron evaluados en pruebas ELISA-DASI, con tejido de cítricos sano e infectado por el CTV. Ambos anticuerpos (cabra T1 y de conejo C3) reaccionaron en forma efectiva tanto como anticuerpo primario (atrapante o de tapizado de placa) y como anticuerpo intermedio (anticuerpos de detección) en pruebas ELISA-DASI, discriminando tejido sano e infectado con el CTV, con valores de densidad óptica (OD_{405nm}) entre 0.151-2.415 para las muestras infectadas con el CTV y valores menores a 0.100 para el tejido sano (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008). En un estudio posterior, se demostró la efectividad de la combinación de anticuerpos rCP cabra T1/conejo C3 en el análisis masivo de muestras de cítricos en plantaciones comerciales de cítricos para la detección del CTV en California, EUA (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2009).

En el presente trabajo de investigación se planteó el utilizar la expresión de la proteína p20 no estructural como objeto de detección del CTV en plantas infectadas con fines de diagnóstico. La proteína p20 no estructural aún no sido explotada para emplearla con fines de diagnóstico, ya que todos los estudios previos de detección serológica se han basado en el desarrollo de anticuerpos empleando como inmunógeno ya sea partículas virales completas purificadas o bien la proteína p25 de la cápside del CTV recombinante expresada en *Escherichia coli* y purificada. La justificación de explorar la proteína p20 no estructural con fines de diagnóstico se basa en la alta afinidad que tiene por sí misma y su consecuente acumulación en forma de inclusiones amorfas en el floema de plantas infectadas con CTV (Gowda *et al.*, 2000), lo cual garantiza su presencia en cantidades considerables para ser detectada en plantas infectadas y por consecuencia su factibilidad de ser empleada para discriminación de plantas sanas e infectadas por el CTV.

2.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis:

Mediante un sistema ELISA-DASI con anticuerpos desarrollados contra la proteína no estructural p20 del CTV es posible discriminar plantas de cítricos sanas e infectadas por el CTV.

2.2 Objetivo general:

1. Evaluar la reactividad de los anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante p20 en cultivos transformados de *Escherichia coli* y tejido de cítricos sano e infectado con el CTV.

2.3 Objetivos particulares:

1. Purificar la proteína recombinante p20 del CTV mediante gel de poliacrilamida y comprobar pureza y concentración de la misma por Western Blot.
2. Establecer un sistema serológico ELISA-DASI con los anticuerpos desarrollados anti-p20 para discriminar muestras de cítricos positivas y negativas del CTV.

3.0 ANTECEDENTES

3.1 Propiedades del virus

El CTV es miembro del género monopartita *Closterovirus*, en la familia *Closteroviridae*. Está compuesto por partículas virales largas y flexibles de 2000 x 12 nm de tamaño. Su genoma consiste de RNA de cadena sencilla, de polaridad positiva (Karasev *et al.*, 1995) sobre el cual se ensamblan dos proteínas de cápside de 25 y 27 kDa, respectivamente (Febres *et al.*, 1996). El genoma del CTV se ha secuenciado por varios aislamientos y se ha determinado una talla molecular entre 19,226 y 19,302 nucleótidos dependiendo del aislamiento (Karasev *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1996; Pappu *et al.*, 1994; Vives *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Albiachi *et al.*, 2000; Suastika *et al.*, 2001). Se ha determinado que el RNA genómico (RNAg) del virus está organizado en 12 marcos de lectura (MDL) que codifican por lo menos 17 productos de naturaleza proteica con diferente función en el ensamblaje de las partículas virales y multiplicación del RNAg. Además, se ha determinado que existen dos regiones no traducibles (UTR, por sus siglas en inglés) flanqueando las regiones terminales 5' y 3' respectivamente (Karasev *et al.*, 1995; Pappu *et al.*, 1994). La porción 5' del genoma contiene dos MDL los cuales codifican proteínas asociadas con la multiplicación del virus que son expresadas a partir del RNAg. Por el contrario, en la porción 3' se encuentran diez MDL los cuales se expresan a partir de varios RNAs subgenómicos (RNAsg) (Hilf *et al.*, 1995) para codificar las proteínas de la cápside 25 (p25) y 27 (p27) kDa, respectivamente; la p25 que cubre alrededor del 97% de la superficie de los viriones, mientras que la p27 cubre el 3% restante y se encuentra en un porción terminal de las partículas virales a manera de cascabel; a las proteínas p6, p65, p61 se les atribuyen funciones de anclaje, ensamble y movimiento del virion; la proteína p23 tiene función adherencia al RNA en la acumulación asimétrica del mismo y la proteína p20 se acumula en forma de inclusiones amorfas en el floema de plantas infectadas (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995; Albiachi-Marti, 2012). Para las proteínas codificadas por los genes *p33*, *p18*, *p13* se les atribuyen funciones de infectividad en el rango de hospedantes (Tatineni y Dowson, 2012; Tatineni *et al.*, 2008).

3.2 Inclusiones virales y su relación con la proteína p20

El CTV induce inclusiones amorfas y cristalinas en plantas infectadas, particularmente en el floema y tejidos adyacentes, las cuales se consideran con valor diagnóstico por el CTV (Garnsey *et al.*, 1980; Bar-Joseph y Lee, 1989). Existen varios protocolos de tinción mediante microscopía de luz (Brlansky, 1987; Miao y Skaria, 2002) e inmunofluorescencia (Brlansky *et al.*, 1988) para determinar los sitios de acumulación del virus en los tejidos del hospedante, con base a la presencia de partículas virales y cuerpos de inclusión. Las inclusiones cristalinas están constituidas principalmente por acumulación de agregados de partículas virales (Garnsey *et al.*, 1980; Bar-Joseph y Lee, 1989). En estudios recientes se determinó que el constituyente principal de las inclusiones amorfas inducidas por el CTV corresponde a una proteína de 22-23 kDa, la cual es un producto codificado por el gen p20. Esta proteína denominada p20 tiene una alta afinidad por sí misma y se acumula en cantidades considerables en el floema de plantas infectadas con CTV (Gowda *et al.*, 2000). Se ha sugerido que la proteína p20 puede ser un factor de patogenicidad porque tiene actividad supresora del silenciamiento del RNA de las plantas de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* (Lu *et al.*, 2004).

3.3 Métodos de detección del CTV

Para la detección del CTV a partir de tejido de cítricos se han desarrollado diversos protocolos metodológicos, que difieren en el grado de aplicación, utilidad y sensibilidad. Existe la indexación biológica en lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) y otros hospedantes cítricos, de utilidad tanto la detección del virus a partir de tejido infectado y a la caracterización de razas del patógeno (Garnsey *et al.*, 1987, 1991); asimismo, existe también el empleo de microscopía electrónica para la observación de partículas virales (Bar-Joseph *et al.*, 1974b; Garnsey *et al.*, 1980), microscopía de luz para determinar la presencia de inclusiones amorfas y cristalinas inducidas por el virus (Brlansky, 1987; Brlansky y Lee 1990; Brlansky *et al.*, 1988; Garnsey *et al.*, 1980), pruebas moleculares diversas que incluyen hibridación con sondas específicas (Cevik *et al.*, 1996b; Narváez *et al.*, 2000), así como varios protocolos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) dirigidos mayormente para la discriminación de aislamientos débiles y severos (Ananthkrishnan *et al.*, 2010; Cevik *et al.*, 1996a; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009; Sambade *et*

al., 2003; Yokomi *et al.*, 2010), así como técnicas serológicas diversas (Rocha-Peña y Lee, 1991; Garnsey *et al.*, 1993). Los métodos de detección serológicos utilizados se basan en la técnica ELISA, en sus modalidades de sándwich de doble anticuerpo directo (ELISA DAS) (Bar-Joseph *et al.*, 1979) e indirecto (ELISA DASI) (Bar-Joseph y Malkinson, 1980), así como en su variante de inmunopresión (DTBIA) en membranas de nitrocelulosa (Garnsey *et al.*, 1993), para los cuales existen estuches comerciales disponibles en USA (Agdia y Biorad), España (INGENSA y Plan Print), Italia (Agritest) y Suiza (Bioreba). Los métodos de detección serológica son los de mayor uso debido a la capacidad de estos ensayos para analizar grandes volúmenes de muestras, su sensibilidad y especificidad, por lo que es aplicable en el establecimiento de programas de prospección y erradicación de plantas positivas, así como en estudios de la epidemiología de la enfermedad (Batista *et al.*, 2005; Cambra *et al.*, 2000; Polek, 2000). Dichos métodos se basan en anticuerpos desarrollados principalmente contra la proteína de la cápside presente en las partículas del virus, por lo que la serología contra proteínas no estructurales como método de detección no ha sido explorada para el CTV. El desarrollo de ensayos serológicos para detectar todos los aislados del CTV requiere de la obtención de anticuerpos, que tengan reactividad polivalente, es decir que sean capaces de detectar todos los aislamientos y razas del virus (Cambra *et al.*, 2000; Rocha-Peña y Lee, 1991). De esta manera, los mismos pueden ser empleados en los programas de cuarentena y erradicación, lo cual permitirá prevenir el movimiento de aislados severos a nuevas áreas y lograr un manejo integrado más efectivo del virus (Cambra *et al.*, 2000).

3.4 Producción de anticuerpos contra el CTV

3.4.1 Preparaciones purificadas del virus

La producción de anticuerpos para el CTV fue posible una vez que se desarrollaron métodos eficientes para purificar partículas del virus (Bar-Joseph *et al.*, 1974a; Gonsalves *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 1987, 1988; Tsuchizaki *et al.*, 1978). Los anticuerpos específicos anti-CTV a partir de preparaciones purificadas del virus se han producido mayormente en conejos y en menor cantidad en gallinas, cabras y ratones (Rocha-Peña y Lee, 1991). El título de los anticuerpos producidos contra el CTV y la reactividad de éstos para detectar al virus en tejido de cítricos dependen en gran medida

de la eficiencia de los métodos de purificación del virus, que se traduzca en cantidades suficientes de partículas virales para la inmunización, así como con la eficiencia de los mismos para eliminar las proteínas de la planta hospedante (Rocha-Peña y Lee, 1991). Desde finales de la década de 1970 se desarrollaron anticuerpos policlonales (Gonsalves *et al.*, 1978; Bar-Joseph y Malkinson, 1980; Lee *et al.*, datos no publicados; Gumpf *et al.*, datos no publicados), y monoclonales de reacción poliespecífica (Batista, 2001; Gumpf *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 2000; Öztürk y Çirakoglu, 2003; Vela *et al.*, 1986) y monoespecífica (Permar *et al.*, 1990), utilizando tradicionalmente como inmunógeno preparaciones del virus purificado. Actualmente existen en el mercado a nivel comercial estuches serológicos para la detección del CTV de varias compañías principalmente de USA (Agdia y Biorad), España (INGENSA y Plan Print), Suiza (Bioreba) e Italia (Agritest). La mayoría de los estuches comerciales se basan tanto en anticuerpos policlonales y monoclonales o mezclas de ellos preparados a partir de preparaciones purificadas del virus como inmunógeno.

3.4.2 Proteínas recombinantes

En los inicios de la década de 1990 surgieron metodologías para la producción de anticuerpos empleando como antígeno proteínas recombinantes de genes expresados en *Escherichia coli*, mayormente de la proteína de la cápside de varios virus fitopatógenos, incluyendo el CTV (Manjunath *et al.*, 1993; Nikolaeva *et al.*, 1995). El empleo de proteínas recombinantes como antígeno para la producción de anticuerpos con fines de detección, se considera de gran valor particularmente para virus que son difíciles de purificar, ya sea porque estos son inestables, mantienen niveles bajos de concentración del virus en los tejidos del hospedante o que en los procesos de purificación son propensos a degradación (Barbieri *et al.*, 2004; Petrovic *et al.*, 2003).

Para el caso del CTV, se han desarrollado anticuerpos principalmente contra la proteína recombinante p25 de la cápside (rCP). Manjunath *et al.*, 1993 (USA) produjeron un anticuerpo policlonal (CREC-35) a partir de la rCP empleando la cepa de *Escherichia coli* BL21 como vehículo de expresión. Los anticuerpos desarrollados los evaluaron por Western Blot y por ELISA. Por otra parte, Nikolaeva *et al.*, 1995 (USA) obtuvieron anticuerpos policlonales de la rCP del CTV expresada en *Escherichia coli*, el

cual fue evaluado con ELISA indirecta dando un título de 10^5 , mientras que en inmunoblot se obtuvo un título de 10^6 . También lo probaron con la prueba de ELISA-DASI y les funcionó como anticuerpo primario (tapizado) (datos no mostrados). El anticuerpo MBP-CP fue usado durante dos años en California para la indexación, certificación e inspección de infecciones del CTV en el Valle Central con resultados satisfactorios (Nikolaeva *et al.*, 1995). Tragón *et al.*, 1997 (Brasil) desarrollaron anticuerpos policlonales hacia la rCP CTV expresada en *Escherichia coli*. Sin embargo, tales anticuerpos mostraron resultados inconsistentes como anticuerpos primarios (de tapizado) bajo condiciones no desnaturalizantes; por lo anterior, su empleo a gran escala se restringió sólo como anticuerpo secundario (intermedio) en pruebas ELISA de doble sándwich indirecta (ELISA-DASI).

Sequeira y Nolasco 2002 (Portugal) produjeron anticuerpos policlonales basado solamente en rCP-CTV CTV expresada en *Escherichia coli* y evaluado por ELISA indirecta empleando el anticuerpo crudo, debido a que cuando empleaban la IgG purificada a 1mg/ml los resultados de absorbancia entre una muestra positiva y negativa eran casi iguales lo cual complica la discriminación.

Amin *et al.* (2004) en Egipto obtuvieron un anticuerpo policlonales contra la rCP del CTV expresada en *Escherichia coli*, el cual fue usado a una dilución 1:10,000 en ELISA indirecta, fue eficiente para atrapar al virus. Con la ELISA-DASI el anticuerpo fue usado a una dilución 10^{-4} para detectar al CTV. Este anticuerpo aumento su especificidad cuando se empleo como anticuerpo secundario (intermedio).

