

DetECCIÓN DEL VIRUS TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS MEDIANTE ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p25 DE LA CÁPSIDE BAJO UN SISTEMA DE INMUNOIMPRESIÓN

DETECTION OF *CITRUS TRISTEZA VIRUS* WITH ANTIBODIES DEVELOPED TO THE RECOMBINANT p25 CAPSID PROTEIN BY DIRECT TISSUE BLOT IMMUNOASSAY

María Magdalena Iracheta Cárdenas, Lourdes del Carmen Arrieta García, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Ave. Universidad s/n. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, NL, CP 66450, México; **Mario A. Rocha Peña**, UANL/FCB, Laboratorio de Virología Vegetal. Apdo. Postal 128 F. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, N.L., CP 66450, México. Correspondencia: mario.rochape@uanl.edu.mx

(Recibido: Marzo 26, 2012 Aceptado: Abril 24, 2012)

Iracheta CMM, Arrieta GLC y Rocha PMA. 2012. Detección del virus tristeza de los cítricos mediante anticuerpos contra la proteína recombinante p25 de la cápside bajo un sistema de inmunopresión. Revista Mexicana de Fitopatología 30:31-42.

Resumen. El virus tristeza de los cítricos *Citrus tristeza virus* (CTV) es de distribución mundial y ocasiona una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo de los cítricos. El análisis masivo de muestras de cítricos para la detección del CTV se lleva a cabo en forma rutinaria mediante la técnica serológica ELISA, o a través de su variante de inmunopresión directa en membranas de nitrocelulosa. En el presente trabajo se evaluó el empleo de anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante p25 del CTV para la detección del virus bajo un sistema inmunopresión en membranas de nitrocelulosa, empleando plantas de cítricos sanas y plantas con infección natural en el campo. Con la combinación de anticuerpos desarrollados en cabra (CB) anti-CTV y de conjugado comercial anti-IgG de cabra acoplada a fosfatasa alcalina, se obtuvo una reacción positiva con plantas infectadas por el CTV y negativa con plantas sanas. Asimismo, la combinación de anticuerpos CB anti-CTV conjugados con biotina y empleando avidina-AP como conjugado comercial, fue igualmente efectiva para discriminar plantas sanas e infectadas por el CTV. Adicionalmente, los anticuerpos CB anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV mostraron resultados comparables con los kits comerciales de inmunopresión de Plant Print y Agdia para la detección del CTV.

Palabras clave adicionales: Biotina, conjugados enzimáticos, estreptavidina.

Abstract. *Citrus tristeza virus* (CTV) is widespread and causes one of the most economical important viral diseases of citrus. The large scale analysis of citrus samples for CTV detection is conducted routinely by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or its variant named direct tissue blot immunoassay (= immunoprinting). In this study, we evaluated the use of polyclonal antibodies developed to recombinant p25 CTV coat protein for virus detection under an immunoprinting system by using healthy and field CTV infected citrus samples. The combination of goat (CB) anti-CTV/IgG anti-goat-AP conjugate provided a positive reaction with CTV infected plants, and negative with healthy citrus. In addition, the combination of goat CB anti-CTV coupled with biotin, plus avidin-AP as commercial conjugate was equally effective in discriminating CTV infected from healthy citrus. Furthermore, antibodies developed to the recombinant p25 CTV coat protein, either untagged or biotin conjugated showed comparable results with commercially available immunoprinting kits for CTV detection by Plant Print and Agdia.

Additional keywords: Biotin, enzyme conjugates, streptavidin.

Résumé. Le Citrus Tristeza Virus (CTV) est répandu dans le monde entier et provoque une maladie d'importance économique notable dans la culture des agrumes. L'analyse massive d'échantillons d'agrumes pour détecter le CTV est effectuée régulièrement par la technique sérologique ELISA, ou à travers sa variante d'immunoprinting directe en membranes de nitrocellulose. La présente étude a évalué l'utilisation d'anticorps développés contre la protéine recombinante p25 du CTV afin de détecter le virus dans un système d'immunotransfert sur des membranes de nitrocellulose, en utilisant des plants d'agrumes sains et

El virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV; familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*) es de distribución mundial y es el agente causal de una de las enfermedades de mayor importancia de cultivos de cítricos. El daño más dramático se presenta en árboles de naranja, toronja y mandarina injertados en patrón de naranjo agrio (*Citrus aurantium*), así como en árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) independiente del portainjerto utilizado o de que sean plantadas directo de semilla (Rocha *et al.*, 1995, 1998).

La detección en México del CTV es regulada a través de la Norma Oficial Mexicana No. 031 (SAGARPA, 2001) y es operada por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de cada estado citrícola. El análisis masivo de muestras de cítricos se lleva a cabo rutinariamente mediante la técnica serológica ELISA, o a través de su variante de inmunopresión directa en membranas de nitrocelulosa (DTBIA = direct tissue blot immunoassay). Desde el establecimiento de la Campaña de detección del CTV en 1995 (SAGAR, 1997) se han detectado plantas infectadas por el CTV en 20 entidades citrícolas del país (SAGARPA, 2006). No obstante la ausencia de síntomas de declinamiento en el campo, la presencia de plantas infectadas por el CTV representa una condición de peligro latente ya que la mayoría de las plantaciones con cítricos están injertadas en patrón de naranjo agrio, el cual es hipersensible a este virus. Asimismo, en la zona costera del Pacífico existen plantaciones extensivas de limón mexicano las cuales son vulnerables a infecciones por el CTV, lo cual también representa un factor de riesgo para esta agroindustria. Aunado a lo anterior la presencia en gran parte del territorio nacional del agente transmisor más eficiente del CTV, el pulgón café *Toxoptera citricida* (SAGARPA, 2006) agrava más la situación para la citricultura nacional en general con respecto a epifitias futuras por el CTV.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado anticuerpos contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV (Iracheta *et al.*, 2008); tales anticuerpos son de reacción poliespecífica contra una gama de aislamientos del CTV con propiedades biológicas diversas y de orígenes geográficos distintos; asimismo, han mostrado ser eficientes mediante la técnica ELISA en el análisis masivo de muestras a nivel de campo y comparables con kits comerciales disponibles para la detección del CTV (Iracheta *et al.*, 2009).

Partiendo que la Campaña Nacional de detección del CTV se basa en la técnica serológica ELISA en su modalidad de inmunopresión, se planteó el presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos: 1) Evaluar la reactividad específica de los anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante de la cápside p25 bajo el sistema de inmunopresión para la detección del CTV, ya sea solos o conjugados con biotina y estreptavidina; y 2) demostrar la funcionalidad de los anticuerpos anti-p25 solos o marcados y compararlos contra los anticuerpos utilizados en kits comerciales de inmunopresión de Print Print de España y Agdia de Estados Unidos.

infectés naturellement sur le terrain. Grâce à la combinaison d'anticorps développés chez la chèvre (CB) anti-CTV et le conjugué commercial anti-IgG de chèvre couplé à la phosphatase alcaline, une réaction positive a été obtenue avec des plantes infectées par le CTV, et une réaction négative avec des plantes saines. Par ailleurs, la combinaison d'anticorps CB anti-CTV conjugués avec la biotine, en utilisant l'avidine-AP comme conjugué commercial, était également efficace pour discriminer les plantes saines et celles infectées par le CTV. De plus, les anticorps CB anti-CTV développés contre la protéine recombinante p25 de capsid du CTV ont montré des résultats comparables avec des kits commerciaux d'immunoprinting de Plant Print et Agdia pour détecter le CTV.

Mots clés supplémentaires: biotine, conjugués enzymatiques, streptavidine.