Iracheta Cárdenas *et al.* (2008) en México desarrollaron anticuerpos policlonales contra la rCP del CTV expresada en *Escherichia coli*; los anticuerpos desarrollados en cabra y conejo fueron evaluados por Western Blot y ELISA-DASI mostrando su reactividad efectiva para discriminar plantas sanas e infectadas con el CTV; asimismo, los anticuerpos fueron capaces de funcionar tanto como tapizado (anticuerpo primario) como intermedio (anticuerpo secundario).

En adición al CTV, se han desarrollado anticuerpos contra la rCP de diversos grupo taxonómicos de virus fitopatógenos, tal como: Bunyaviridae: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Vaira *et al.*, 1996); Closteroviridae: *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (Petrovic *et al.*, 2003); Potyviriidae: *Watermelon mosaic virus* (Barbieri

et al., 2004) y *Potato virus Y* (PVY) (Folwarczna *et al.*, 2008); Flexiviridae: *Apple stem grooving virus* (ASGV) (Nickel *et al.*, 2004); Bromoviridae: *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV) (Gulati-Sakhuja *et al.*, 2009) y *Prune dwarf virus* (Abou-Jawdah *et al.*, 2004); Geminiviridae: *Beet severe curly top virus* [BSCTV], *Beet mild curly top virus* [BMCTV] y *Beet curly top virus* [BCTV] (Durrin *et al.*, 2010); Luteoviridae: *Potato leafroll virus* (PLRV) (El-Attar *et al.*, 2010).

3.5 Desarrollo de anticuerpos contra proteínas no estructurales para la detección de virus fitopatógenos

El desarrollo de anticuerpos contra proteínas no estructurales del virus es una estrategia que ha sido poco explotada para algunos grupos de virus fitopatógenos. A continuación se hace una descripción de los trabajos realizados.

Tenuivirus El primer reporte lo constituye el empleo de anticuerpos dirigidos a una proteína no estructural del *Maize stripe virus* en la década de 1980 (Falk y Tsai, 1983; Falk *et al.*, 1987b). Ellos purificaron la proteína no estructural con un peso molecular de aproximadamente 16.3 kDa que forma agregados cristalinos, empleando un gradiente de CsCl; evaluaron primero al anticuerpo con la técnica de inmunodifusión y aumentaron la sensibilidad de tal manera que emplearon las técnicas de ELISA-DAS y ELISA indirecta, obteniendo resultados muy satisfactorios con ELISA indirecta, ya que detectaron a la proteína no estructural del *Maize stripe virus* en diluciones de 10^{-7} de la savia de la planta, mediante el cual demostraron su eficiencia mayor sobre anticuerpos desarrollados contra la proteína no estructural que con los anticuerpos desarrollados contra la proteína de la cápside del virus (Falk y Tsai, 1983; Falk *et al.*, 1987b), estos mismos autores desarrollaron anticuerpos contra la proteína no estructural de un peso molecular alrededor de 16 kDa que forma cuerpos de inclusión, de otros tenuivirus como *Rice* hoja blanca y *Echinochloa* hoja blanca (Falk *et al.*, 1987a); los anticuerpos desarrollados se evaluaron por ELISA indirecta dando como resultado que solo reaccionaban con sus respectivas muestras infectadas con el virus; no se obtuvo reacción inespecífica con otro tipo de tenuivirus. Miranda y Koganezawa (1995), desarrollaron anticuerpos contra la proteína no estructural (NCP) del *Rice grassy stunt virus* debido a

que la NCP se produce en suficientes cantidades en tejido infectado; la proteína NCP fue purificada por precipitación diferencial, el anticuerpo fue evaluado por ELISA indirecta obteniendo un resultado mayor a una dilución de 10^{-5} del antígeno dando una OD= 2.0 como máximo (10^{-3}) y 0.2 como mínimo (10^{-7}).

Trichovirus En 1997 se reportó el desarrollo de anticuerpos específicos contra la proteína no estructural del grapevine virus A (Rubinson *et al.*, 1997); estos autores tuvieron mayores niveles de detección del virus en plantas infectadas por medio de análisis de inmunoblot, en comparación con los obtenidos con anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante de la cápside.

Closterovirus En el año 2000 se reportó el desarrollo de un anticuerpo policlonal producido en conejo específico contra la proteína no estructural p20 del CTV (Gowda *et al.*, 2000); dicho anticuerpo mediante el análisis de Western Blot detectó una proteína alrededor de 22-23 kDa, que se acumuló en niveles relativamente altos en tejido de cítricos infectados con el CTV, pero no en tejido de cítricos sano. Además también lo evaluaron mediante localización *in situ* empleando microscopía electrónica y el antisuero anti-p20 fue conjugado con oro, así lograron detectar los cuerpos de inclusión, inclusiones amorfas y partículas del virus, en el floema de tejido infectado con el CTV empleando el aislamiento T36.

Potyvirus En 1995, Jan y Yeh, 1995; purificaron y localizaron *in situ* las propiedades serológicas comparativas de *Passionfruit woodiness virus* que codifica la proteína de inclusión amorfa y otras dos proteínas del virus. Estos investigadores purificaron la proteína de inclusión amorfa de plantas infectadas con PWV y desarrollaron un anticuerpo policlonal específico. Emplearon métodos de inmunocitoquímica con microscopía de luz y electrónica utilizando proteína A marcada con oro para comprobar la relación de la proteína de inclusión amorfa con las inclusiones específicas del virus *in situ*. Debido a las diferencias de tamaño y la forma de las inclusiones amorfas inducidas por diversos virus, el éxito de la purificación depende de una evaluación cuidadosa paso a paso de los tratamientos. Por lo tanto, ellos purificaron la proteína de inclusión amorfa

con Tritón X-100, posteriormente fue tratada con SDS la cual fue usada como inmunógeno, los anticuerpos resultantes fueron capaz de reconocer los sitios antigénicos de la proteína de inclusión amorfa in situ. El anticuerpo fue evaluado por la prueba de inmunodifusión-SDS, ELISA indirecta e inmunoblot, dicho anticuerpo solo reaccionó con sus antígenos homólogos purificados y no se observó reacción cruzada en las combinaciones heterólogas. Los resultados indican que las tres proteínas (de la cápside, inclusión citoplasmática e inclusión amorfa) serológicamente no tienen relación.

Hust *et al.*, 2002, reportaron la producción de un género-específico de anticuerpo recombinante (scFv) usando una proteasa recombinante del potyvirus. Dicho anticuerpo fue evaluado por Dot Blot, pero en sus experimentos empleaban un segundo y tercer anticuerpo como control. La producción de una proteína de la fusión de scFv102 con la fosfatasa alcalina permitió la detección directa de plantas infectadas con potyvirus sin usar los anticuerpos secundarios. Por lo tanto, el anticuerpo combinado con el método de solubilización para los cuerpos de inclusión está bien adaptado porque es barato, rápido y la técnica es sensible para plantas infectadas y no infectadas.

Nováková *et al.*, 2006, reportaron la expresión de una parte de la proteína no estructural P3 del *Potato virus A* en *Escherichia coli* con el fin de la preparación del anticuerpo y de la inmunodetección de la proteína no estructural P3 en material vegetal.

Pomovirus En el año 2006, se reportó el desarrollo de anticuerpos contra la proteína no estructural de triple bloque 1 del *Potato mop-top virus* (Cеровска *et al.*, 2006), los anticuerpos obtenidos fueron probados para la detección de PMTV en *Nicotiana benthamiana* producida en el laboratorio y el hospedero natural *Solanum tuberosum* por ELISA así como también por Western Blot. Los antisueros obtenidos son más convenientes para el análisis de Western Blot de plantas infectadas que para ELISA.

Virus de vertebrados También existen reportes de producción de anticuerpos de virus de animales tal es el caso para las proteínas no estructurales 3A, 3B y 3AB recombinante del virus de la enfermedad aftosa en ganado (Yakovleva *et al.*, 2006), los cuales fueron evaluados por ELISA indirecta a diferentes diluciones de 1:32,000 para 3A, 1:800 para

3B, 1:3200 para 3AB, en la ELISA indirecta 3A se mostro la mejor combinación de especificidad (100%) y sensibilidad (93.8%).

En el 2005 se reportó la producción de un anticuerpo contra la proteína no estructural recombinante de waterfowl parvoviruses expresada en *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 2005), el waterfowl parvoviruses es dividido en *Goose parvovirus* (GPV) y *Muscovy duck parvovirus* (MDPV), dicho anticuerpo fue evaluado por Western Blot. Para la detección de anticuerpos contra GPV y MDPV, una ventaja agregada de usar la proteína no estructural (NS) recombinante como el antígeno es que puede discriminar entre los pájaros infectados y vacunados con la proteína recombinante del cápside (VP2 y VP3) la cual es utiliza como vacuna. El multiscreen de ensayos de Western Blot usando la proteína no estructural (NS) recombinante de GPV rindió resultados constantes con los ensayos convencionales de Western Blot, indicando que puede ser conveniente para investigación a gran escala para la presencia de anticuerpos GPV-específicos o MDPV-específicos en sueros del ganso o del pato.

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Anticuerpos utilizados: Se emplearon anticuerpos anti-p20 producidos en conejo (claves 201 y 202) y en rata (claves R1 y R2) previamente desarrollados en el laboratorio L4 del Instituto de Biotecnología FCB-UANL contra la proteína recombinante p20 expresada en *Escherichia coli* (Murga-Sánchez *et al.*, 2010). Los anticuerpos anti-p20 de conejo (López-Alvarado, 2009) y de rata (Salazar-Martínez, 2011) se obtuvieron de una manera similar según lo descrito por Iracheta-Cárdenas *et al.* (2008) para la proteína recombinante p25 del CTV. Para la inmunización en conejos (*Oryctolagus cuniculus* L.), se emplearon individuos de dos meses de edad de la raza Nueva Zelanda; se aplicaron cuatro inyecciones de aproximadamente 100 µg de proteína recombinante p20 purificada mediante SDS-PAGE, con intervalos de 15 y 7 días. La primer dosis se emulsificó con un ml adyuvante completo de Freund y se aplicó en forma subcutánea; la dosis segunda y tercera se emulsificaron con un ml adyuvante incompleto y se aplicaron en forma intramuscular; la cuarta inyección se aplicó sin adyuvante siete días después de la tercer inyección. Los conejos se sangraron antes de la inmunización y una semana después de la cuarta inyección. El antisuero de cada muestra se recuperó mediante centrifugación y se conservó a -20 °C previo a su empleo (López-Alvarado, 2009). Para el caso de la inmunización en ratas, se emplearon ratas albinas (*Rattus norvegicus* Berkenhout) de 10 semanas de edad; la producción de anticuerpos anti-p20 se indujo en tres ratas hembras (claves R1, R2, R3). Se realizaron 3 inmunizaciones intradérmicas cerca de ganglios de las patas posteriores con 50 µg emulsificadas con adyuvante completo e incompleto según fuera el caso. La sangre se extrajo mediante punción cardiaca, se incubó por dos horas a 37 °C, posteriormente se colocó en refrigeración toda la noche para separar el paquete celular. Finalmente, se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min y el suero se recolectó en tubos de 2 ml. El suero permaneció a -70 °C almacenado hasta su uso (Salazar-Martínez, 2011).

4.2 Purificación de anticuerpos: Las muestras de antisuero se sometieron a precipitación con sulfato de amonio para la purificación de inmunoglobulinas G (IgG). A 2 ml de antisuero se agregaron 8 ml de sulfato de amonio al 36%, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,000 Xg durante 20 min; el

sobrenadante se eliminó mediante decantación y el precipitado se resuspendió en 2 ml de agua bidestilada y se procedió a una segunda precipitación, bajo la misma metodología anteriormente descrita. Las IgGs obtenidas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida para determinar el grado de pureza obtenido. Se prepararon alícuotas ajustando la concentración a 1 mg/ml mediante espectrofotometría ($DO_{280nm} = 1.45$) (Clark *et al.*, 1986). Se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su evaluación.

4.3 Evaluación de los anticuerpos anti-p20 - Western blot: La evaluación de los anticuerpos obtenidos se llevó a cabo mediante ensayos de Western blot, utilizando como antígeno el cultivo de *E. coli* transformada con el gen *p20* (Murga-Sánchez *et al.*, 2010) y tejido de cítricos sano e infectado por el CTV de diferentes orígenes (Tabla 1), los cuales se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras, seguida de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (Ver detalles apéndice B). Terminada la electrotransferencia se retiró la membrana y se tiñó con Rojo Ponceau al 0.01% por 5 min, se enjuagó con agua corriente para quitar el exceso de colorante y se procedió a realizar la inmunodetección. La membrana se bloqueó con buffer TBS + 2% de Tween 20 por 15 min, posteriormente se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno con TBS 1X. Se hicieron las diversas diluciones del antisuero a evaluar y se incubó por toda la noche a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación. Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo, se repitió el paso de lavado con buffer TBS-Tween 0.05%. Se colocó el anti-IgG de conejo comercial acoplado a fosfatasa alcalina de sigma A3812 y se dejó incubando 1 h en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se repitió el paso de lavado con buffer TBS-Tween 0.05%. Por último se añadió la solución cromogénica BCIP/NBT hasta que se observó una reacción colorimétrica (Ver apéndice A para composición de soluciones).

4.4 Muestras de tejido de plantas de cítricos infectadas por el CTV

Se utilizaron 30 muestras de tejido de plantas de cítricos infectadas por el CTV (Tabla 1). Nueve muestras correspondieron a aislamientos del CTV del estado de Nuevo León, de los municipios de Montemorelos, Linares y General Terán; siete muestras de

California y tres de Florida de los Estados Unidos de Norteamérica. Las muestras se emplearon como tejido desecado o tejido fresco según su origen.

Tabla 1. Colección de aislamientos del CTV del estado de Nuevo León, California y Florida evaluados mediante ELISA-DASI utilizando los antisueros anti-p20 de conejo clave 201 como tapizado y de rata clave R1 como intermedio.

No. de muestra	Clave de tejido	Origen	Reactividad al CTV	Referencia
1	4038 L5 A14 ^{1/}	Linares NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
2	GT A2 (Toronja)	General Terán NL	+	López-Alvarado, 2009 y Núñez-Sánchez, 2012
3	GT SUR (Toronja)	General Terán NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
4	GT A27 (Toronja)	General Terán NL	+	López-Alvarado, 2009; Salazar-Martínez, 2011 y Núñez-Sánchez, 2012
5	GT A272 (Toronja)	General Terán NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
6	GT A30 (Toronja)	General Terán NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
7	T166 L3 A4 ^{1/}	Montemorelos NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
8	T166 L21 A6 ^{1/}	Montemorelos NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
9	T166 L47 A16 ^{1/}	Montemorelos NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
10	T166 L16 A8 ^{1/}	Montemorelos NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
11	T166 L48 A8 ^{1/}	Montemorelos NL	+	Núñez-Sánchez, 2012 y Sandoval-Alejos, 2005
12	T166 L46 A8 ^{1/}	Montemorelos NL	+	Núñez-Sánchez, 2012
13	SY 568 3448	California	+	Núñez-Sánchez, 2012
14	SY 568 5095	California	+	Núñez-Sánchez, 2012
15	SY 568 5066	California	+	Núñez-Sánchez, 2012
16	CCTEA 5067	California	+	Núñez-Sánchez, 2012
17	CCTEA 466	California	+	Núñez-Sánchez, 2012
18	CCTEA 457	California	+	Núñez-Sánchez, 2012
19	CCTEA 442	California	+	Núñez-Sánchez, 2012
20	T66	Florida	+	Núñez-Sánchez, 2012 y Sandoval-Alejos, 2005
21	T36	Florida	+	Núñez-Sánchez, 2012 y Sandoval-Alejos, 2005
22	T55	Florida	+	Sandoval-Alejos, 2005
23	Naranja sano CEGET ^{2/}	CEGET	-	Núñez-Sánchez, 2012
24	Limón mexicano sano CEGET ^{2/}	CEGET	-	Núñez-Sánchez, 2012
25	GT SS2007 (Toronja)	General Terán NL	+	Salazar-Martínez, 2011
26	F3A1 (Naranja) sano ^{2/}	CEGET	-	Salazar-Martínez, 2011
27	F4A1 (Naranja) sano ^{2/}	CEGET	-	Salazar-Martínez, 2011
28	F7A1 (Limón) sano ^{2/}	CEGET	-	Salazar-Martínez, 2011
29	A11 (Toronja)	General Terán NL	+	López-Alvarado, 2009 y Salazar-Martínez, 2011
30	190220303360115 árbol 11 (Toronja)	General Terán NL	+	Arrieta-García, 2009

^{1/} Tejido de limón mexicano de la colección de aislamientos del CTV del Campo Experimental General Terán del INIFAP

^{2/} Tejido de plantas sanas del Campo Experimental General Terán del INIFAP

4.5 Evaluación de los antisueros anti-p20 - ELISA indirecta: Para determinar la reactividad de los antisueros anti-p20 desarrollados con la proteína recombinante p20 del CTV, se evaluaron éstos en ELISA indirecta colocando el antígeno directo en las placas de microtitulación NUNC Polysorp con los tratamientos indicados en la Tabla 2. Además como control del ensayo se usó un blanco el cual se deja el pocillo de la placa vacío y solo lleva sustrato al final del ensayo, sin tapizar (sin antígeno) y buffer de Carbonatos el cual se emplea para la extracción de los homogenizados.

Las muestras de savia de las plantas se extrajeron a partir de 1g de tejido más 10 ml de buffer de carbonatos 1X; se trituraron en un mortero hasta extraer toda la savia presente. Se colocaron 100 µl del homogenizado de plantas sanas e infectadas en las placas de microtitulación NUNC Polysorp y se incubaron por 17 horas a 5 °C. Pasado el tiempo de incubación se lavaron las placas de microtitulación con buffer de PBST 0.05% 4 veces (la segunda lavada se dejó 5 min). Se colocaron 100 µl del antisuero anti-p20 de conejo y de rata con sus diferentes diluciones en buffer de PBST 0.05%-PVP al 2%-BSA al 0.2%, se dejaron incubando 4 horas a 37 °C. Se repitió el paso de lavado. Posteriormente se agregó 100 µl del anticuerpo conjugado anti-IgG conejo AP de sigma A3812 y anti-IgG rata-AP de sigma A8438 con su respectiva dilución en buffer de PBST 0.05%-PVP al 2%-BSA al 0.2%, se dejaron incubando 4 horas a 37 °C. Se repitió el paso de lavado. Posteriormente se colocó el sustrato PNPP a toda la placa y en intervalos de media hora, una, dos y hasta tres horas, se hicieron lecturas en 405nm en el lector de ELISA Biorad 550 (Falk y Tsai, 1983).

Tabla 2. Evaluación de la reactividad de anticuerpos anti-p20 contra el CTV en pruebas de ELISA indirecta.

No. de experimento	Antígeno de tapizado	Antisuero anti-p20	Conjugado	Sustrato
1	Savia de plantas sanas e infectadas	anti-p20 conejo (201)	anti-IgG conejo-AP Sigma A3812	pNPP
2	Savia de plantas sanas e infectadas	anti-p20 rata (R1)	anti-IgG rata-AP Sigma A8438	pNPP

4.6 Establecimiento de las condiciones óptimas de ELISA-DASI: Una vez determinada la reactividad de los anticuerpos desarrollados en ELISA indirecta, se establecieron las condiciones de reacción en ensayos de ELISA-DASI (Tabla 3). Se determinaron las concentraciones óptimas de IgG de conejo anti-p20 como anticuerpo de tapizado y de IgG de rata anti-p20 como anticuerpo intermedio y viceversa, según se describe en Tabla 2. Los anticuerpos previamente ajustados a una concentración de IgG de 1 mg/ml se emplearon para tapizar una placa de microtitulación NUNC MAXISORP con 100 µl en buffer de carbonatos 1X y se incubó 6 horas a 37 °C. Se procedió a lavar la placa con buffer TBST 0.05%, cuatro veces manteniendo el segundo lavado durante 5 min. Se adicionó 100 µl de homogenizado de tejido sano e infectado del CTV según se describe en la Tabla 2 y se incubó durante 18 horas a 5 °C. Posteriormente se lavó como se describió anteriormente y se adicionó el anticuerpo intermedio a las diluciones descritas en la tabla 3, incubando por 4 horas a 37 °C; se lavó y se adicionó e incubó durante 2 horas a 37 °C el conjugado comercial a la dilución recomendada por el fabricante. Después de la incubación se lavó y agregó el sustrato pNPP y se registró la absorbancia a 405nm.

Tabla 3. Evaluación de combinaciones de anticuerpos específicos anti-p20 desarrollados en animales inmunizados con la proteína recombinante no estructural p20 del CTV en ensayos de ELISA-DASI.

No. de experimento	Anticuerpo de tapizado	Antígeno	Anticuerpo Intermedio	Conjugado	Sustrato
1	anti-p20 de conejo (201)	Savia de plantas sanas e infectadas	anti-p20 de rata (R1)	anti-IgG rata-AP Sigma A8438	pNPP
2	anti-p20 de conejo (201)	Savia de plantas sanas e infectadas	anti-p20 de rata (R2)	anti-IgG rata-AP Sigma A8438	pNPP
3	anti-p20 de rata (R1)	Savia de plantas sanas e infectadas	anti-p20 de conejo (201)	anti-IgG conejo-AP Sigma A3812	pNPP
4	anti-p20 de rata (R2)	Savia de plantas sanas e infectadas	anti-p20 de conejo (201)	anti-IgG conejo-AP Sigma A3812	pNPP

La distribución de los anticuerpos y muestras se dispuso como se describe en la Tabla 4. Se realizaron tres experimentos en forma independiente para determinar la concentración óptima de anticuerpo de tapizado y anticuerpo intermedio, de las cuatro combinaciones descritas en la tabla 2. Una vez que se encontró las condiciones óptimas para ELISA-DASI, se evaluaron 20 muestras de tejido de árboles de cítricos positivos y negativos del CTV previamente identificados con un sistema de detección establecido para la partícula viral de la cápside (p25) del CTV (Iracheta Cárdenas *et al.*, 2008).

Tabla 4. Distribución de los anticuerpos anti-p20 en la microplaca, en la parte superior se observa el anticuerpo empleado como tapizado y en la parte inferior el anticuerpo empleado como intermedio con sus diferentes diluciones; en el costado se muestran las concentraciones empleadas con el anticuerpo de tapizado y los controles internos del experimento.

	Tapizado anti-p20 conejo						anti-p20 rata											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Tapizado					
A													Blanco					
B													9 μ g					
C													6					
D													3					
E													1					
F													Sin tapizado					
G													Sin antígeno					
H													Sin intermedio					
	1:15,000			1:9,000			1:3,000			1:15,000			1:9,000			1:3,000		
Intermedio	anti-p20 rata						anti-p20 conejo											

4.7 Modelo estadístico: Se empleó la prueba de “T de student” en la cual se formularon las siguientes hipótesis: Hipótesis nula (H_0) = no existe diferencia significativa entre los anticuerpos anti-p25 combinación CB/C9 (cabra y conejo) y los anticuerpos anti-p20 combinación 201/R1(conejo y rata); Hipótesis alterna (H_a) = existe diferencia significativa entre los anticuerpos anti-p25 combinación CB/C9 (cabra y conejo) y los anticuerpos anti-p20 combinación 201/R1(conejo y rata) con un grado de significancia de $\alpha= 0.01$.

Hipótesis: H_0 : combinación CB/C9 (anti-p25) = combinación 201/R1 (anti-p20)

H_a : combinación CB/C9 (anti-p25) \neq combinación 201/R1 (anti-p20)

Grado de significancia: $\alpha= 0.01$

5.0 RESULTADOS

5.1 Purificación de anticuerpos

En la Figura 1 se muestran los resultados de la purificación de las inmunoglobulinas G (IgG) a partir de cada uno de los antisueros anti-p20 de conejo (clave 201, 202 y 204) y de rata (clave R1 y R2). Se determinó el grado de pureza de las IgG obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%. Con la precipitación selectiva se logró obtener proteínas principalmente de alrededor de 130 y 60 kDa (Fig. 1), con esta solución se prepararon alícuotas de 1 mg/ml, mediante espectrofotometría ($DO_{280nm} = 1.45$); en los carriles 3, 4, 5, 6 y 10 se aprecian proteínas principalmente de 130 kDa que son las inmunoglobulinas G (IgG) obtenidas del antisuero de conejo y en menor proporción de alrededor de 60 kDa que es albúmina sérica como se muestran en los carriles 3 y 4; por otra parte, en los carriles 7 y 8 se aprecian dos proteínas de igual proporción de alrededor de 250 kDa y de 140 kDa la cual representa la inmunoglobulina G (IgG) obtenida del antisuero de rata, mientras que en el carril 9 se observa una proteína muy prominente de 130 kDa que es la inmunoglobulina G (IgG) obtenida del antisuero de cabra y en menor proporción de alrededor de 60 kDa, que corresponde a la albúmina sérica. La diferencia que se observa en la Figura 1 con respecto al peso molecular de la inmunoglobulina G es que fueron producidas en diferentes animales de laboratorio, si observamos los carriles 3, 4, 5, 6 y 10 son muy similares y estos fueron obtenidos de conejo, mientras el carril 9 también se observa similar a los anticuerpos producidos en conejo; sin embargo, este fue obtenido de cabra, por otra parte en los carriles 7 y 8 si se observa diferencia entre los pesos moleculares de las proteínas separadas, estos antisueros fueron obtenidos de rata. Grodzki y Berenstein (2010) hacen mención que la precipitación de inmunoglobulinas saturadas con sulfato de amonio depende de la subclase de inmunoglobulina y de la especie de animal en la que se produjo; por ejemplo, para rata y ratón se requiere de un 40-50 % de saturación con sulfato de amonio para precipitar las inmunoglobulinas G (IgG), mientras que para conejo y cabra se emplea un porcentaje al 33 %. Esto significa que los antisueros de rata no fueron purificados con la concentración adecuada de sulfato de amonio para obtener una eficiente purificación, debido a eso se obtuvieron dos bandas de la misma

proporción y una de 250 kDa y otra de 140 kDa, debido a que se empleó la misma metodología para todos los antisueros usados.

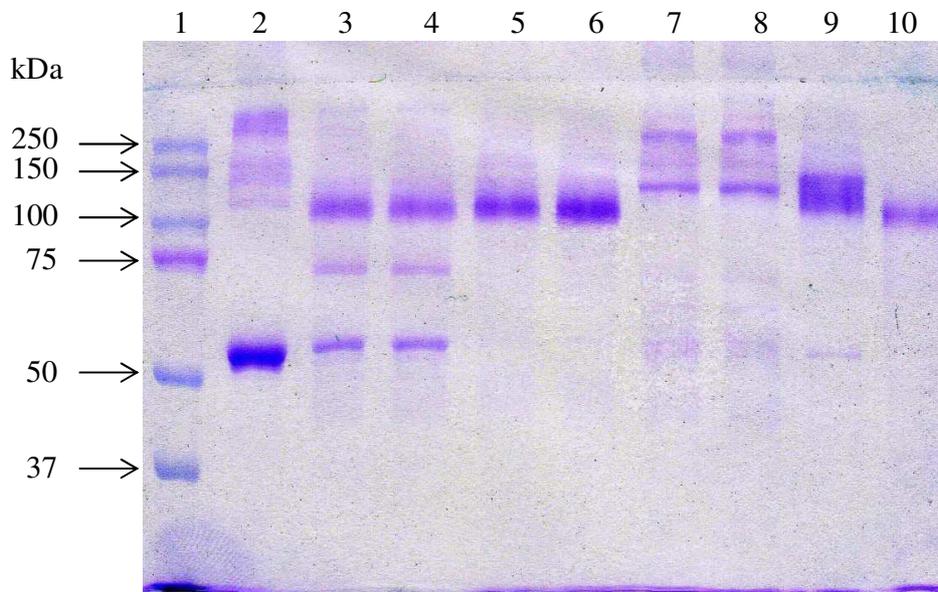


Figura 1. Purificación de los antisueros anti-p20 y anti-p25, electroforesis de poliacrilamida al 8%. **1.** Marcador Kaleidoscope Biorad. **2.** Albúmina de suero bovino comercial de Sigma A 9647 1mg/ml. **3.** anti-p20 de conejo 201 en agua bidestilada. **4.** anti-p20 de conejo 201 en Buffer TB. **5.** anti-p20 de conejo 202 en Buffer TB. **6.** anti-p20 de conejo 204 en Buffer TB. **7.** anti-p20 de rata R1 en Buffer TB. **8.** anti-p20 de rata R2 en Buffer TB. **9.** anti-p25 de cabra CB en Buffer TB (control). **10.** anti-p25 de conejo C9 en Buffer TB (control).