Citrus tristeza virus (CTV) (family *Closteroviridae* genus *Closterovirus*), is distributed worldwide, and it is the causal agent of one of the most important diseases of citrus. The most dramatic damage takes place in orange trees, grapefruit and mandarin grafted on sour orange rootstock (*Citrus aurantium*), as well as in Mexican lime trees (*Citrus aurantifolia*) regardless of the rootstock or planted directly from the seed (Rocha *et al.*, 1995, 1998).

The detection of CTV in Mexico is regulated by the Mexican Official Standard No. 031 (SAGARPA, 2001), and it is operated by the Plant Protection Board in each state where citrus is grown. The large scale analysis of citrus sampling is routinely performed either by the ELISA serological technique, or by its direct immunoprinting variant in nitrocellulose membranes (DTBIA = direct tissue blot immunoassay). Infected plants by CTV have been detected in 20 citrus states nationwide (SAGARPA, 2006) since the CTV detection campaign established in 1995 (SAGAR, 1997). Even with the absence of decline symptoms in the field, the presence of CTV infected plants represents a permanent latent risk condition, because of most the citrus plantations are grafted on sour orange rootstock, which is hypersensitive to this virus. Likewise, there are extensive plantations of Mexican lime in the Pacific coast vulnerable to CTV infection, which also represents a risk factor for such citrus commodity. Furthermore, the presence of the most efficient insect vector, the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* in much of the citrus regions nationwide (SAGARPA, 2006), adds a risk factor for the entire national citrus industry, with regards to the occurrence of future CTV epidemics.

Antibodies against the CTV capsid p25 recombinant protein have been developed in our laboratory (Iracheta *et al.*, 2008); such antibodies can react are of a polyspecific reactivity against a range of CTV isolates with different biological properties and from different geographical origins; likewise, they have shown to be efficient through the ELISA technique for large scale sample analysis under field conditions, comparable with commercially available

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos. Para los diferentes ensayos de evaluación y desarrollo de los métodos de conjugación se emplearon anticuerpos policlonales desarrollados en cabras (clave CB) contra la proteína recombinante de la cápside p25 del virus tristeza de los cítricos (Iracheta *et al.*, 2008). Los anticuerpos CB anti-CTV presentes en el antisuero original se purificaron por precipitación con sulfato de amonio y se ajustaron a una concentración de 1 mg mL^{-1} mediante espectrofotometría DO_{280} (Clark *et al.*, 1986).

Tejido de cítricos. Para esta parte del trabajo, se tuvo acceso a una huerta con antecedentes de tener árboles con infección natural por el CTV en el municipio de General Terán, Nuevo León. El acceso a esta huerta fue a través del Comité Estatal de Sanidad Vegetal, con sede en Montemorelos. Se colectaron un total de tres plantas con antecedentes previos de infección por el CTV, así como las plantas circundantes a ellas en los cuatro puntos cardinales. Las muestras consistieron en brotes recién expandidos (Figura 1A), colectados alrededor de la copa de los árboles, a una altura aproximada de 1.50 m sobre el nivel del suelo. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético y se trasladaron al laboratorio bajo refrigeración. En un segundo muestreo se realizaron las impresiones directamente en el campo (Figura 1B-C), con tres impresiones de cada árbol a manera de repeticiones de cada muestra; las membranas con las muestras impresas se conservaron en sobres de papel bajo refrigeración previo a su uso.

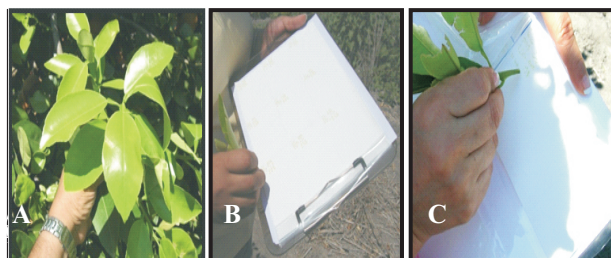


Figura 1. Toma de muestras de cítricos para la detección del virus de la tristeza mediante inmunopresión (DTBIA). **A.** Muestras de tejido primario (brote) obtenido de árboles de cítricos. **B** y **C** impresión directa sobre membranas de nitrocelulosa de muestras de tejido de árboles de cítricos.

Figure 1. Sampling for detection of citrus tristeza virus by immunoprinting (DTBIA). **A.** Primary tissue samples (shoots) obtained from citrus trees. **B** and **C** direct printing onto nitrocellulose membranes of tissue samples from citrus trees.

Las muestras se colectaron de árboles de toronja (*Citrus paradisi*), naranjo (*C. sinensis*) y naranjo agrio. Adicionalmente, se incluyeron como testigos negativos en el muestreo plantas de naranjo y los híbridos de mandarina Ortanique y Murcott, colectadas en el Banco de Variedades del Campo Experimental General Terán (Cuadro 1). Asimismo, las plantas se colectaron a finales del

kits for CTV detection (Iracheta *et al.*, 2009).

Considering that the National Campaign for CTV detection, is conducted by using the ELISA serological technique in its immunoprinting mode, this study was conducted with the following objectives: 1) to evaluate the specific reactivity of the antibodies developed against the capsid p25 recombinant protein under the immunoprinting system for CTV detection, either alone or conjugated with biotin and streptavidin; and 2) to demonstrate the anti-p25 antibodies functionality either alone or marked, and to compare them against the antibodies present in the immunoprinting commercial kits from Plant Print, Spain and Agdia, USA.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. Polyclonal antibodies developed in goats (CB code) against the CTV capsid p25 recombinant protein (Iracheta *et al.*, 2008) were used throughout the study in the different evaluation test and conjugation methods. The CB anti-CTV antibodies present in the original antisera were purified by ammonium sulfate precipitation and adjusted to a 1 mg mL^{-1} concentration by DO_{280} spectrophotometry (Clark *et al.*, 1986).

Citrus tissue. We have access to an citrus grove with history of having CTV naturally infected trees in the municipality of General Teran, Nuevo Leon; the access to this citrus grove was granted State Plant Protection Board located at Montemorelos. A total of three plants with a previous history of CTV infection were collected, as well as the plants surrounding them in the four cardinal points. The samples consisted of newly expanded shoots (Figure 1A) collected around the canopy at a 1.50 m height above ground level, approximately. The samples were placed in sealed polyethylene bags and taken to the laboratory under refrigeration. Prints were made in a second sampling directly in the field (Figure 1B-C), with three printings from each tree as replicates from each sample; the membranes with printed samples were stored in paper envelopes under refrigeration prior to be utilized.

Samples were collected from grapefruit (*Citrus paradise*), orange (*C. sinensis*) and sour orange trees. Sweet orange plants, as well as Ortanique and Murcott mandarin hybrids, included in the sampling as negative controls, were collected at the General Teran of Experimental Station Variety Block (Table 1). Likewise, the plants were collected in late February and early March in two consecutive years (2008 and 2009). All the collected samples were analyzed by the ELISA test with anti-CTV polyclonal antibodies, specific for the capsid p25 recombinant protein (Iracheta *et al.*, 2009), to verify their status with regard to CTV (Table 1).

Conjugation methods. The CB goat antibodies developed against the CTV capsid recombinant protein were coupled to biotin and streptavidin with different cross-linking agents (Table 2) following the conjugation methodologies described by Scopes (1985).

Each one of the conjugation protocols, at unless otherwise stated, was carried out with 1 mg mL^{-1} of anti-CTV CB antibodies diluted in acetate buffer, TBS, or bidistilled water if necessary, and coupled to the biotin and streptavidin

Cuadro 1. Muestras de tejido de plantas de toronja injertadas sobre naranjo agrio con antecedentes de infección por el virus de la tristeza. Huerta Los Castores, localidad "Las Anacuitas", Municipio de General Terán, Nuevo León. Febrero-marzo, 2008 y 2009.