5.2 Evaluación de los anticuerpos anti-p20 - Western Blot

La evaluación de los anticuerpos obtenidos se llevó a cabo mediante ensayos de inmunodetección en Western Blot, utilizando como antígenos el cultivo de *E. coli* transformado con el gen *p20* (Murga-Sánchez *et al.*, 2010) y tejido de cítricos sano e infectado por el CTV de diferentes orígenes (Tabla 1). Para este ensayo se empleó una concentración de 0.001 mg/ml del anticuerpo de rata ajustado a 1mg/ml y una concentración de 0.0003 mg/ml del anticuerpo de conejo ajustado a 1mg/ml (Fig. 2); se obtuvo una señal clara y evidente alrededor de 16-19 kDa en la membrana tratada con el anticuerpo de rata, en el carril 2 de la Figura 2 se observan dos proteínas las cuales corresponden al cultivo de *E. coli* transformado con el gen *p20* (Murga-Sánchez *et al.*,

2010), esto significa que el anti-p20 de rata reconoce otra proteína de *E. coli* que se encuentra cercana a la proteína p20 recombinante; mientras que en el carril 5 de la Figura 2, también se observan dos proteínas de 14 y 17 kDa, estas proteínas corresponden a la muestra de cítricos infectado con el CTV, lo cual indica que la proteína p20 no estructural pesa alrededor de 17-18 kDa y la otra proteína de 14 kDa puede ser degradación de la muestra; por otra lado, la banda que se observa alrededor de 12 kDa es el frente de corrida de la muestra de cítricos. Con respecto a la membrana tratada con el anticuerpo de conejo muestra mayor reactividad ya que solo reconoce la proteína p20 recombinante del cultivo de *E. coli* transformado con el gen *p20* (Murga-Sánchez *et al.*, 2010) y la proteína de la muestra de cítricos infectado con el CTV las cuales pesan alrededor de 16-17 kDa como se muestra en los carriles 6 y 9 (Figura 2). En lo que respecta a los homogenizados de muestras de cítricos sanos no se aprecia señal (Fig. 2, carril 3, 4, 7 y 8).

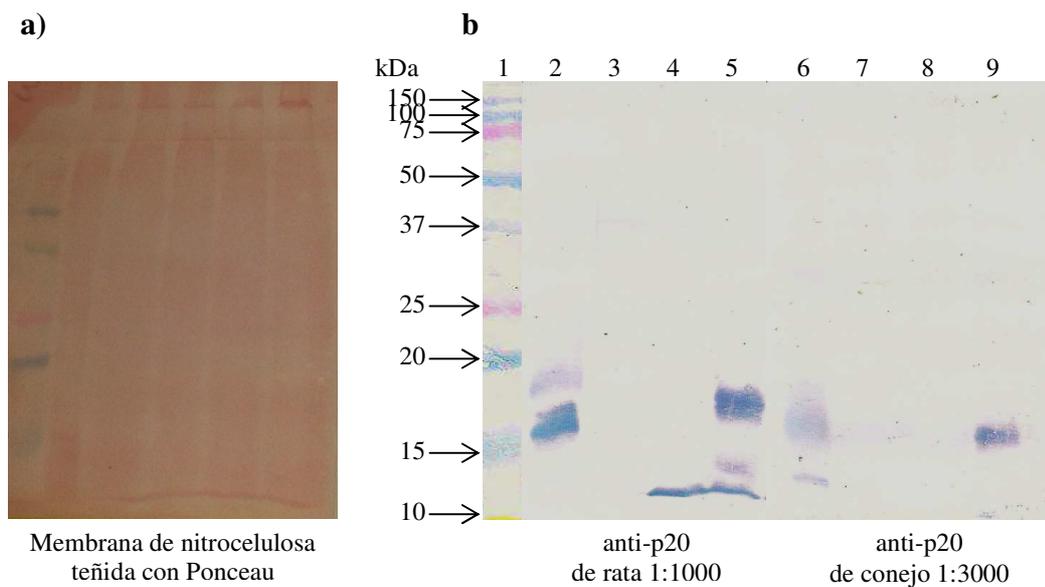


Figura 2. Evaluación de la reactividad de los antisueros anti-p20 mediante Western-Blot. **a)** Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. **b)** Inmunodetección. 1. Marcador Kaleidoscope Biorad. 2 y 6. *E. coli* transformado con el gen *p20*. 3 y 7. Homogenizado de tejido de cítricos muestra 26. 4 y 8. Homogenizado de tejido de cítricos muestra 28. 5 y 9. Homogenizado de tejido de cítricos infectado con el CTV muestra 2 (Ver Tabla 1 para ubicar las muestras).

Posteriormente se realizó otro ensayo para evaluar mediante WB, una mezcla de cultivos de *E. coli* transformados con el gen *p20* (Murga-Sánchez *et al.*, 2010) y el gen *p25* (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) a una dilución 1:10 y muestras de tejido de cítricos sano e infectado por el CTV, previamente consideradas positivas al ser evaluadas por ELISA-DASI mediante el sistema de detección de la proteína mayoritaria de la cápside p25 del CTV (Sandoval-Alejos, 2005). Como se muestra en la Figura 3; en la cual se aprecia que todas las muestras reaccionaron con el anticuerpo anti-p20 de conejo (201) a una concentración de 0.0003 mg/ml incubado toda la noche a 5 °C, los resultados muestran que entre los aislamientos tienen variación de la señal comparada con el anticuerpo anti-p25 de conejo (C9) a una concentración de 0.0003 mg/ml tiene una señal mucho mayor y evidente.

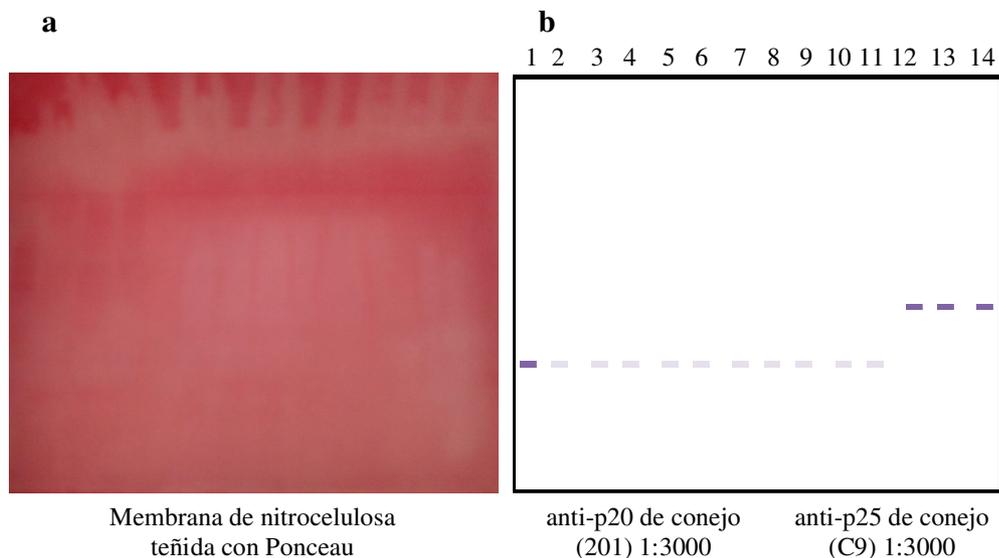


Figura 3. Reactividad con anti-p20 y anti-p25 con tejido de cítricos de diferentes orígenes (Nuevo León, California y Florida) mediante Western Blot. **1 y 12.** Mezcla de cultivo de cultivos de *E. coli* transformados con el gen *p20* y el gen *p25* a una dilución 1:10. **2 y 13.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 21. **3 y 14.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 20. **4.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 22. **5.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 15. **6.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 16. **7.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 25. **8.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 7. **9.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 10. **10.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 11. **11.** Homogenizado de tejido de cítricos muestra 12 (Ver Tabla 1 para ubicar las muestras).

5.3 Evaluación de los antisueros anti-p20 - ELISA indirecta

Para determinar la reactividad de los antisueros desarrollados contra la proteína no estructural p20 recombinante (anti-p20), éstos fueron evaluados en ELISA indirecta colocando el antígeno directo, en este ensayo se emplearon homogenizados de tejido de cítricos sanos muestra 28 y muestra 26; y homogenizados de tejidos de cítricos infectados con el CTV muestra 2, muestra 29 y muestra 4 (ver Tabla 1); como control del ensayo se usó un blanco el cual se deja el pocillo de la placa vacío y solo lleva sustrato al final del ensayo, sin tapizar (sin antígeno) y buffer de Carbonatos el cual se emplea para la extracción de los homogenizados, con los tratamientos indicados en la Tabla 2; se emplearon los antisueros anti-p20 de conejo a una dilución 1:5000 y de rata a una dilución 1:3000. Para este ensayo se pre-estableció que los valores de absorbancia a 405nm (DO_{405nm}) menores de 0.100 se consideraron como resultados negativos, mientras que los valores mayores a 0.100 se consideraron positivos. Los valores de absorbancia DO_{405nm} de dos repeticiones de cada muestra comprendieron tejido de cítricos sano e infectado con el CTV, sin tapizar, con buffer de Carbonatos. En este ensayo no hubo discriminación entre las plantas positivas y negativas del CTV, debido a que todos los antisueros dieron valores similares de absorbancia en el rango de 0.027 y 0.380, como se muestra en la Tabla 5. A continuación se realizó una modificación en el buffer de extracción, para esto se emplearon dos buffer de extracción uno de Carbonatos y otro compuesto de TBST + PVP a los cuales se les agregó Tritón X-100 al 2.5% (Jan y Yeh, 1995); en este ensayo solo se evaluaron los antisueros de conejo clave 202 y de rata clave R1 a una dilución 1:1,000. Con esta modificación no se obtuvo una discriminación de plantas positivas y negativas del CTV, ya que al agregarle el Tritón X-100 al 2.5% los valores de absorbancia fueron para el caso del anti-p20 (202) de 0.485-0.560 para las muestras positivas al CTV y de 0.055-0.615 en las negativas o sanas (Tabla 6); mientras que para el tratado con el anti-p20 (R1) los resultados oscilaron entre 0.170-0.425 para las muestras positivas al CTV y de 0.040-0.155 en las negativas o sanas (Tabla 6), para esto se realizaron tres experimentos independientes usando la misma metodología y en los tres ensayos se observó el mismo comportamiento en los valores de absorbancia.

Tabla 5. Densidades ópticas obtenidas por ELISA indirecta con extractos crudos de tejido de cítricos sanos e infectados con el CTV, utilizando antisueros policlonales anti-p20 y anti-p25.

Antígeno	Valores de OD 405nm* Antisero					anti-p25
	202	204	R1	R2	R3	usado como referencia
	Dilución 1:5000			Dilución 1:3000		C9
Sin tapizar (sin antígeno)	0.005 (0.000)	0.010 (0.010)	0.014 (0.005)	0.010 (0.001)	0.008 (0.002)	0.007 (0.001)
Buffer de extracción (control negativo)	0.063 (0.004)	0.062 (0.006)	0.091 (0.004)	0.030 (0.006)	0.041 (0.003)	0.017 (0.002)
Muestra 28 (tejido sano)	0.326 (0.004)	0.317 (0.002)	0.161 (0.007)	0.269 (0.064)	0.234 (0.020)	0.011 (0.000)
Muestra 26 (tejido sano)	0.201 (0.001)	0.099 (0.001)	0.094 (0.000)	0.138 (0.006)	0.098 (0.006)	0.012 (0.004)
Muestra 2 (tejido positivo)	0.285 (0.011)	0.170 (0.006)	0.129 (0.003)	0.165 (0.006)	0.124 (0.016)	0.071 (0.000)
Muestra 29 (tejido positivo)	0.174 (0.011)	0.101 (0.006)	0.054 (0.004)	0.103 (0.001)	0.073 (0.004)	0.027 (0.004)
Muestra 4 (tejido positivo)	0.380 (0.030)	0.151 (0.004)	0.197 (0.003)	0.202 (0.004)	0.127 (0.003)	0.027 (0.004)
Rango	0.174-0.380	0.101-0.170	0.054-0.197	0.103-0.202	0.073-0.127	0.027-0.071

*El promedio de dos repeticiones en el ensayo

El número en paréntesis es el valor de la desviación estándar
(Ver Tabla 1 para ubicar las muestras)

Tabla 6. Evaluación de los antisueros anti-p20 de conejo y rata (202 y R1) empleando ELISA indirecta con extractos crudos de tejido de cítricos sanos e infectados con el CTV homogenizados con dos diferentes buffer de extracción y tratados con tritón X-100 al 2.5%.

Antígeno con la variante del buffer de extracción	Valores de OD 405nm*	
	Antisuero	
	202	R1
	Dilución 1:1000	
Sin tapizar (sin antígeno)	0.228 (0.039)	0.065 (0.021)
Albúmina de suero bovino	0.055 (0.007)	0.040 (0.000)
Muestra 4 CO3 1X (tejido positivo)	0.485 (0.007)	0.250 (0.014)
Muestra 4 TBST+PVP (tejido positivo)	0.550 (0.028)	0.275 (0.049)
Muestra 2 CO3 1X (tejido positivo)	0.560 (0.028)	0.170 (0.014)
Muestra 2 TBST+PVP (tejido positivo)	0.540 (0.014)	0.425 (0.035)
Muestra 28 CO3 1X (tejido sano)	0.265 (0.007)	0.155 (0.035)
Muestra 28 TBST+PVP (tejido sano)	0.615 (0.049)	0.105 (0.021)
Rango	0.485-0.560	0.170-0.425

*El promedio de dos repeticiones en el ensayo

El número en paréntesis es el valor de la desviación estándar

(Ver Tabla 1 para ubicar las muestras)

La siguiente metodología aplicada consistió en evaluar los anticuerpos directamente en ELISA-DASI para determinar con esta técnica la discriminación de las muestras de tejido de árboles de cítricos positivos y negativos del CTV.

5.4 Establecimiento de las condiciones óptimas de ELISA-DASI

En la Tabla 2 se enlistan las diferentes combinaciones de anticuerpos primarios (de tapizado) e intermedio para determinar la reactividad de los anticuerpos desarrollados anti-p20 en ELISA-DASI (Tabla 2). Para esto, fueron empleadas placas de microtitulación y se evaluaron concentraciones de 1-9 μ g/ml de IgG de conejo anti-p20 como anticuerpo de tapizado y de IgG de rata anti-p20 como anticuerpo intermedio se emplearon diluciones que van de 1:3000-1:15,000 (Tabla 3) y viceversa. En el experimento 1 empleando la combinación anti-p20 de conejo clave 202 de 6 μ g/ml y de anticuerpo intermedio fue anti-p20 de rata clave R1 a una dilución 1:3,000, se obtuvo un valor de absorbancia de 0.157-0.171 como valor máximo para las muestras positivas del CTV mientras que para las muestras negativas fue de 0.066 como valor máximo, con respecto a las otras combinaciones de este experimento 1 se obtuvieron valores de absorbancia muy bajos, lo cual hacía dar falsos positivos. Por otra parte en el experimento 2 se empleó la combinación anti-p20 de conejo clave 201/ anti-p20 de rata clave R1 con todas sus combinación de concentración de tapizado y las diferentes diluciones del anticuerpo intermedio y en este experimento se logró obtener la concentración óptima de anticuerpo de tapizado la cual fue empleando el anti-p20 de conejo clave 201 de 6 μ g/ml y de anticuerpo intermedio fue anti-p20 de rata clave R1 a una dilución 1:3,000, la cual fue efectiva para discriminar las muestras positivas y negativas del CTV, con valores bajos de absorbancia de 0.406-0.435 como valor máximo para las muestras positivas del CTV, mientras que para las muestras negativas fue de 0.190; siendo como diferencia 2 veces su valor entre tejido positivo y negativo del CTV, esto puede deberse a la concentración del virus en el tejido o a la cantidad de inclusiones formadas en el floema de la planta como se muestra en la Tabla 7. Posteriormente, se realizó el experimento 3 el cual consistió en las combinaciones de anti-p20 de rata clave R1/ anti-p20 de conejo clave 201, en este experimento en ninguna de las combinaciones realizadas no se logró discriminar las muestras positivas y negativas del CTV debido a que se obtuvieron valores de absorbancia muy bajos de casi cero, apenas se lograba obtener una lectura a 405nm. En todos los experimentos 1, 2 y 3 se utilizó de referencia las combinaciones de anti-p25 CB 3 μ g/ml / C9 1:3000 (cabra y conejo) (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) dando valores de absorbancia de un rango de

0.942-1.023 para las muestras positivas del CTV como valor máximo y para las muestras negativas fue de 0.026 como valor máximo, mientras que para la combinación CB 3µg/ml / C3 1:3000 (cabra y conejo) (Sandoval-Alejos, 2005) se obtuvieron valores de absorbancia de 1.417-1.502 para las muestras positivas del CTV y para las negativas fue de 0.024. Con los anticuerpos anti-p25 se logra una diferencia de más de 10 veces en su valor entre plantas positivas y negativas del CTV dando una discriminación mayor entre ellas (Tabla 7).

Tabla 7. Establecimiento de las condiciones óptimas mediante ELISA-DASI empleando anticuerpos anti-p20 y anti-p25 (referencia del experimento) con extractos crudos de tejido de cítricos sanos e infectados con el CTV.

Experimento	Anticuerpo de tapizado	Anticuerpo intermedio	Valores de OD 405nm de los antígenos con las combinaciones de los anticuerpos anti-p20 y anti-p25 *			Rango
			Muestra 26 (tejido sano)	Muestra 25 (tejido positivo)	Muestra 30 (tejido positivo)	
1	anti-p20 de conejo (202) 3µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.043 (0.004)	0.128 (0.017)	0.117 (0.010)	0.117-0.128
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:9,000	0.043 (0.001)	0.137 (0.007)	0.124 (0.002)	0.124-0.137
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:15,000	0.036 (0.001)	0.109 (0.008)	0.102 (0.014)	0.102-0.109
	anti-p20 de conejo (202) 6µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.066 (0.006)	0.171 (0.004)	0.157 (0.013)	0.157-0.171
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:9,000	0.071 (0.011)	0.156 (0.009)	0.137 (0.004)	0.137-0.156
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:15,000	0.052 (0.004)	0.138 (0.017)	0.117 (0.007)	0.117-0.138
	anti-p20 de conejo (202) 9µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.062 (0.004)	0.161 (0.004)	0.148 (0.002)	0.148-0.161
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:9,000	0.048 (0.005)	0.129 (0.018)	0.118 (0.015)	0.118-0.129
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:15,000	0.044 (0.001)	0.092 (0.004)	0.072 (0.018)	0.072-0.092
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.103 (0.001)	0.301 (0.001)	0.317 (0.001)	0.301-0.317
2	anti-p20 de conejo (201) 3µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:9,000	0.108 (0.005)	0.305 (0.003)	0.328 (0.011)	0.305-0.328
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:15,000	0.109 (0.004)	0.301 (0.020)	0.312 (0.018)	0.301-0.312

		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.190 (0.001)	0.435 (0.011)	0.406 (0.011)	0.406-0.435
	anti-p20 de conejo (201) 6µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:9,000	0.191 (0.006)	0.450 (0.023)	0.377 (0.044)	0.377-0.450
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:15,000	0.176 (0.007)	0.414 (0.033)	0.373 (0.010)	0.373-0.414
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.196 (0.013)	0.454 (0.023)	0.458 (0.011)	0.454-0.458
	anti-p20 de conejo (201) 9µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:9,000	0.169 (0.019)	0.386 (0.009)	0.370 (0.031)	0.370-0.386
		anti-p20 de rata (R1) dilución 1:15,000	0.128 (0.021)	0.269 (0.056)	0.227 (0.073)	0.227-0.269
<hr/>						
		anti-p20 de conejo (201) dilución 1:3,000	0.002 (0.001)	0.005 (0.005)	0.007 (0.003)	0.005-0.007
	anti-p20 de rata (R1) 3µg/ml	anti-p20 de conejo (201) dilución 1:9,000	0.002 (0.000)	0.001 (0.001)	0.006 (0.004)	0.001-0.006
		anti-p20 de conejo (201) dilución 1:15,000	0.003 (0.002)	0.004 (0.000)	0.006 (0.007)	0.004-0.006
		anti-p20 de conejo (201) dilución 1:3,000	0.003 (0.001)	0.012 (0.004)	0.008 (0.001)	0.008-0.012
3	anti-p20 de rata (R1) 6µg/ml	anti-p20 de conejo (201) dilución 1:9,000	0.008 (0.001)	0.006 (0.000)	0.005 (0.000)	0.005-0.006
		anti-p20 de conejo (201) dilución 1:15,000	0.005 (0.005)	0.008 (0.003)	0.007 (0.002)	0.007-0.008
		anti-p20 de conejo (201) dilución 1:3,000	0.006 (0.000)	0.005 (0.001)	0.003 (0.002)	0.003-0.005
	anti-p20 de rata (R1) 9µg/ml	anti-p20 de conejo (201) dilución 1:9,000	0.003 (0.001)	0.005 (0.001)	0.005 (0.001)	0.005-0.005
		anti-p20 de conejo (201) dilución 1:15,000	0.008 (0.006)	0.006 (0.001)	0.003 (0.002)	0.006-0.006
<hr/>						
referencia del experimento 4	anti-p25 de cabra (CB) 3µg/ml	anti-p25 de conejo (C9) dilución 1:3,000	0.026 (0.000)	1.023 (0.018)	0.942 (0.037)	0.942-1.023
	anti-p25 de cabra (CB) 3µg/ml	anti-p25 de conejo (C3) dilución 1:3,000	0.024 (0.004)	1.502 (0.037)	1.417 (0.010)	1.417-1.502

*El promedio de dos repeticiones en el ensayo

El número en paréntesis es el valor de la desviación estándar

(Ver Tabla 1 para ubicar las muestras)

Para incrementar los valores de absorbancia en las muestras positivas del CTV, se empleó el detergente zwitteriónico Empigen-BB (E-BB) al 0.1% en el buffer de dilución del anticuerpo intermedio (Bandla *et al.*, 1994). Con el sistema anti-p20 combinación 201/R1 (conejo y rata) los valores de absorbancia se observaron muy similares que van de 0.233-0.280 que cuando se usa el Tween 20 0.05%, los valores de absorbancia oscilaron entre 0.207-0.266; por lo tanto, no se logró obtener un incremento en los valores de absorbancia empleando el detergente zwitteriónico Empigen-BB (E-BB) al 0.1%. Mientras que con la combinación R1/201(rata y conejo) apenas arrojo valores de absorbancia cuando se empleó el Tween 20 0.05% dando valores de 0.064-0.082 como valor máximo, mientras que con el uso de Empigen-BB (E-BB) al 0.1%, los valores de absorbancia fueron de 0.096-0.121 como valor máximo, con esta combinación no se logró discriminación entre las muestras positivas y negativas al CTV. Por otra parte se evaluó el sistema anti-p25 combinación CB/C9 (cabra y conejo) (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) para usarlo como control entre las dos combinaciones de anti-p20 y en este experimento se observó un ligero incremento en los valores de absorbancia en las muestras positivas, por ejemplo las tratadas con Tween 20 0.05% los valores oscilan entre 0.260-0.715, mientras que las tratadas con Empigen-BB (E-BB) al 0.1% fueron de 0.318-0.779 como valor máximo (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación de los anticuerpos anti-p20 y anti-p25 mediante ELISA-DASI, variando el buffer del anticuerpo intermedio.

Experimento	Tratamiento	Anticuerpo de tapizado	Anticuerpo intermedio	Valores de OD 405nm de los antígenos con las combinaciones de los anticuerpos anti-p20 y anti-p25 *			Rango
				Muestra 27 (tejido sano)	Muestra 30 (tejido positivo)	Muestra 2 (tejido positivo)	
1		anti-p20 de conejo (201) 6µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.159 (0.002)	0.207 (0.003)	0.266 (0.010)	0.207-0.266
	Tween 20 0.05%	anti-p20 de rata (R1) 5µg/ml	anti-p20 de conejo (201) dilución 1:1,000	0.069 (0.001)	0.064 (0.011)	0.082 (0.011)	0.064-0.082
	referencia del experimento	anti-p25 de cabra (CB) 3µg/ml	anti-p25 de conejo (C9) dilución 1:3,000	0.048 (0.000)	0.715 (0.013)	0.260 (0.047)	0.260-0.715
2		anti-p20 de conejo (201) 6µg/ml	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	0.160 (0.013)	0.233 (0.008)	0.280 (0.034)	0.233-0.280
	Empigen 0.01%	anti-p20 de rata (R1) 5µg/ml	anti-p20 de conejo (201) dilución 1:1,000	0.100 (0.001)	0.096 (0.004)	0.121 (0.005)	0.096-0.121
	referencia del experimento	anti-p25 de cabra (CB) 3µg/ml	anti-p25 de conejo (C9) dilución 1:3,000	0.106 (0.006)	0.779 (0.012)	0.318 (0.010)	0.318-0.779

*El promedio de dos repeticiones en el ensayo

El número en paréntesis es el valor de la desviación estándar

(Ver Tabla 1 para ubicar las muestras)

La siguiente fase del trabajo consistió en determinar la reactividad de la combinación anticuerpos anti-p20 de conejo 201 6µg/ml / anti-p20 de rata R1 1:3000 y como control el sistema de detección implementado para la proteína mayoritaria de la cápside la p25 anti-p25 combinación CB 3µg/ml / C9 1:3000 (cabra y conejo) (Iracheta Cárdenas *et al.*, 2008). Se procedió a evaluar 20 muestras de tejido de árboles de cítricos positivos y negativos del CTV de diferentes orígenes (nueve de Nuevo León, siete de California y dos de Florida), las cuales fueron previamente analizadas y establecidas como positivas y negativas del CTV (Sandoval-Alejos, 2005 y Núñez-Sánchez, 2012). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9, la cual indica que con los dos sistemas hubo discriminación entre plantas positivas y negativas del CTV, sólo que hubo una gran diferencia entre los valores de absorbancia entre una combinación y otra; debido a que con la combinación de anti-p20 201/R1(conejo y rata) se obtuvieron valores de absorbancia de 0.165-0.550 como valor máximo, mientras que con la combinación de anti-p25 CB/C9 (cabra y conejo) se han reportado valores de 0.280-1.350 como valor máximo (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008). Estos resultados pueden ser debido a un mayor título de los anticuerpos desarrollados anti-p25.

Por otra parte, las muestras que produjeron valores altos de absorbancia en las dos combinaciones anti-p20 201/R1 (conejo y rata) y anti-p25 CB/C9 (cabra y conejo) fueron el homogenizado de tejido de cítricos muestra 1 (Linares, NL), los homogenizados de tejido de cítricos muestra 8 y muestra 9 (Montemorelos, NL), los homogenizados de tejido de cítricos muestra 13, muestra 17, muestra 18 y muestra 19 (California), los homogenizados de tejido de cítricos muestra 20 y muestra 21 (Florida) como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Comparación de los sistemas serológicos de detección para la proteína no estructural p20 (anti-p20) y proteína mayoritaria de la cápside p25 (anti-p25) empleando ELISA-DASI.

Valores de OD 405nm de los antígenos con las combinaciones de los anticuerpos anti-p20 y anti-p25 *			
anticuerpo de tapizado	anti-p25 de cabra (CB) 3µg/ml	anti-p20 de conejo (201) 6µg/ml	Reactividad al CTV
anticuerpo intermedio	anti-p25 de conejo (C9) dilución 1:3,000	anti-p20 de rata (R1) dilución 1:3,000	
Tejido			
1	1.000 (0.028)	0.495 (0.021)	+
2	0.740 (0.014)	0.320 (0.000)	+
3	0.680 (0.014)	0.300 (0.014)	+
4	0.540 (0.000)	0.445 (0.021)	+
5	0.280 (0.014)	0.170 (0.014)	+
6	0.310 (0.000)	0.165 (0.021)	+
7	0.475 (0.021)	0.275 (0.021)	+
8	1.350 (0.042)	0.550 (0.042)	+
9	1.305 (0.021)	0.510 (0.000)	+
13	0.900 (0.014)	0.370 (0.014)	+
14	0.750 (0.042)	0.245 (0.007)	+
15	0.500 (0.028)	0.320 (0.000)	+
16	0.385 (0.007)	0.250 (0.057)	+
17	1.110 (0.014)	0.425 (0.035)	+
18	1.035 (0.035)	0.325 (0.007)	+
19	0.680 (0.028)	0.435 (0.021)	+
20	0.920 (0.014)	0.370 (0.014)	+
21	0.770 (0.014)	0.470 (0.014)	+
23 (tejido sano)	0.050 (0.014)	0.085 (0.007)	-
24 (tejido sano)	0.045 (0.021)	0.075 (0.007)	-
Rango	0.280-1.350	0.165-0.550	

*El promedio de dos repeticiones en el ensayo
El número en paréntesis es el valor de la desviación estándar
Ver Tabla 1 para ubicar las muestras.