Table 1. Tissue samples from grapefruit plants grafted on sour orange with a history of CTV infection. Los Castores grove, "Las Anacuitas" location, municipality General Teran, Nuevo Leon. February-march, 2008 and 2009.

No.	Clave	Variedad	Reacción ELISA	No.	Clave	Variedad	Reacción ELISA
1	0302 A9	Toronja	(-)	11	0115 A12	Toronja	(-)
2	0302 A10	Toronja	(+)	12	0115 A11	Toronja	(+)
3	0302 A10.1	Toronja	(-)	13	0115 A11.1	Toronja	(-)
4	0302 A11	Toronja	(-)	14	0115 A11.2	Toronja	(-)
5	0301 A10.2	Toronja	(-)	15	0115 A10	Toronja	(-)
6	0202 A27.1	Toronja	(-)	16	5337 A17	Naranja agrio	(+)
7	0202 A27	Toronja	(+)	17	5337 A1	Naranja*	(-)
8	0202 A28	Toronja	(-)	18	5337 A2	Naranja	(+)
9	0203 A4	Toronja	(-)	19	Sin Clave	Ortanique*	(-)
10	0203 A521	Toronja	(-)	20	Sin Clave	Murcott*	(-)

*Plantas colectadas en el Banco de Variedades del Campo Experimental General Terán como testigos sanos.

mes de febrero y principios de marzo en dos años consecutivos (2008 y 2009). Todas las muestras colectadas se sometieron a la prueba de ELISA con anticuerpos policlonales anti-CTV específicos para la proteína recombinante p25 de la cápside (Iracheta *et al.*, 2009) para verificar su condición con respecto al CTV (Cuadro 1).

Métodos de conjugación. Los anticuerpos desarrollados en cabra CB contra la proteína recombinante de la cápside del CTV se acoplaron a biotina y estreptavidina con diferentes agentes entre-cruzantes (Cuadro 2) siguiendo las metodologías de conjugación descritas por Scopes (1985).

En términos generales, cada uno de los protocolos de conjugación se llevaron a cabo con 1 mg mL⁻¹ de anticuerpos CB anti-CTV diluidos en solución amortiguadora de acetatos, TBS, o agua bidestilada, según fuera el caso y se acoplaron a las moléculas de biotina o estreptavidina en concentraciones de 1-5 mg (Scopes, 1985). Al final de cada protocolo, los conjugados preparados se sometieron en forma individual a diálisis en 4 L de solución amortiguadora de TBS 1% como sigue: un paso de diálisis durante 3 h a temperatura ambiente y uno más con solución nueva de TBS durante 18 h a 5°C.

Protocolo de inmunopresión (DTBIA) (Garnsey *et al.*, 1993). El protocolo de inmunopresión fue como sigue: 1.- Impresión del tejido (peciolos y/o tallos) de cítricos en membranas de nitrocelulosa; 2.- Incubación de las membranas en solución de saturación (BSA 0.2%, Tween 20, 0.2% y Triton 100, 0.2%, en Tris salino pH 10), durante 10 min; 3.- Incubar las membranas con el anticuerpo anti-CTV (cabra CB, 1 µg mL⁻¹) diluido en solución de saturación e incubar a temperatura ambiente durante 2 h; 4.- Lavado de las membranas con Tris salino/Tween 20 al 0.2% con tres cambios durante 30 min; 5.- Incubar las membranas con el

molecules in 1-5 mg concentrations (Scopes, 1985). The prepared conjugates were subjected to dialysis at the end of each protocol in 4 L of TBS 1% buffer solution, as follows: one 3 h dialysis step at room temperature and one more with a new TBS solution for 18 h at 5°C.

Immunoprinting protocol (DTBIA) (Garnsey *et al.*, 1993). The immunoprinting protocol was performed as follows: 1.- Citric tissue printing (petioles and / or stems) onto nitrocellulose membranes; 2.- membranes incubation in blocking solution (BSA 0.2%, Tween 20, 0.2% and Triton 100, 0.2%, in Tris saline pH 10), for 10 min; 3.- The membranes were incubated with anti-CTV (goat CB, 1 µg mL⁻¹) diluted in a blocking solution at room temperature for 2 h; 4.- The membranes were washed with Tris saline/Tween 20 at 0.2% with three changes for 30 min; 5.- The membranes were incubated with commercial goat anti-IgG coupled to alkaline phosphatase (Sigma A4187) diluted 1:30,000 in blocking solution for 2 h; 6.-The washing process previously outlined was repeated; 7.- The BCIP/NBT substrate solution (Sigma B3804) was applied. Regarding the anti-CTV goat antibodies coupled to either biotin or streptavidin, along with their corresponding enzymatic conjugates, they substituted the goat anti-CTV CB and their corresponding anti-goat IgG in the immunoprinting tests. Once the immunoprinting trials optimal conditions had been established, they were carried out simultaneously with the immunoprinting kits from the companies Plant Print (Valencia, Spain) and Agdia (Elkhart, Indiana, USA).

Each commercial kit was used as recommended by their manufacturers with their antibodies and buffers; the only difference was that the Schleicher & Shuell BA-S 85 membranes were used. The results were evaluated visually and at 20X magnifying lens.

Cuadro 2. Sistemas de conjugación de biotina y estreptavidina, con anticuerpos contra la proteína recombinante p25 del virus de la tristeza (CTV).

Table 2. Biotin and streptavidin conjugation systems with antibodies against CTV p25 recombinant protein.

Anticuerpos	Ligando	Agente entre-cruzante*	Calve	Conjugado comercial*
Cabra CB anti-CTV	Biotina	-	CB	IgG anti-IgG de cabra-AP Estreptavidina-AP, o
		NHS	CB-BN	
		Maleimida	CB-BM	
	Estreptavidina	Hidrazida	CB-BH	
		Maleimida	CB-EM	IgG anti-biotina-AP Biotina-AP
		Glutaraldehido	CB-EG	
Peryodato	CB-EP			

*Todos los agentes entre-cruzantes y conjugados comerciales fueron adquiridos de Sigma.

conjugado comercial anti-IgG de cabra acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma A4187) diluido 1:30,000 en solución de saturación durante 2 h; 6.- Repetir el proceso de lavado señalado en el punto anterior; 7.- Aplicación de solución de revelado BCIP/NBT (Sigma B3804). Para el caso de anticuerpos de cabra anti-CTV acoplados ya sea a biotina o estreptavidina, junto con sus respectivos conjugados enzimáticos, éstos sustituyeron a los anticuerpos anti-CTV de cabra CB y su respectivo conjugado IgG anti-cabra, en las pruebas de inmunopresión. Una vez establecidas las condiciones óptimas de los ensayos de inmunopresión, éstos se llevaron a cabo en forma simultánea con los kits de inmunopresión de las compañías Plant Print (Valencia, España) y Agdia (Elkhart, Indiana, USA). Cada estuche comercial se empleó según las recomendaciones de sus fabricantes, con sus anticuerpos y soluciones amortiguadoras; la única variante fue que se emplearon membranas Schleicher & Shuell BA-S 85. Los resultados se evaluaron en forma visual y con acercamiento mediante lentes con un aumento de 20X.

RESULTADOS

Implementación del sistema de inmunopresión con anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante del CTV. La efectividad de los anticuerpos de cabra CB anti-CTV se evaluó en un sistema de inmunopresión para la detección del CTV en muestras infectadas en forma natural en el campo.

En un primer ensayo, el tejido de las plantas colectadas en febrero del 2008 no tenía tejido lo suficiente tierno para efectuar las inmunopresiones sobre las membranas de nitrocelulosa, por lo que se tomó la determinación de someterlo a un proceso de congelación/descongelación previo a la impresión sobre las membranas (Figura 2A). Bajo este sistema, las muestras con antecedentes de ser positivas al CTV mostraron una reacción positiva al CTV mediante el empleo del anticuerpo CB de cabra sin marca (Figura 2B). Asimismo, muestras de tejido de plantas vecinas a las CTV positivas, así como el

RESULTS

Immunoprinting system implementation with antibodies developed against CTV recombinant protein.

The goat anti-CTV CB antibodies effectiveness was evaluated in a CTV detection immunoprinting in naturally infected plants in the field.

The plant tissue collected in February 2008 did not have enough soft tissue, in order to carry out the immunoprinting on nitrocellulose membranes in the first test; consequently, it was subjected to a freezing / thawing process prior to membranes printing (Figure 2A). Under such system, samples with a history of being CTV positive revealed a positive reaction to CTV through the use of untagged goat CB antibody (Figure 2B).

Moreover, plant tissue samples adjacent to the positive CTV, as well as the mandarin hybrid tissue collected from the General Teran Experimental Station Variety Block had a negative reaction to CTV (Figure 2B). Three blocking solutions were evaluated in this same assay in order to determine the best anti-CTV reaction and color resolution on nitrocellulose membranes. The positive and negative CTV samples discrimination reaction was obtained in a consistent manner with a solution composed by Tween 20, 0.2% + Triton X-100, 0.2% + BSA 0.2 % diluted in Tris saline (Figure 1B). Inconsistent detection results were revealed by the saturated solutions composed of Tween 20 0.3% + BSA 0.2 % (Figure 2C) and Tween 1 % (Figure 2D).

A positive reaction is shown in Figure 3, on the 1, 5 and 10 samples in the three membranes at different anti-CTV CB antibodies concentrations; 1:300, 1:1,000 and 1:3,000 (Figure 3B-D) and IgG anti-goat-AP at a 1:30,000 dilution as a secondary antibody. After having these incubated according to protocol, it was possible to observe that an efficient discrimination of both healthy and CTV infected plants had been achieved by the three different dilutions; nonetheless, the most consistent results were accomplished with the 1:1000 dilution, in terms of blue-purple intensity, selecting this dilution for subsequent tests.

Titer determination of anti-CTV CB antibodies

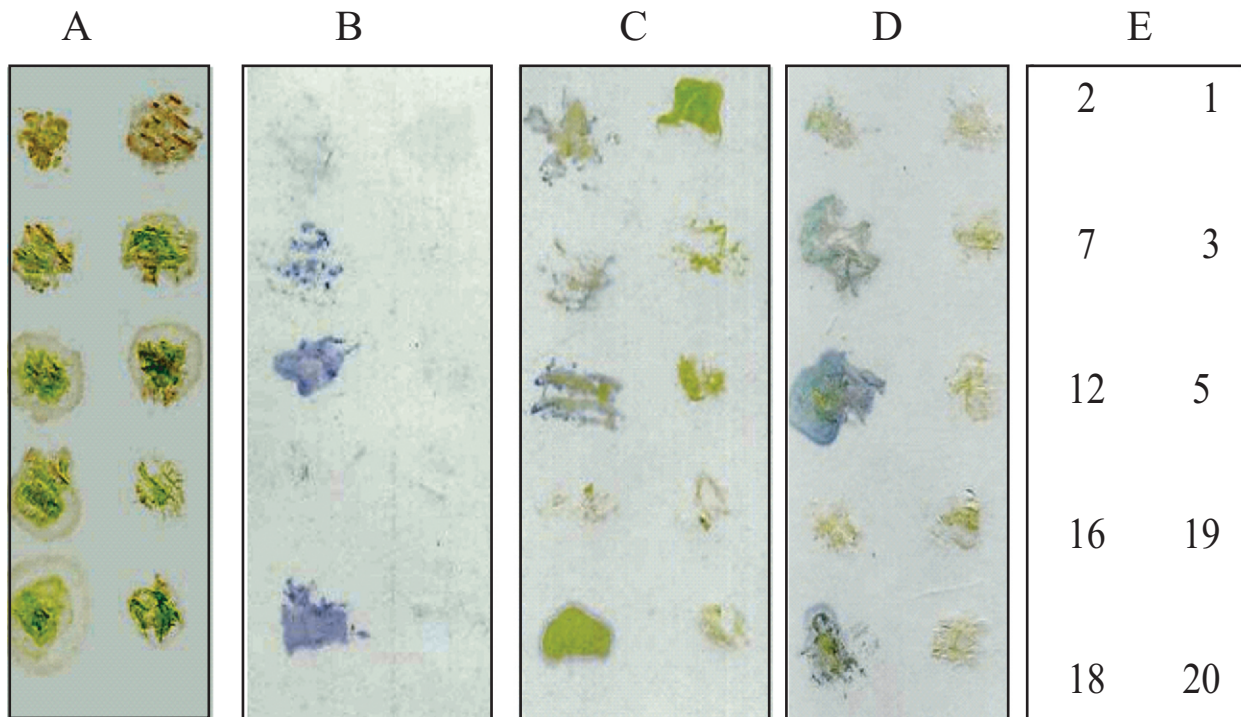


Figura 2. Detección del virus de la tristeza (CTV) en muestras de cítricos mediante ensayos de inmunopresión: Ensayo de diferentes soluciones de saturación (bloqueo). **A.** Membrana con muestras de cítricos a evaluar. **B.** Tween 20, 0.2% + Triton X-100, 0.2% + BSA 0.2%; **C.** Tween 20 0.3% + BSA 0.2 %; **D.** Tween 1%. **E.** Distribución en las membranas de las muestras de cítricos sanas e infectadas por el CTV. Los números indican las muestras enlistadas en el Cuadro 1 (muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18).

Figure 2. Detection of citrus tristeza virus (CTV) in citrus samples by immunoprinting test: Assay of different blocking solutions. **A.** Citrus samples onto membrane prior to be evaluated. **B.** Tween 20 + 0.2% Triton X-100, 0.2% BSA + 0.2%; **C.** Tween 20 0.3% + 0.2% BSA ; **D.** 1% Tween. **E.** Distribution of healthy and CTV infected samples in the membranes. The numbers indicate the samples listed in Table 1 (samples infected with CTV = 7, 12 and 18).

tejido de hidratos de mandarinas colectados del Banco de Variedades del Campo Experimental General Terán mostraron una reacción negativa al CTV (Figura 2B). En este mismo ensayo se evaluaron tres soluciones de saturación para determinar la mejor reacción al anticuerpo anti-CTV y resolución de color en las membranas de nitrocelulosa. La reacción de discriminación de muestras CTV positivas y negativas se obtuvo en forma consistente con la solución compuesta por Tween 20, 0.2% + Triton X-100, 0.2% + BSA 0.2 % diluidos en Tris salino (Figura 2B). Las soluciones de saturación compuestas por Tween 20 0.3% + BSA 0.2 % (Figura 2C) y Tween 1 % (Figura 2D), mostraron resultados inconsistentes de detección.