5.5 Evaluación de los anticuerpos con diversos aislamientos del CTV de diferentes regiones citrícolas del Estado de Nuevo León, California y Florida.

Para analizar las dos muestras independientes con distribución normal se empleó el modelo estadístico T de student para muestras pequeñas, en el cual se obtuvo un valor de Tcal de 7 y fue comparada con una Ttab de Tablas (2 colas, 18 grados de libertad, $\alpha=0.01$), la cual nos dio de 2.878, indicándonos que la Tcal es mayor que la Ttab, por lo tanto la hipótesis nula (Ho) se rechaza y se acepta la hipótesis alterna (Ha), por lo que el coeficiente de determinación R^2 nos indica que existe un 62% de variación entre las dos combinaciones de anticuerpos evaluados, de ahí se puede observar la gran diferencia que hay entre los valores de absorbancia entre un sistema y otro.

Tabla 10. Valores de media (X), desviación estándar (S) y número de muestras (N) para la prueba “T de student” para muestras independientes de 2 colas para la combinación anti-p25 CB/C9 (cabra y conejo) y anti-p20 201/R1 (conejo y rata).

Combinación	N	X	S
CB/C9 (anti-p25)	20	0.28	0.37
201/R1 (anti-p20)	20	0.24	0.14

6.0 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la reactividad de los antisueros desarrollados previamente para la proteína no estructural p20 recombinante del CTV, el gen *p20* está implicado en la acumulación de cuerpos de inclusión amorfos en el floema; por lo cual, es un componente importante para detectar células infectadas con el virus (Gowda *et al.*, 2000). Para dicho estudio se emplearon anticuerpos policlonales desarrollados en conejo claves 201, 202 y 204 (López-Alvarado, 2009) y rata claves R1 y R2 (Salazar-Martínez, 2011), esto con el fin de implementar un sistema serológico ELISA-DASI.

En el 2009, se desarrollaron los antisueros anti-p20 de conejo, los cuales fueron evaluados mediante Western Blot y a través de la reactividad que presentaron fue posible discriminar muestras de plantas de cítricos positivas y negativas del CTV (López-Alvarado, 2009).

Por otra parte en el 2011, se desarrollaron los antisueros anti-p20 de rata, estos fueron evaluados mediante la técnica de Dot-Blot e Inmunoensayo *in situ* en tejidos de *Citrus paradisi* (Macfad) provenientes de plantaciones comerciales y dichos antisueros anti-p20 de conejo previamente desarrollados y rata fueron capaces de reconocer a la proteína no estructural p20 en su forma nativa (Salazar-Martínez, 2011).

Posteriormente, los antisueros anti-p20 fueron purificados con sulfato de amonio al 36% y ajustados a 1mg/ml a una DO = 1.45 (Clark *et al.*, 1986). Ya purificados los anticuerpos fueron evaluados mediante Western Blot, el anticuerpo de rata se empleó a una concentración de 0.001 mg/ml, mientras que el anticuerpo de conejo a una concentración de 0.0003 mg/ml, mostraron alta reactividad con el cultivo de *E. coli* transformada con el gen *p20* (Murga-Sánchez *et al.*, 2010) y las muestras de tejido infectado con el CTV como se muestra en la Figura 2 (carril 2, 5, 6 y 9), mientras que en los carriles donde se encontraba tejido sano no hubo señal. El anticuerpo de conejo mostró mayor reactividad ya que solo reconoce la proteína p20 recombinante del cultivo de *E. coli* transformado con el gen *p20* (Murga-Sánchez *et al.*, 2010) y la proteína de la muestra de tejido de cítricos infectado con el CTV las cuales pesan alrededor de 16-17 kDa como se muestra en los carriles 6 y 9 de la Figura 2.

Por otra parte, se analizaron muestras de diferentes orígenes (Estado de Nuevo León, California y Florida), empleando el anticuerpo anti-p20 de conejo (201) a una concentración de 0.0003 mg/ml y se comparó con el anticuerpo anti-p25 de conejo (C9) (Iracheta Cárdenas *et al.*, 2008) a una concentración de 0.0003 mg/ml, los resultados obtenidos muestran que los dos anticuerpos reconocen a las proteínas específicas presentes en el CTV de manera desnaturalizada, solo que en cuanto a la intensidad de detección los anticuerpos anti-p25 tienen mayor fuerza de unión con el antígeno lo que da como resultado una señal mayor y evidente, en comparación con el anticuerpo anti-p20 que aunque da menor señal de reconocimiento es capaz de detectar a la proteína p20 en muestras de tejido infectado con el CTV, como se muestra en la Figura 3.

Cerovska *et al.* (2006) reportaron el desarrollo de anticuerpos contra la proteína no estructural de triple bloque 1 del *potato mop-top virus*. Los anticuerpos obtenidos fueron evaluados para la detección de PMTV en *Nicotiana benthamiana* producida en el laboratorio y el hospedero natural *Solanum tuberosum* mediante ELISA-DAS y Western Blot. Ellos mencionan que los antisueros producidos contra la proteína no estructural recombinante son más convenientes para el análisis de Western Blot de plantas infectadas que para ELISA-DAS; por lo tanto, recomiendan preferentemente la detección de las proteínas de PMTV de forma desnaturalizadas.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio (Tablas 7 y 9) se logró la discriminación de tejido de árboles de cítricos positivos y negativos del CTV mediante Western Blot; por tanto, se procedió a la evaluación de los anti-p20 con la técnica de ELISA indirecta, para este ensayo se emplearon los antisueros crudos; sin embargo, con el empleo de esta técnica no logró obtener una diferencia entre los valores de absorbancia ya que se encontraron en el rango de 0.027 y 0.380 como valor máximo los tejidos de árboles de cítricos positivos del CTV, mientras que para las muestras negativas los valores de absorbancia oscilaron entre 0.011 y 0.326 como valor máximo como se muestra en la Tabla 5.

Jan y Yeh (1995) mencionan que empleando Tritón X-100 al 5%, lograron purificar las inclusiones nucleares del TEV y de BYMV, además de la proteína de inclusión amorfa del PRSV, mientras que las inclusiones amorfas del PWV se sedimentaron debido a que las inclusiones amorfas del PWV tienen una masa más densa

que las de los otros potyvirus; por lo tanto, los pellets después de la primera centrifugación a baja velocidad para la purificación de las inclusiones amorfas del PWV se recolectaron y este paso fue la clave para la purificación exitosa. En base a lo anterior, se realizaron varios ensayos probando el tritón X-100 al 2.5% en dos buffer de extracción del tejido (buffer de Carbonatos y buffer TBST+PVP), para ver si se lograba solubilizar la proteína p20 y así detectarla de forma nativa con la técnica de ELISA indirecta, pero con esta modificación en el ensayo no se obtuvo una discriminación de plantas positivas y negativas del CTV, debido a que al emplear este detergente no se aumentó la reactividad, ni se logró obtener valores de absorbancia altos, en el caso del anti-p20 de conejo (202) fueron de 0.485-0.560 para las muestras positivas al CTV y de 0.055-0.615 en las negativas o sanas; mientras que para el anti-p20 de rata (R1) los valores de absorbancia oscilaron entre 0.170-0.425 para las muestras positivas al CTV y de 0.040-0.105 en las negativas o sanas como se muestran en la Tabla 6.

Como no se logró obtener resultados con la técnica ELISA indirecta se procedió a establecer las condiciones óptimas para detectar la proteína no estructural p20 con la técnica de ELISA-DASI, para esto fue empleada la metodología de Iracheta Cárdenas *et al.* (2008); la cual fue establecida para la proteína mayoritaria de la cápside la proteína p25 del CTV.

Para este ensayo se utilizó un anticuerpo de conejo y uno de rata, como anticuerpo primario (atrapante o tapizado) y como anticuerpo intermedio (detectante) y viceversa, en cada una de las combinaciones fueron empleadas varias concentraciones tanto de tapizado (3, 6, 9µg/ml), como de intermedio (1:3000, 1:9000, 1:15,000).

De todas las combinaciones se eligió la mejor condición, la cual no presentó reacción inespecífica, así como también tuvo la mayor reactividad para la discriminación de tejido de árboles de cítricos positivos y negativos del CTV. Dicha combinación fue empleando el anticuerpo anti-p20 de conejo (201) a una concentración de 6µg/ml como anticuerpo de tapizado y el anticuerpo anti-p20 de rata (R1) a una dilución 1:3,000 como anticuerpo intermedio. Con esta combinación 201/R1(conejo y rata) se logró obtener una diferencia de 2 veces en el valor de absorbancia entre un tejido positivo los cuales se encuentran en un rango de 0.406-0.435 y uno negativo del CTV que dio valores de absorbancia de 0.190. Aunque se obtuvieron valores de absorbancia bajos y una

diferencia pequeña entre una muestra positiva y negativa fue suficiente para discriminar las muestras, debido a que con las otras combinaciones mencionadas en la Tabla 3 no se logró obtener alguna lectura de absorbancia a 405nm como se muestra en la Tabla 7.

Bandla *et al.* (1994) mencionan que empleando detergentes zwitteriónicos como el Empigen-BB (E-BB) al 0.1% en el buffer de dilución del anticuerpo reduce la unión inespecífica y restaura la unión antígeno-anticuerpo dando como resultado una lectura alta de absorbancia en las muestras positivas en ACP-ELISA, con el empleo del E-BB ellos observaron una diferencia de 10 veces más en el valor de absorbancia entre las plantas positivas y negativas, mientras que con el uso del Tween 20 solo observaron 3 veces diferencia en el valor de absorbancia. Al ver este reporte se realizaron varios ensayos con estas condiciones, pero no se logró reproducir estos resultados, debido a que empleando la combinación anti-p20 201/R1 (conejo y rata) los valores de absorbancia se observaron muy similares que van de 0.233-0.280 que cuando se usa el Tween 20 0.05%, los valores de absorbancia oscilaron entre 0.207-0.266; mientras que con la combinación R1/201(rata y conejo) apenas arrojó valores de absorbancia cuando se empleó el Tween 20 0.05% dando valores de 0.064-0.082 como valor máximo, mientras que con el uso de Empigen-BB (E-BB) al 0.1%, los valores de absorbancia fueron de 0.096-0.121 como valor máximo, con esta combinación no se logró discriminación entre las muestras positivas y negativas al CTV. Por otra parte se evaluó el sistema anti-p25 combinación CB/C9 (cabra y conejo) (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) para usarlo como control entre las dos combinaciones de anti-p20, en este experimento se observó un ligero incremento en los valores de absorbancia en las muestras positivas, por ejemplo las tratadas con Tween 20 0.05% los valores oscilan entre 0.260-0.715, mientras que las tratadas con Empigen-BB (E-BB) al 0.1% fueron de 0.318-0.779 como valor máximo (Tabla 8).

Sin embargo, estos resultados se pueden deber a varios factores, en los que se encuentran la concentración del virus presente en las muestras de tejido evaluadas, la severidad del aislamiento del virus y el hospedero, como lo mencionan Miao y Skaria (2002), ellos compararon las características de las inclusiones virales, la concentración del virus y los síntomas foliares en plantas de lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) y de naranjo agrio (*C. aurantium*) inoculadas con un aislamiento moderado (T-TX8) y un

aislamiento severo (CTV-2) del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y ellos observaron que las características de las inclusiones virales se correlacionaron positivamente con la severidad del aislamiento del virus, la concentración del virus y los síntomas en las plantas, debido a que el número promedio de inclusiones virales observadas por corte fue de 32 en el caso de la infección con CTV-2 (aislamiento severo) y de 3.2 con la infección con T-TX8 (aislamiento moderado); además, también evaluaron sus muestras por ELISA y los resultados muestran que con el aislamiento CTV-2 la lima mexicana da valores de absorbancia de 1.82, mientras que con naranjo agrio da valores de 0.33 considerado negativo, por otra parte con el aislamiento T-TX8 la lima mexicana da valores de absorbancia de 0.8, mientras que con naranjo agrio da valores de 0.34 considerado negativo.

Estos resultados de ELISA que muestran los autores en los cuales comparan la severidad del virus en 4 hospederos, pueden ser importantes en el presente trabajo ya que en el ensayo realizado fueron empleadas muestras positivas del CTV consideradas como virus de raza débil, de ahí se puede interpretar que por eso se obtuvo un valor de absorbancia bajo, porque esto significa que las muestras tienen baja cantidad de inclusiones amorfas en el floema de la planta.

Por otra parte, Cambra *et al.* (1994) desarrollaron anticuerpos monoclonales específicos contra las inclusiones cilíndricas del Plum pox potyvirus y mencionan en sus experimentos que fueron capaces de detectar las proteínas de inclusión cilíndrica en ELISA indirecta usando extractos y secciones de tejido, pero obtenían valores de absorbancia muy bajos comparados con los valores que arrojaban los anticuerpos monoclonales producidos para la proteína de la cápside de PPV; por ello, decidieron hacer una mezcla con los anticuerpos monoclonales de CIP+CP-PPV y así lograron eficientizar e incrementar la densidad óptica en comparación de cuando se empleaba el anticuerpo monoclonal solo. Por lo que recomiendan el uso de la mezcla de anticuerpos monoclonales contra proteínas estructurales y no estructurales y mencionan que la ELISA indirecta fue la más sensible para detectar las proteínas de inclusión cilíndrica.

Por último, se realizó un ensayo para comparar los dos sistemas de detección en ELISA-DASI, la combinación anti-p20 201/R1 (conejo y rata) y la combinación anti-p25 CB/C9 (cabra y conejo) establecida por Iracheta Cárdenas *et al.* (2008). En este

ensayo se evaluaron 20 muestras de tejido de árboles de cítricos previamente analizadas y establecidas como positivas y negativas del CTV de diferentes orígenes.