En la Figura 3 se muestra la reacción positiva en las muestras 1, 5 y 10 en las tres membranas a diferentes concentraciones de anticuerpo CB anti-CTV; 1:300, 1:1,000 y 1:3,000 (Figura 3B-D) y anti-IgG de cabra-AP a una dilución de 1:30,000 como anticuerpo secundario. Se incubaron siguiendo el protocolo establecido, se pudo observar que a las tres diferentes diluciones se logró una discriminación eficiente de plantas sanas e infectadas por el CTV; sin embargo, con la dilución 1:1000 se obtuvieron los resultados más consistentes en cuanto a la intensidad de la coloración azul-morada, seleccionando esta dilución para

conjugated with biotin and streptavidin. Anti-CTV antibodies titration, biotin and streptavidin conjugated with each one of the cross-linkin agents (Table 2), was performed at 1:300, 1:1,000 and 1:3,000 dilutions each, and evaluated by immunoprinting testing with healthy in CTV infected tissue (Table 1). Also, the different corresponding commercial enzyme conjugates for each one of them (Table 2) were used under the manufacturers recommended dilutions.

Different results were obtained for according to degrees of consistency and intensity in the detection signal for CTV infected samples, which differed from faint or none to distinct intensive signal for CTV infected plants, as compared to healthy samples (data not shown). For all the prepared conjugates with the different cross-linking agents, the combination of anti-CTV CB antibodies biotin via hydrazide (1:3,000) + avidin-AP (1:1,000) labeled revealed 100% discrimination similar results from both positive and negative samples (Figure 4). The rest of the biotin and streptavidin prepared conjugates showed inconsistent detection result (data not shown).

Evaluation of conjugated in immunoprinting tests. Once the optimal test dilutions were as determined in terms of blocking solution and dilution for each one of the

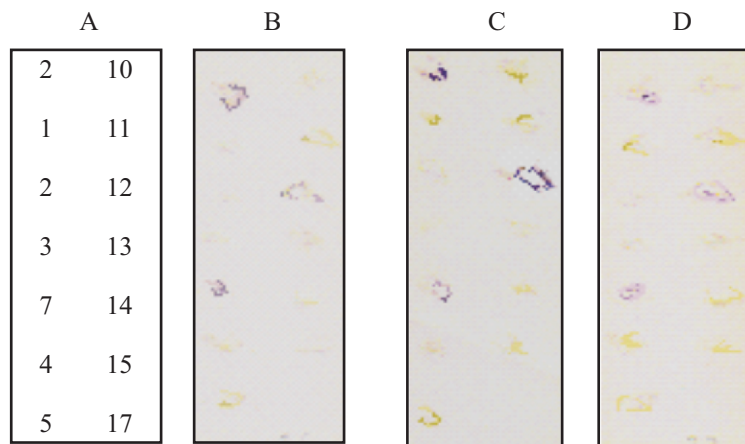


Figura 3. Evaluación de los anticuerpos de cabra CB específicos para el virus de la tristeza (CTV) (anti-CTV) para la detección del CTV en ensayos de inmunopresión. **A.** Localización de las muestras sobre las membranas (Tabla 1, muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18). **B, C y D,** membranas incubadas con una solución de anti-CTV (CB), a diluciones de 1:300, 1:1,000 y dilución 1:3,000, respectivamente y conjugado comercial IgG anti-cabra 1:30,000.

Figure 3. Evaluation of CB goat antibodies for CTV (anti-CTV) detection in immunoprinting tests. **A.** sample location on the membranes (Table 1, CTV infected samples = 7, 12, and 18). **B, C and D.** Incubated membranes with anti-CTV CB solution at 1:300, 1:1,000 and 1:3,000 dilutions, respectively, and IgG anti-goat 1:30,000 commercial conjugate.

los ensayos posteriores.

Determinación del título de los anticuerpos CB anti-CTV conjugados con biotina y estreptavidina. La titulación de los anticuerpos anti-CTV, conjugados con biotina y estreptavidina, con cada uno de los agentes entrecruzantes (Cuadro 2), se efectuó en diluciones de 1:300, 1:1,000 y 1:3,000 para cada uno de ellos y se evaluaron mediante ensayos de inmunopresión con tejido sano e infectado por el CTV (Cuadro 1). Asimismo, los diferentes conjugados enzimáticos comerciales respectivos para cada uno de ellos (Cuadro 2) se emplearon a las diluciones recomendadas por los fabricantes.

Se obtuvieron resultados diversos en cuanto a consistencia y grados de intensidad en la señal de detección para muestras infectadas por el CTV, los cuales variaron desde escasa o nula señal, hasta señal intensiva distintiva de plantas infectadas por el CTV con respecto a las plantas sanas (datos no mostrados). De todos los conjugados preparados con los anticuerpos CB anti-CTV, la combinación de anticuerpos CB anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) + avidina-AP (1:1,000), mostró resultados similares de 100% de discriminación de muestras positivas y negativas (Figura 4). El resto de los conjugados preparados a base de biotina y estreptavidina (Cuadro 2) mostraron resultados inconsistentes de detección (datos no mostrados).

Evaluación de conjugados en ensayos de inmunopresión. Una vez determinada las diluciones óptimas del ensayo en cuanto a solución de saturación y dilución de cada uno de los anticuerpos anti-CTV sin marca y conjugados, se procedió a evaluar cada uno de ellos en ensayos de inmunopresión con las mismas muestras de cítricos con infección positiva al CTV enlistadas en el Cuadro 1 (Figura 1B-C), con tres impresiones de cada árbol a manera de repeticiones de cada muestra y su comparación

untagged and conjugated anti-CTV antibodies, an evaluation of each immunoprinting tests was carried out with the same citrus CTV positive infected samples listed on Table 1 (Figure 1B-C), with three printings of each tree as replicates of each sample and simultaneously compared

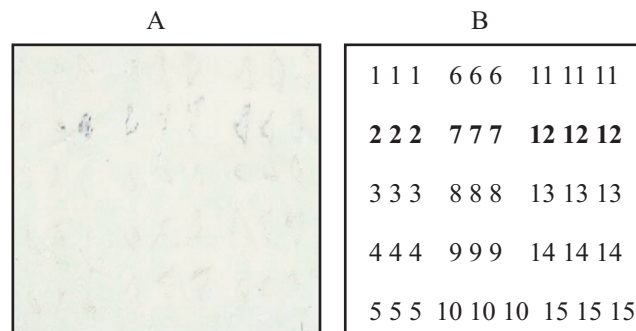


Figura 4. Ensayo de inmunopresión con anticuerpos CB específicos para el virus de la tristeza (CTV) marcados con biotina y muestras de plantas de cítricos sanas e infectadas por el CTV. **A.** Combinación de anticuerpos anti-CTV CB-B marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) y avidina-AP (1:1,000). **B.** Disposición de muestras de cítricos sanos e infectados por el CTV. Los números indican las muestras enlistadas en el Cuadro 1 (muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18).

Figure 4. Immunoprinting tests with antibodies specific for CTV CB virus and biotin marked citrus plant samples both healthy and CTV infected. **A.** Combination of anti-CTV CB-B antibodies biotinylated via hydrazide (1:3,000) and avidin-AP (1:1,000). **B.** Healthy and CTV infected sample distribution provision. The listed sample distribution is indicated by the numbers in Table 1 (CTV infected samples = 7, 12, and 18).

en forma simultánea con los kits de inmunoimpresión de las compañías Plant Print y Agdia.

Con la combinación de anticuerpos CB anti-CTV + anti-IgG de cabra-AP empleando la solución de saturación compuesta por Tween 20, 0.2% + Triton X-100 0.2% + BSA 0.2 % diluidos en Tris salino, se obtuvo un 100% de discriminación de muestras CTV positivas de las plantas sanas (Figura 5C). Asimismo, con la combinación de anticuerpos CB anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) + avidina-AP 1:1,000, se obtuvieron resultados similares de 100% de discriminación de muestras positivas y negativas al CTV (Figura 5D). Con los kits de inmunoimpresión de Plant Print (Figura 5E) y de Agdia (Figura 5F) se obtuvieron resultados similares de discriminación de muestras CTV positivas y negativas,

with the immunoprinting kits from the companies Plant Print and Agdia.

With the combination of antibodies anti-CTV CB + anti-goat IgG-AP using the blocking solution consisting of Tween 20, 0.2% Triton X-100 + 0.2% + 0.2% BSA diluted in Tris saline, yielded a 100% CTV discrimination of positive samples of healthy plants (Figure 5C). Also, with the combination of antibodies anti-CTV CB biotinylated via hydrazide (1:3,000) + avidin-AP 1:1,000, similar results were obtained 100% discrimination of positive and negative samples CTV (Figure 5D). With kits immunoprinting kits from Print Plant (Figure 5E) and Agdia (Figure 5F) similar results of discrimination between CTV positive and negative were obtained, respectively. This results revealed a 100% likelihood in the reaction obtained with CB antibody

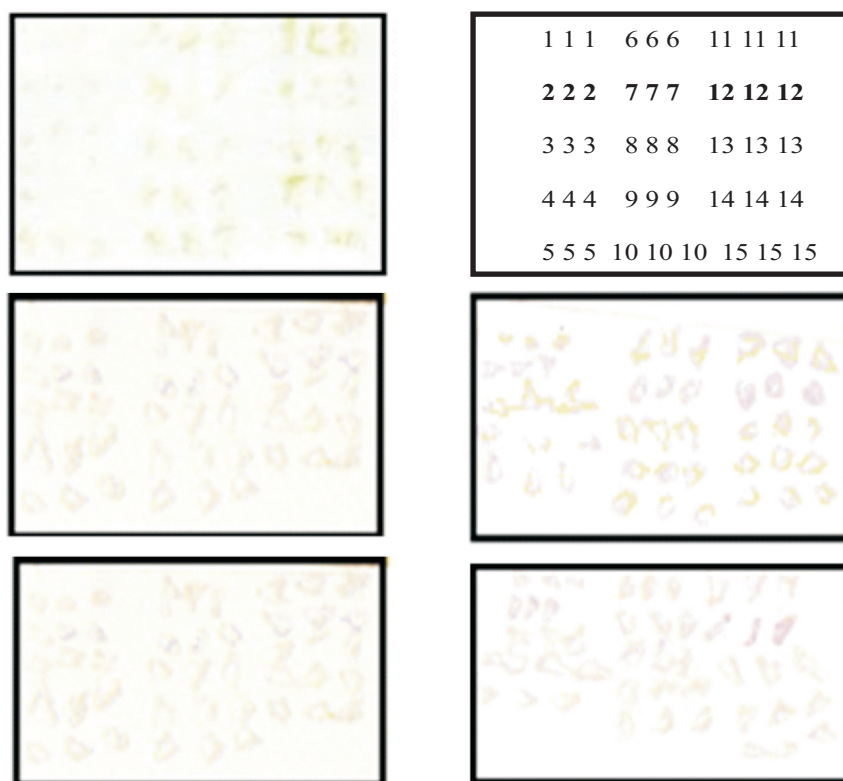


Figura 5. Evaluación comparativa entre los anticuerpos anti-CTV solos y marcados con biotina y dos kits comerciales. **A.** Vista de una membrana impresa en campo previo a su análisis mediante inmunoimpresión. **B.** Disposición de muestras de cítricos sanos e infectados por el CTV. Los números indican las muestras enlistadas en el Cuadro 1 (muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18). **C.** Combinación de anticuerpos de cabra CB anti-CTV (1:1,000) y conjugado enzimático comercial anti-IgG de cabra acoplado a fosfatasa alcalina (1:30,000). **D.** Combinación anticuerpos CB anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) y avidina-AP (1:1,000). **E.** Estuche comercial de inmunoimpresión de Plant Print (cortesía del Dr. Mariano Cambra, IVIA España). **F.** Estuche comercial de inmunoimpresión de Agdia IPK 78901/0010 (cortesía del Ing. César García, Fumaplant, México).

Figure 5. Comparative evaluation of anti-CTV antibodies alone and biotin conjugates with two commercial immunoprinting kits. **A.** View of a membrane printed in the field prior to immunoprinting analysis. **B.** healthy and CTV infected citrus samples provision. The listed sample distribution is indicated by the numbers in Table 1 (CTV infected samples = 7, 12, and 18). **C.** Goat CB anti-CTV antibodies combination (1:1,000) and goat anti-IgG commercial enzyme conjugate coupled to alkaline phosphatase (1:30,000). **D.** Combination of anti-CTV CB antibodies couplet with biotin via hydrazide (1:3,000) and avidin-AP (1:1,000). **E.** Plant Print immunoprinting commercial kit (courtesy of Dr. Mariano Cambra, IVIA Spain). **F.** Agdia IPK 78901/0010 immunoprinting commercial kit (courtesy of Engineer Cesar García, Fumaplant, Mexico).

respectivamente. Lo anterior, puso en evidencia el 100% de similitud en la reacción obtenida con los anticuerpos CB anti-CTV solos o acoplados a biotina, con respecto a los kits comerciales de inmunopresión de Plant Print y Agdia, respectivamente.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio para la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV (Iracheta *et al.*, 2008) para la detección del virus en plantas de cítricos. El estudio consistió en evaluar los anticuerpos anti-CTV solos o marcados con biotina o estreptavidina en ensayos de inmunopresión en membranas de nitrocelulosa, teniendo como referencia muestras de plantas de cítricos sanas y con infección natural en el campo por el CTV.

Se determinó que los anticuerpos anti-CTV sin marca en dilución 1:1,000 y 1:3,000 fueron eficientes para discriminar en un 100% plantas infectadas por el CTV de plantas sanas (Figura 3C-D). Lo anterior empleando anti-IgG de cabra acoplada fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario en dilución 1:30,000. Asimismo, se encontró una eficiencia del 100% en la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV fue el conjugado con biotina empleando hidrazida como vehículo de conjugación en dilución 1:3,000, en combinación con el conjugado comercial a base de avidina-AP en dilución 1:1,000 (Figura 4). Asimismo, estos resultados fueron consistentes y comparables con los obtenidos con los kits comerciales disponibles de inmunopresión para el CTV de las compañías Plant Print (Figura 5E) de España y Agdia (Figura 5F) de los Estados Unidos.

La técnica de inmunopresión desde su implementación (Garnsery *et al.*, 1993), ha sido sujeta a ensayos subsiguientes para incrementar su simpleza y su eficiencia en la detección del CTV. Lo anterior ha incluido el desarrollo de anticuerpos anti-CTV fusionados con la enzima fosfatasa alcalina mediante el sistema de expresión en *Escherichia coli* (Terrada *et al.*, 2000), así como la pre-incubación de anticuerpos anti-CTV y anticuerpos secundarios conjugados antes de su aplicación a las membranas (Agdia, 2008; Lin *et al.*, 2006). En el presente trabajo se intentó utilizar el sistema de amplificación biotina/estreptavidina para potenciar la efectividad de los anticuerpos y así incrementar la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, la conjugación de los anticuerpos anti-CTV con estreptavidina no arrojó los resultados de reacción ni amplificación esperados.

Una posible explicación de la falla de reactividad y/o amplificación en los conjugados a base de estreptavidina pudo haberse debido a la naturaleza propia de los reactivos entre-cruzantes empleados y/o el acoplamiento de éstos a los aminoácidos presentes en las regiones Fab de las inmunoglobulinas, limitando así la unión antígeno/anticuerpo respectiva y por consecuencia disminuyendo la capacidad de detección. Por otra parte, a diferencia de la biotina que posee un peso de 224.31 daltons, la estreptavidina tiene un peso aproximado de 67,000 daltons, lo cual puede también reducir de manera

alone or anti-CTV coupled to biotin, with respect to commercial immunoprinting kits from Print Plant and Agdia, respectively.