Dichas muestras fueron evaluadas habían sido evaluadas previamente por Sandoval-Alejos (2005) cuando implementó las condiciones óptimas para el sistema ELISA-DASI con anticuerpos desarrollados para la proteína mayoritaria de la cápside p25 recombinante usando la combinación T1/C3 (cabra y conejo), empelando el anticuerpo de cabra T1 como tapizado y anticuerpo de conejo C3 como intermedio, con este sistema los anticuerpos tuvieron una alta reactividad con las muestras infectadas mientras que con las muestras sanas no mostro reacción inespecífica.

Además, estas muestras también fueron evaluadas por Núñez-Sánchez (2012) para detectar el gen p23 del CTV mediante RT-PCR bidireccional, en la cual se logró detectar una mezcla de poblaciones en los aislados del Estado de Nuevo León con base en los perfiles electroforéticos obtenidos mediante SSCP y además logró interpretar a las muestras como severa, débil, atípica y no definida.

Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la Tabla 9, la cual indica que los dos sistemas de detección son capaces de discriminar muestras positivas y negativas del CTV, solo que hay una gran diferencia entre ambos, debido a que con la combinación anti-p20 201/R1 (conejo y rata) solo se logra diferenciar 4 veces el valor de una muestra positiva con una negativa, dando valores de absorbancia de 0.165-0.550 como valor máximo, mientras que con la combinación anti-p25 CB/C9 (cabra y conejo) se logra obtener una diferencia de 10 veces más entre una muestra positiva y negativa del CTV, logrando obtener valores de absorbancia de 0.280-1.350 como valor máximo. Los tejidos que dieron valores altos de absorbancia en las dos combinaciones anti-p20 201/R1 (conejo y rata) y anti-p25 CB/C9 (cabra y conejo) fueron el homogenizado de tejido de cítricos muestra 1 (Linares, NL), los homogenizados de tejido de cítricos muestra 8 y muestra 9 (Montemorelos, NL), los homogenizados de tejido de cítricos muestra 13, muestra 17, muestra 18 y muestra 19 (California), los homogenizados de tejido de cítricos muestra 20 y muestra 21 (Florida) como se muestra en la Tabla 9.

Estos datos se corroboraron con la prueba de “T de student” donde nos muestra claramente que si existe diferencia entre ambas combinaciones, que hay aproximadamente un 62% de variación entre ellas. También se puede observar que en

las 18 muestras positivas del CTV hay una diferencia entre ellas en los valores de absorbancia, esto se puede deber a lo anteriormente mencionado por Miao y Skaria (2002), que las muestras tengan diferente concentración del virus, el tipo de severidad y el hospedero; por ejemplo, las primeras 9 muestras de la Tabla 9 fueron colectadas en Nuevo León y son consideradas muestras infectadas con raza de virus débil por la sintomatología que presentan las plantas; mientras que las muestras colectadas de California y Florida son consideradas muestras infectadas con raza de virus severo, solo faltaría especificar de qué hospedero viene cada muestra para así reproducir los datos proporcionados por Brlansky y Lee (1990), ellos mencionan que con base en el número de cuerpos de inclusión formados en los hospederos de árboles de cítricos se pueden diferenciar los aislamientos de CTV como débil, moderado y severo; además hacen mención que de 3 hospederos de cítricos que emplearon en su estudio, los pudieron identificar en los diferentes aislamientos de acuerdo al valor del título de absorbancia en la prueba de ELISA. También refieren que a través de todos los hospederos, hay una correlación significativa entre el número de inclusiones producidas y el título del virus en el tejido en ELISA. Además, mencionan que existe una interacción significativa entre el número de inclusiones, el hospedero y el aislamiento, indicando que los aislamientos no se comportan de manera similar en los hospederos, por ejemplo, en su estudio observaron que el aislamiento moderado T4 produjo más inclusiones que el aislamiento severo en los hospederos más resistentes al CTV; los cuales son, limón Eureka, naranjo agrio y toronja Duncan.

7.0 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo y con base en las condiciones en las que se llevó a cabo, se concluye lo siguiente:

1.- A través de la reactividad de los anticuerpos desarrollados anti-p20 fue posible discriminar muestras de plantas de cítricos positivas y negativas del CTV mediante Western-Blot.

2.- Los antisueros anti-p20 obtenidos mediante inmunización con la proteína no estructural p20 recombinante funcionaron eficientemente en la prueba de ELISA-DASI, el anticuerpo de conejo como tapizado y el de rata como intermedio, al mostrar reactividad con los aislamientos infectados con el CTV de diferentes orígenes, mostrando baja reacción con los tejidos sanos.

8.0 LITERATURA CITADA

- Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Cordahi, N., Kawtharani, H., Nemer, G., Maxwell, D.P., and Nakhla, M.K. 2004. Immunodiagnosis of *Prune dwarf virus* using antiserum produced to its recombinant coat protein. *Journal of Virological Methods* 121:31-38.
- Albiachi-Marti, M.R. 2012. Molecular virology and pathogenicity of *Citrus tristeza virus*. In García, M.L. and Romanowski, V. (eds). *Biochemistry, Genetics, Expression Mechanisms and Host Interactions*. pp. 275-302. CC BY License <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/29533> (acceso Marzo 11, 2014).
- Albiachi-Marti, M.R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M., Shanker, S., Almira, E.C., Vives, M., López, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S.M., and Dawson, W.O. 2000. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology* 74:6856-6865.
- Amin, H.A., Barakat, A., and Abou-Zeid, A.A. 2004. Production of polyclonal antibodies against the recombinant *Citrus tristeza virus* coat protein expressed in *Escherichia coli*. *Egyptian Journal of Virology* 1:71-80.
- Ananthakrishnan, G., Venkataprasanna, T., Roy, A., and Brilansky, R.H. 2010. Characterization of the mixture of genotypes of a *Citrus tristeza virus* isolate by reverse transcription-quantitative real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 164(1-2):75-82.
- Arrieta-García, L.C. 2009. Implementación del Sistema de inmunopresión para la detección del virus tristeza de los cítricos, mediante anticuerpos desarrollados para la proteína recombinante p25 de la cápside. Tesis de Biólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 22p.
- Bandla, M.D., Westcot, D.M., Chenault, K.D., Ullman, D.E., German, T.L., and Sherwood, J.L. 1994. Use of monoclonal antibody to the nonstructural protein encoded by the small RNA of tomato spotted wilt tospovirus to identify viruliferous thrips. *Phytopathology* 84:1427-1431.

- Barbieri, M.R., Carvalho, M.G., Zambolim, E.M., and Zerbini, F.M. 2004. Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do *Watermelon mosaic virus* (WMV-2) e produção de anti-soro específico. *Fitopatologia Brasileira* 29:215-219.
- Bar-Joseph, M., Filatov, V., Gofman, R., Guang, Y., Hadjinicolis, A., Mawassi, M., Gootwine, E., Weisman, Y., Malkinson, M. 1997. Booster immunization with a partially purified *Citrus tristeza virus* (CTV) preparation after priming with recombinant CTV coat protein enhances the binding capacity of capture antibodies by ELISA. *Journal of Virological Methods* 67:19-22.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F., and Loebenstein, G. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 69:190-194.
- Bar-Joseph, M., and Lee, R.F. 1989. *Citrus tristeza virus*. Description of Plant Viruses No. 353 (No. 33 revised). Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Kew Surrey, England. 7p.
- Bar-Joseph, M., Loebenstein, G., and Cohen, K.J. 1974a. Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease. *Virology* 50:821-828.
- Bar-Joseph, M., Loebenstein, G., and Oren, Y. 1974b. Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources found in Israel. Pages 83-85. In: Proc. 6th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Bar-Joseph, M., and Malkinson, M. 1980. Hen yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. *Journal of Virological Methods* 1:1-5.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., and Lee, R.F. 1989a. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*. 27:292-316.
- Batista, L. 2001. Obtención y evaluación de un anticuerpo monoclonal para la detección del virus de la tristeza de los cítricos: Aplicación en estudios epifitológicos. PhD Thesis. Universidad Central de Las Villas. Cuba.
- Batista, L., Peña, I., López, D., Casín, J.C., Velázquez, K., Torres, M.C., and León, Y. 2005. Management program for citrus tristeza in Cuba. pp 404-406. In: Hilf, M.E.,

- Durán-Vila, N., Rocha-Peña, M.A. (ed.). Proc. 16th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Brlansky, R.H. 1987. Inclusion bodies produced in *Citrus spp.* by *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica* 19:211-213.
- Brlansky, R.H., Lee, R.F., and Garnsey, S.M. 1988. In situ immunofluorescence for the detection of *Citrus tristeza virus* inclusion bodies. *Plant Disease* 72:1039-1041.
- Brlansky, R.H., and Lee, R.F. 1990. Numbers of inclusion bodies produced by mild and severe strains of *Citrus tristeza virus* in seven citrus hosts. *Plant Disease* 74:297-299.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moya, J.J., López-Aballa, D., Vela, C., and Sanz, A. 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin EPPO* 24:569-577.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M., Olmos, A., Martínez, M., Hermoso De Mendoza, A., López, A., Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* 71:85-95.
- Cevik, B., Pappu, S.S., Lee, R.F., and Niblett, C.L. 1996a. Detection and differentiation of strains of citrus tristeza closterovirus using a point mutation and minor sequence differences in their coat protein genes: *Phytopathology* 86:101 (Abstract).
- Cevik, B., Pappu, S.S., Pappu, H.R., Benschler, D., Irey, M., Lee, R.F., and Niblett, C.L. 1996b. Application of bi-directional PCR to *Citrus tristeza virus*: detection and strain differentiation. In: Proc. 13th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Cerovska, N., Filigarova, M., and Pečenková, T. 2006. Production of polyclonal antibodies to a recombinant *Potato Mop-top Virus* non-structural triple gene block protein 1. *Journal of Phytopathology* 154:422-427.
- Clark, M.F., Lister, R.M., and Bar-Joseph, M. 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 113:742-766.

- Durrin, J.S., Nikolaeva, O.V., Strausbaugh, C.A., and Karasev, A.V. 2010. Immunodetection of two curtoviruses infecting sugar beet. *Plant Disease* 94:972-976.
- El-Attar, A.K., Riad, B.Y., Saad, A., Soliman, A.M., and Mazyad, H.M. 2010. Expression of the coat protein gene of *Potato leafroll virus* in *Escherichia coli* and development of polyclonal antibodies against recombinant coat protein. *Arab Journal of Biotechnology* 13(1):85-98.
- Falk, B.W., and Tsai, J.H. 1983. Assay for *Maize stripe virus* infected plants by using antiserum produced to a purified noncapsid protein. *Phytopathology* 73:1259-1262.
- Falk, B.W., Morales, F.J., Tsai, J.H., and Niessen, A.I. 1987a. Serological and biochemical analysis of the capsid and major noncapsid proteins of *Maize stripe virus*, *Rice hoja blanca virus* and *Echinochloa hoja blanca virus*. *Phytopathology* 77:196-201.
- Falk, B.W., Tsai, J.H., and Lommel, S.A. 1987b. Differences in levels for detection of the *Maize stripe virus* capsid and major non-capsid proteins in plants and insect hosts. *Journal of General Virology* 68:1801-1811.
- Febres, V.J., Pappu, H.R., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Lee, R.F., and Niblett, C.L. 1994. The diverged copy of the *Citrus tristeza virus* coat protein is expressed *in vivo*. *Virology* 178:178-181.
- Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F., and Niblett, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza particles. *Phytopathology* 86:1331-1335.
- Folwarczna, J., Plchová, H., Moravec, T., Hoffmeisterová, H., Dědič, P., Čeřovská, N. 2008. Production of Polyclonal Antibodies to a Recombinant Coat Protein of *Potato virus Y*. *Folia Microbiologica* 53(5):438-442.
- Garnsey, S.M., Christie, R.G., Derrick, K.S., and Bar-Joseph, M. 1980. Detection of *Citrus tristeza virus*. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. pp. 9-16. In: Calavan EC, Garnsey SM and Timmer LW (eds). Proc. 8th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.

- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Yokomi, R.K., and Lee, R.F. 1991. Development of a worldwide collection of *Citrus tristeza virus* isolates. pp 113-120. In: Proc. 11th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., Roistacher, C.N., Civerolo, E.L., Lee, R.F., and Yokomi, R.K. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica* 19:151-157.
- Garnsey, S.M., and Müller, G.W. 1988. Efficiency of mechanical transmission of *Citrus tristeza virus*. pp. 46-54. In: Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L (eds). Proc. 10th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., and Henderson, C.T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). pp. 39-50. In: Proc. 12th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Ghorbel, R., López, C., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., and Peña, L. 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2:27-36.
- Gonsalves, D., Purcifull, D.E., and Garnsey, S.M. 1978. Purification and serology of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 68:553-559.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C.L., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., and Dawson, W.O. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274:246-254.
- Grodzki, A.C., and Berenstein, E. 2010. Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods in Molecular Biology* 588:15-26.
- Gulati-Sakhuja, A., Sears, J.L., Nuñez, A., and Liu, H.Y. 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods* 160:29-37.
- Gumpf, D.J., Zheng, G.Y., Moreno, P., and Diaz, J.M. 1987. Production and evaluation of specific monoclonal antibodies to *Citrus tristeza virus* strains. *Phytophylactica* 19:159-161.

- Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L., and Garnsey, S.M. 1995. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208:576-582.
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.J., and Reinard, T. 2002. The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *Journal of Virological Methods* 106:225-233.
- Iracheta-Cárdenas, M.M., Sandoval-Alejos, B.D., Roman-Calderon, M.E., Keremane, M.L., Lee, R.F., and Rocha-Peña, M.A. 2008. Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of *Citrus tristeza virus* and their effectiveness for virus detection. *Journal of Phytopathology* 156:243-250.
- Iracheta-Cárdenas, M.M., Metheney, P., Polek, M.L., Manjunath, K.L., Lee, R.F., and Rocha-Peña, M.A. 2009. Serological detection of *Citrus tristeza virus* with antibodies developed to the recombinant coat protein. *Plant Disease* 93:11-16.
- Jan, F.J., and Yeh, S.D. 1995. Purification, in situ localization, and comparative serological properties of *Passionfruit woodiness virus* encoded amorphous inclusion protein and two other virus proteins. *Phytopathology* 85:61-71.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S.M., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gompf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., and Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology* 208:511-520.
- Lee, R.F., Garnsey, S.M., Brlansky, R.H., and Goheen, A.C. 1987. A purification procedure for enhancement of *Citrus tristeza virus* yields and its application to other phloem-limited viruses. *Phytopathology* 77:543-549.
- Lee, R.F., Calvert, L.A., Nagel, J., and Hubbard, J.M. 1988. *Citrus tristeza virus*: Characterization coat protein. *Phytopathology* 78:1221-122.
- Lin, Y., Rundell, P.A., Xie, L., and Powell, C.A. 2000. In situ immunoassay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Plant Disease* 84:937-940.
- López-Alvarado, C.B. 2009. Obtención y evaluación de anticuerpos específicos contra la proteína no estructural p20 del virus tristeza de los cítricos. Tesis de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 41p.

- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., and Ding, S.W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A* 101:15742-15747.
- Manjunath, K.L., Pappu, H.R., Lee, R.F., Niblett, C.L., and Civerolo, E.L. 1993. Studies on the coat protein genes of four isolates of citrus tristeza closterovirus from India: cloning, sequencing and expression. pp. 20-27. In: Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W. (eds). *Proc. 12th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.* Riverside, California.
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., and Bar-Joseph, M. 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Virology* 77:2359-2364.
- Miao, H., and Skaria, M. 2002. Qualitative and quantitative differences of inclusion bodies induced by *Citrus tristeza virus*. *Subtropical Plant Science* 54:1-5.
- Miranda, G.J., and Koganezawa, H. 1995. Identification, purification and serological detection of the major noncapsid protein of *Rice grassy stunt virus*. *Phytopathology* 85:1530-1533.
- Moreno, P., Ambrós, S., Albiachi-Martí, MR., Guerri, J., and Peña, L. 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathgology* 9:251-268.
- Murga-Sánchez, C.G., López-Alvarado, C.B., Iracheta-Cárdenas, M.M., Rocha-Peña, M.A., Gómez-Treviño, J.A. 2010. Clonación del gen *p20* del virus de la tristeza de los cítricos. *Revista Salud Pública y Nutrición.* 1:1-7.
- Narváez, G., Skander, B.S., Ayllón, M.A, Rubio, L., Guerri, J., and Moreno, P. 2000. A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* isolates by hybridization with digoxigenin-labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* 85:83-92.
- Nickel, O., Targon, M.L.P.N., Fajardo, T.V.M., Machado, M.A., & Trivilin, A.P. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29:558-562.

- Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Gumpf, D.J., Lee, R.F., and Garnsey, S.M. 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of *Citrus tristeza virus* expressed in *Escherichia coli*: application for immunodiagnosis. *Phytopathology* 85:691-694.
- Nováková, S., Klaudivy, J., Kollerová, E., and Šubr, Z.W. 2006. Expression of a part of the *Potato virus A* non-structural protein P3 in *Escherichia coli* for the purpose of antibody preparation and P3 immunodetection in plant material. *Journal of Virological Methods* 137(2):229-235.
- Núñez-Sánchez, J.L.S. 2012. Caracterización molecular del gen p23 de aislamientos del virus tristeza de los cítricos (CTV), del Estado de Nuevo León, México. Tesis de Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 37p.
- Öztürk, S., and Çirakoğlu, B. 2003. Production of a monoclonal antibody specific for *Citrus tristeza virus*. *Food and Agricultural Immunology* 15(1):65-73.
- Pappu, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M.G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolia, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline, K.C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F., and Niblett, C.L. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199:35-46.
- Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., and Lee, R.F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 80:224-228.
- Petrovic, N., Meng, B., Ravnikar, M., Mavric, I., and Gonsalves, D. 2003. First detection of *Rupestris stem pitting associated virus* particles by antibody to a recombinant coat protein. *Plant Disease* 87:510-514.
- Polek, M.L. 2000. Permanent monitoring of *Citrus tristeza virus* and suppression of the disease by tree removal: The case of California. *Revista Horticultura Mexicana* 8:19-24.
- Rocha-Peña, M.A., and Lee, R.F. 1991. Serological techniques for detection of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Virological Methods* 34:311-331.
- Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., and Yokomi, R.K. 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera*

- citricida*. Threats to citrus production in Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79:437-445.
- Rocha-Peña, M.A., Ochoa-Corona, F.M., Martínez-Soriano, J.P., Roistacher, C.N., and Lee, R.F. 1998. *Citrus tristeza virus*: Events that occur before, during and after the disease epidemics. *Subtropical Plant Science* 50:26-36.
- Roistacher, C.N., and Bar-Joseph, M. 1989. Aphid transmission of CT virus. *Citrograph* 74(5):117-125.
- Rubinson, E., Galiakparov, N., Radian, S., Sela, I., Tanne, E., and Gafny, R. 1997. Serological detection of grapevine virus A using antiserum to a nonstructural protein, the putative movement protein. *Phytopathology* 87:1041-1054.
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., and Ambrós, S. 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-Martínez, S.L. 2011. Uso de anticuerpos contra la proteína p20 no estructural del virus tristeza de los cítricos para la localización *in situ* de inclusiones virales. Tesis de Licenciado en Biotecnología Genómica. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 45p.
- Sambade, S., López, C., Rubio, L., Flores, R., Guerri, J., and Moreno, P. 2003. Polymorphism of a specific region in gene *p23* of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Archives of Virology* 148:2325–2340.
- Sandoval-Alejos, B.D. 2005. Evaluación de antisueros producidos contra la proteína recombinante de la cápside del virus tristeza de los cítricos. Tesis de Biólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 49p.
- Sequeira, Z., and Nolasco, G. 2002. Bacterial expressed coat protein: development of a single antiserum for routine detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathologia Mediterranea* 41:55-62.
- Suastika, G., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T., Ieki, H., and Okuda, S. 2001. Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. *Journal of General Plant Pathology* 67:73-77.

- Targon, M.L.P.N., Nikolaeva, O., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Müller, G.W., and Machado, M.A. 1997. Coat protein gene of a Brazilian isolate of the *Citrus tristeza virus*: cloning, expression in *E. coli* and production of polyclonal antiserum. *Fitopatologia Brasileira* 22:99-102.
- Tatineni, S., Robertson, C., Garnsey, S.M., Bar-Joseph, M., Gowda, S., and Dawson, W.O. 2008. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* 376:297-307.
- Tatineni, S., and Dawson, W.O. 2012. Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus tristeza virus*. *Journal of Virology* 86:7850–7857.
- Torres, Y., Guzmán, M., Chaparro, O., Oliveros, Ó., Acosta, O., y Peñaranda, J. 2003. Obtención de un anticuerpo contra la proteína p65 del virus de la tristeza de los cítricos y resultados preliminares de la expresión in vivo. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2:32–39.
- Tsuchizaki, T., Sasaki, A., and Saito, Y. 1978. Purification of *Citrus tristeza virus* from diseased citrus fruits and the detection of the virus in citrus tissues by fluorescent antibody techniques. *Phytopathology* 68:139-142.
- Vaira, A.M., Vecchiati, M., Masenga, V., and Accotto, G.P. 1996. A polyclonal antiserum against a recombinant viral protein combines specificity with versatility. *Journal of Virological Methods* 56:209-219.
- Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J.G., Pérez de San Román, C., and Sanz, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies Specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology* 67:91-96.
- Vives, M., Rubio, L., López, C., Navas-Castillo, J., Albiachi-Martí, M.R., Dawson, W.O., Guerra, J., Flores, R., and Moreno, P. 1999. The complete characterization genome sequence of the mayor component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *Journal of General Virology* 80:811-816.
- Wang, C.Y., Shieh, H.K., Shien, J.H., Ko, C.Y., and Chang, P.C. 2005. Expression of capsid proteins and non-structural proteins of waterfowl parvoviruses in *Escherichia coli* and their use in serological assays. *Avian Pathology* 34(5):376-382.

- Yakovleva, A.S., Shcherbakov, A.V., Kan'shina, A.V., Mudrak, N.S., and Fomina, T.A. 2006. Use of the recombinant nonstructural 3A, 3B, and 3AB proteins of foot-and-mouth disease virus in indirect ELISA for differentiation of vaccinated and infected cattle. *Molecular Biology* 40:165-171.
- Yang, Z.N., Mathews, D.M., Dodds, A.J., and Mirkov, T.E. 1999. Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* 19:131-142.
- Yokomi, R.K., Saponari, M., and Sieburth, P.J. 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 100:319-327.

Apéndice A
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Sulfato de amonio al 36%	
Sulfato de amonio	36 g
Agua bidestilada	100 mL

Materiales para Western Blot

Gel separador		
Reactivo	Volumen (10ml)	
	8%	12%
Agua bidestilada	4.6	3.3
Bisacrilamida 30%	2.7	4.0
Tris 1.5M pH 8.8	2.5	2.5
SDS 10%	0.1	0.1
APS 10%	0.1	0.1
TEMED	0.006	0.004

Gel concentrador	
Reactivo	Volumen (5ml)
Agua bidestilada	4.6
Bisacrilamida 30%	2.7
Tris 1.0M pH 6.8	2.5
SDS 10%	0.1
APS 10%	0.1
TEMED	0.006

Buffer Tris 1.0 M (pH 6.8)	
Tris	121.1 g/L
Ajustar pH con HCl 1 N	

Buffer Tris 1.5 M (pH 8.8)	
Tris	181.5 g/L
Ajustar pH con HCl 1 N	

SDS 10%	
Disolver 10 gr en H ₂ O y aforar a 100 mL de H ₂ O	

Persulfato de amonio 10 % APS	
Disolver 1 gramo en 9 mL de H ₂ O bidestilada	

Mezcla Lítica	
Buffer Tris 1 M (pH 6.8)	2.5 mL
SDS al 10%	4.0 mL
Glicerol	2.0 mL
2-β-Metamercaptoetanol	1.0 mL
H ₂ O bidestilada	0.5 mL

Buffer de electroforesis de proteínas 1X	
Tris	3.75 g/L
Glicina	18 g/L
SDS	1.25 g/L

NOTA: Antes de usarse se debe de filtrar. No hace falta ajustar el pH.

El marcador de peso molecular preteñido Kaleidoscope BIORAD contiene 10 bandas de proteína recombinante de *E. coli* de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 100, 150 y 250 kDa.

Solución de tinción	
Azul de Coomassie R-250	2.0 g
Metanol	100 mL
Ácido Acético	18 mL
Agua bidestilada	130 mL

Solución de destinción	
Metanol	100 mL
Ac. Acético	20 mL
H ₂ O bidestilada	80 mL

Buffer de transferencia	
Tris	3.0 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
Agua Bidestilada	800 mL

Rojo de Ponceau	
Ac. Acético	5%
Rojo de Ponceau	0.01%

Solución cromogénica	
BCIP	10 mg
NBT	5 mg
Buffer Tris 0.1 M	10 mL

Buffer TBS 10X	
Tris base	12.1 g/L
NaCl	87.6 g/L

NOTA: filtrar el buffer antes de usar, de este tomar el volumen requerido para hacer el buffer 1X.

Buffer TBS + Tween 20 al 2%	
TBS 1X	100 mL
Tween 20	2 mL

Buffer TBS + Tween 20 al 0.05%	
TBS 1X	1 L
Tween 20	0.5 mL

NOTA: este buffer se puede preparar a partir del Buffer TBS + 2% de Tween 20 tomando 25 mL + 975 mL de Buffer TBS 1X

Materiales para ELISA

Buffer de carbonatos 10X pH 9.6	
Na ₂ CO ₃	15.9 g/L
NaHCO ₃	29.3 g/L

NOTA: Antes de usarse se debe de filtrar. Ajustar el pH.

Buffer de fosfato salino (PBS)10X pH 7.4	
NaCl	80 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	29 g/L
O	O
Na ₂ HPO ₄ anhidro	11.5 g/L
KCl	2 g/L
NaN ₃ es opcional	2 g/L

NOTA: filtrar el buffer antes de usar, de este tomar el volumen requerido para hacer el buffer 1X.

Buffer empleado en cada paso de ELISA	
Buffer de lavado	PBS + 0.5ml Tween 20 por litro
Buffer de extracción	PBST + 2% de PVP (Sigma PVP-40)
Buffer de conjugado	PBST + 2% de PVP(Sigma PVP-40) + 0.2% de BSA (Sigma A9647)
Buffer de sustrato	2ml de trietanolamina CTR + 20ml de agua bidestilada. Ajustar el pH 9.8 con HCl concentrado.
Sustrato	Tabletas de pNPP de 20mg Sigma N2765

Apéndice B

ELECTROTRANSFERENCIA

I. Transferencia.

El gel de poliacrilamida al 12% se transferirá a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de la siguiente manera:

- a) Desmontar el gel de la cámara de electroforesis, retirar el vidrio y los separadores, cortar el gel quitando la parte del gel concentrador y la agarosa que se pone como sellador, se le hace un corte en la parte superior del gel para saber el frente del gel. Para manipular el gel usar guantes de látex.
- b) En la cámara de transferencia semi-seca Owl colocar papel filtro Whatman # 3 o el papel especial para transferir. Añadir un poco de buffer de transferencia para mojar el papel.
- c) Colocar el gel y con ayuda de una pipeta con buffer de transferencia eliminar las burbujas de aire que se formen entre el papel y el gel (véase Apéndice A).
- d) Cubrir con la membrana de nitrocelulosa previamente mojada con un poco de buffer de transferencia. Etiquetar la membrana con lápiz. Elimine las burbujas de aire de la misma manera que el paso anterior.
- e) Añadir buffer de transferencia sobre la membrana y colocar la otra pieza de papel, elimine las burbujas de aire de la misma manera que el paso anterior.
- f) Colocar la tapa de la cámara de transferencia y cerrarla.
- g) Conectar los cables a la fuente de poder y correr la transferencia a 300 mA por 2 h. Pasado el tiempo apagar la fuente de poder y retirar la membrana y el gel transferido.
- h) El papel filtro y las partes de la cámara de transferencia se enjuagan con agua bidestilada para retirar las sales del buffer.

II. Tinción de la membrana de nitrocelulosa con colorante rojo de Ponceau.

Añadir a la membrana el colorante cubriéndola por completo, dejar por 5 min para observar las bandas de las proteínas transferidas. Enjuagar con aguade la llave para quitar el exceso de colorante.

NOTA: el gel transferido se tiñe con azul de Coomassie para ver si se transfirió por completo.