DISCUSSION

The current work was conducted to evaluate antibodies to the recombinant CTV capsid p25 protein developed in our laboratory (Iracheta *et al.*, 2008) for detection of CTV in citrus plants virus were evaluated in the study hereby. The study consisted in having the anti-CTV antibodies evaluated, either alone or labeled with biotin or streptavidin in immunoprinting tests on nitrocellulose membranes, with healthy citrus plants reference samples and naturally infected by CTV.

It was determined that the unlabeled anti-CTV antibodies at 1:1,000 and 1:3,000 dilution were 100% efficient to discriminate CTV infected plants from healthy citrus (Figure 3C-D). This was obtained reached by using goat anti-IgG coupled to alkaline phosphatase as the secondary antibody in the 1:30,000 dilution. Furthermore, 100% efficiency in discrimination of healthy from CTV infected samples was obtained reached with the anti-CTV antibodies conjugated with biotin at 1:3,000 using hydrazide as a cross-linking agent in combination with the avidin-AP commercial conjugate at 1:1,000 dilution. Likewise, these results were consistent and comparable with those obtained with the commercial immunoprinting kits for CTV detection available from Plant Print (Figure 5E), Spain, and Agdia (Figure 5F), USA.

The immunoprinting technique, since its implementation (Garnsery *et al.*, 1993), has been subjected to subsequent assays to enhance its simplicity and efficiency for CTV detection. Such fact has included the anti-CTV antibodies fused with the alkaline phosphatase enzyme, using the expression system in *Escherichia coli* (Terrada *et al.*, 2000), as well as the anti-CTV antibodies pre-incubation and secondary antibodies conjugated prior membranes their use (Agdia, 2008; Lin *et al.*, 2006). In our study, we attempted to utilize the biotin/streptavidin amplification system in order to enhance the antibodies effectiveness and thus increase the technique sensitivity. However, the conjugation of anti-CTV antibodies with streptavidin did not yield the reaction nor the amplification expected. A possible explanation for the failure on reactivity and / or amplification in the streptavidin based conjugates may have been due to the nature of the reactive cross-linking agents, and/or to the their coupling to the aminoacids present in the immunoglobulin Fab regions, thereby limiting the corresponding antigen/antibody reaction, and consequently accordingly limiting its detection capability. Additionally, unlike biotin, which has a weight of 224.31 Daltons, streptavidin has an approximate weight of 67,000 Daltons, which can also significantly reduce the immunoglobulins biological activity as they couple to streptavidin (Scopes, 1985).

The advantage provided by the immunoprinting technique for CTV detection relies particularly in its simplicity and relatively short period of time for the implementation, since it does not require neither preparation

significativa la actividad biológica de las inmunoglobulinas cuando están acopladas a estreptavidina (Scopes, 1985).

La ventaja que ofrece la técnica de inmunopresión para la detección del CTV, radica particularmente en su simpleza y tiempo relativamente corto para su ejecución, por no requerir el proceso de preparación o extracción de la muestra (Garnsey *et al.*, 1993). En términos generales, una vez que las muestras han sido impresas en las membranas de nitrocelulosa, la prueba completa puede ser terminada en un par de horas (Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2000b). La técnica de inmunopresión ha llegado a ser una herramienta indispensable para el análisis masivo de muestras de cítricos en la detección del CTV en plantaciones comerciales, así como en viveros en apoyo a los programas de saneamiento y certificación de diversos países, como Argentina (Stein *et al.*, 2009), Chile (Besoain *et al.*, 2003), Colombia (Caicedo y Muñoz, 2006), Cuba (Batista *et al.*, 2005) y España (Cambra, *et al.*, 2000a, 2000b), entre otros (Anfoka *et al.*, 2005; Djelouah y D'Onghia, 2009; Korkmaz, 2002). En la República Mexicana se ha utilizado para la detección del CTV a nivel nacional en todos los estados citrícolas del país (SAGARPA, 2006). Asimismo, se ha empleado en diversos estudios de distribución y epifitología del CTV a nivel de huertas comerciales en varios estados de la República, particularmente en Puebla, Veracruz (Loredo y Peña del Río, 2002), Tamaulipas y Yucatán (Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009).

No obstante la versatilidad de la técnica de inmunopresión para la detección del CTV y su uso generalizado en México (Loredo y Peña del Río, 2002; Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009; SAGARPA, 2006), para su aplicación se requiere de la adquisición de los kits comerciales, ya sea de España (Plant Print) o Estados Unidos (Agdia), lo cual implica los altos costos inherentes de importación, así como la dependencia de la campaña del CTV a nivel nacional de kits procedentes del extranjero. En adición a lo anterior, la disponibilidad de los kits comerciales para la detección del CTV en México no siempre es inmediata (Iracheta *et al.*, 2005).

La aportación del presente trabajo radica primordialmente en demostrar que los anticuerpos anti-CTV desarrollados en nuestro laboratorio a través del sistema de proteína recombinante (Iracheta *et al.*, 2008), ofrecen una opción viable de inmunopresión para la discriminación de plantas sanas e infectadas por el CTV y con resultados comparables con los obtenidos con los kits comerciales de inmunopresión disponibles en México. No obstante el número reducido de muestras a que se tuvo acceso con infección natural al CTV en el campo, los anticuerpos anti-CTV ya sea sin marca o conjugado con biotina vía hidrazida, mostraron en forma consistente una eficiencia del 100% en la discriminación entre plantas sanas y plantas infectadas por el CTV, mostrando así niveles de sensibilidad y especificidad del 100%, respectivamente. La efectividad de los anticuerpos anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 para el análisis masivo de muestras de cítricos ya ha sido documentada con anterioridad empleando la técnica DASI-ELISA (Iracheta *et al.*, 2009).

nor extraction of the sample (Garnsey *et al.*, 1993) Overall, once the samples have been printed on the nitrocellulose membranes, the entire test can be brought to an end in just a couple of hours (Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2000b). The immunoprinting technique has become an indispensable tool for large scale citrus sample analysis of CTV detection in commercial groves and nurseries in support of clean stock and certification programs in several countries, such as Argentina (Stein *et al.*, 2009), Chile (Besoain *et al.*, 2003), Colombia (Caicedo and Muñoz, 2006), Cuba (Batista *et al.*, 2005) and Spain (Cambra, *et al.*, 2000a, 2000b), among others (Anfoka *et al.*, 2005; Djelouah and D'Onghia, 2009; Korkmaz, 2002). It has been used nationwide for CTV detection in the Mexican Republic in every single citrus state of the country (SAGARPA, 2006). Moreover, it has been used in several studies on CTV distribution and epifitology in commercial groves in several states nationwide, particularly in Puebla, Veracruz (Loredo and Peña del Río, 2002), Tamaulipas and Yucatan (Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009).

Despite of the versatility of the immunoprinting technique CTV detection and its extensive use in Mexico (Loredo and Peña del Río, 2002; Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009; SAGARPA, 2006), its use requires the obligated purchase of the immunoprinting kits, either from Spain (Plant Print) or US (Agdia), which implies high inherent costs of commercial kits from abroad. Furthermore, the commercial kit availability for CTV detection in Mexico is not always immediate (Iracheta *et al.*, 2005).

The contribution of this work relies mostly in showing that anti-CTV antibodies developed in our laboratory by recombinant protein system (Iracheta *et al.*, 2008), offers a viable option of immunoprinting for discrimination of healthy and CTV infected plants, and comparable results with those obtained with immunoprinting commercial kits available in Mexico. Despite the small number of CTV infected plant samples availability, a consistent 100% efficiency in discriminating between healthy and CTV infected plants was obtained; the anti-CTV antibodies, either unmarked or conjugated via biotin-hydrazide, showed sensitivity and specificity levels of 100%, respectively. The efficiency of the anti-CTV antibodies developed against p25 recombinant protein for the large scale analysis of citrus samples has already been previously documented using the DASI-ELISA technique (Iracheta *et al.*, 2009).

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the study hereby, the following conclusions were reached:

The anti-CTV antibodies developed against capsid p25 recombinant protein were efficient for discrimination of healthy samples from CTV infected samples using immunoprinting tests.

The anti-CTV antibodies labeled with biotin via hydrazide were efficient for discrimination of healthy samples from CTV infected, and it was comparable to the unlabeled anti-CTV antibodies in immunoprinting tests.

The CTV antibodies developed against capsid p25

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se llegó a las siguientes conclusiones:

Los anticuerpos anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV fueron eficientes para la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV en ensayos de inmunopresión.

Los anticuerpos anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida fueron eficientes para la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV, comparables con los anticuerpos anti-CTV sin marcar en ensayos de inmunopresión.

Los anticuerpos anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV sin marcar y marcados con biotina vía hidrazida fueron igualmente eficientes en la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV en ensayos de inmunopresión y comparables con los kits comerciales de Agdia y Plant Print.

El marcaje de anticuerpos anti-CTV con estreptavidina, no fue una alternativa eficiente para la detección de CTV en ensayos de inmunopresión.

Agradecimientos. La presente investigación tuvo financiamiento del CONACYT-México, Clave 067702 y PAICYT-UANL CN-158-07. Los autores agradecen al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Nuevo León, con sede en Montemorelos, N.L., por permitir el acceso y toma de muestras en plantas infectadas por el CTV en proceso de erradicación en huertas de General Terán.

LITERATURA CITADA

- AGDIA. 2008. CTV Immunoprint. <https://orders.agdia.com/Documents/m255.pdf>. (consulta, septiembre 2011).
- Anfoka GH, Abhary MK, Fattash I and Nakhla MK. 2005. Occurrence and distribution of *Citrus tristeza virus* (CTV) in the Jordan Valley. *Phytopathologia Mediterranea* 44:17-23.
- Batista L, Peña I, López D, Casín JC, Velásquez K, Torres MC and León Y. 2005. Management program for citrus tristeza in Cuba. Pp. 404-406. *In: Hilf ME, Durán N and Rocha MA. (eds.). Proc. 16th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 517p.*
- Besoain X, Simpson MC, Ramella F, Canales C, Valenzuela M, Castro M y Cambra M. 2003. Incidencia del virus de la tristeza de los cítricos en Chile. XIII Congreso de Fitopatología Octubre 28-30 de Octubre. Maitencillo, Chile.
- Caicedo A y Muñoz OJ. 2006. Fortalecimiento del Centro de Investigación Palmira como un centro de referencia nacional para la producción de plántulas certificadas y el mejoramiento de la productividad de cítricos en 26. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Centro de Investigación Palmira, Colombia.
- Cambra M, Gorris MT, Marroquín C, Román MP, Olmos A, Martínez MC, Hermoso de Mendoza A, López, A and Navarro L. 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian community. *Virus recombinant protein of CTV unlabeled and labeled with biotin hydrazide were equally efficient to discriminate healthy samples from CTV infected, in immunoprinting tests, and comparable with Agdia and Plant Print commercial kits.*
- The anti-CTV labeling with streptavidin was not an efficient alternative for CTV detection in immunoprinting tests.
- Acknowledgements:** The study hereby was financed by CONACYT-Mexico, key 067702 and PAICYT-UANL CN-158-07. The authors shall thank The State Committee on Plant Health of Nuevo Leon, based in Montemorelos, NL, for allowing access to perform the sampling of CTV infected plants under eradication in orchards at General Terán.
- Research 71:85-95.
- Cambra M, Gorris MT, Román MP, Terrada E, Garnsey SM, Camarasa E, Olmos A, and Colomer M. 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. Pp. 34-41. *In: da Graça JV, Lee RF and Yokomi RK. (eds.). Proc. 14th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 435p.*
- Clark MF, Lister RM and Bar-Joseph M. 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118:742-767.
- Djelouah K, and D'Onghia AM. 2009. Historical review on *Citrus tristeza virus* (CTV) in Palestine. *Mediterranean Citrus Industry* 65:121-123.
- Garnsey SM, Permar TA, Cambra M and Henderson CT. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). Pp. 39-50. *In: Moreno P, da Graça JV and Timmer LW. (eds.). Proc. 12th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 471p.*
- Iracheta CMM, Peña del Río MA y Rocha PMA. 2005. Comparación de antisueros comerciales para la detección del virus tristeza de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:323-328.
- Iracheta CMM, Metheney P, Polek ML, Manjunath KL, Lee RF and Rocha PMA. 2009. Serological detection of *Citrus tristeza virus* with antibodies developed to the recombinant coat protein. *Plant Disease* 93:11-16.
- Iracheta CMM, Sandoval ABD, Román CME, Manjunath KL, Lee RF and Rocha PMA. 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.
- Korkmaz S. 2002. Application of direct tissue blot immunoassay in comparison with DAS-ELISA for detection of Turkish isolates of *Citrus Tristeza Closterovirus* (CTV). *Turkish Journal of Agriculture* 6:203-209.
- Lin Y, Rundell PA, Xie L and Powell CA. 2006. Prereaction of *Citrus tristeza virus* (CTV) specific antibodies increases speed of direct tissue blot immunoassay for CTV. *Plant Disease* 90:675-679.

- Loredo SRX, y Peña del Río MA. 2002. Validación de la técnica de inmunopresión para la detección del VTC. Pp. 189-190. En: XV Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria. INIFAP. Villahermosa, Tabasco, México.
- Rivas VP, Loeza KE, Mora AG, Ruíz GN, Ochoa MDL, Gutiérrez EA y Febres V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:493-507.
- Rocha PMA, Lee RF, Lastra R, Niblett CL, Ochoa CFM, Garnsey SM and Yokomi, RK. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79:437-445.
- Rocha PMA, Ochoa CFM, Martínez SJP, Roistacher CN and Lee RF. 1998. Citrus tristeza virus: Events that occur before, during and after the disease epidemics. *Subtropical Plant Science* 50:26-36.
- Ruíz GN, Mora AG, Rivas VP, Góngora CC, Loeza KE, Ochoa MDL, Ramírez VG, Gutiérrez EMA y Alvarez R R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:41-47.
- Ruíz GN, Mora AG, Rivas VP, Ochoa MDL, Góngora CC, Loeza KE, Gutiérrez EMA and Ramírez VG. 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. Pp. 196-204. *In*: Hilf ME, Durán VN and Rocha PMA. (eds.). Proc. 16th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 517p.
- SAGAR. 1997. Plan de acción contra el virus tristeza de los cítricos y el pulgón café, *Toxoptera citricida*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Comisión Nacional Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México.
- SAGARPA. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 15p.
- SAGARPA. 2006. Avances del Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 24 p.
- Scopes RK. 1985. Protein purification, principles and practice. pp. 16-19. 3rd Printing. Springer-Verlag.
- Stein BE, Figueroa JI, Foguet L, Figueroa CAI, Escobar P LC. 2009. The citrus sanitation center of Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, Tucumán, Argentina. *Revista Industrial Agrícola de Tucumán* 86:43-45.
- Terrada E, Kerschbaumer RJ, Giunta G, Galeffi P, Himmler G and Cambra M. 2000. Fully "recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 90:1337-1344.