

Localización *In Situ* de Inclusiones del Virus Tristeza de los Cítricos con Anticuerpos Desarrollados Contra la Proteína Recombinante no Estructural p20

In Situ Localization of *Citrus tristeza virus* Inclusion Bodies with Antibodies Developed to the Recombinant p20 Non-Structural Protein

María Magdalena Iracheta Cárdenas, Sanjuanita Lyzzeth Salazar Martínez, Instituto de Biotecnología, Ave. Universidad s/n. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP 66450, México; María Luisa Cárdenas Ávila, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Botánica Apartado Postal 128-F. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP 66450 México y Mario A. Rocha Peña, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Laboratorio de Virología Vegetal. Apartado Postal 128-F. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP 66450 México. Correspondencia: mario.rochape@uanl.edu.mx.

(Recibido: Junio 29, 2012 Aceptado: Agosto 23, 2012)

Iracheta Cárdenas, M. M., Salazar Martínez, S. J., Cárdenas Ávila, M. L. y Rocha Peña, M. A. 2012. Localización *In Situ* de Inclusiones del Virus Tristeza de los Cítricos con Anticuerpos Desarrollados Contra la Proteína Recombinante no Estructural p20. Revista Mexicana de Fitopatología 30:161-166.

Resumen. Se describe el desarrollo de un inmunoensayo para la localización *in situ* de inclusiones virales inducidas por el virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV) mediante microscopía de luz con anticuerpos preparados contra la proteína recombinante p20 no estructural del CTV. Se emplearon cortes manuales de aproximadamente 100 µm de grosor a partir de corteza de varetas de plantas de cítricos sanas e infectadas por el CTV. Los cortes se fijaron en 70 % de etanol y se incubaron subsecuentemente con anticuerpos anti-p20 desarrollados ya sea en rata o conejo en diluciones de 1:5,000 y 1:10,000 y 1:1,000 y 1:3,000 respectivamente, y con conjugados comerciales IgG anti-especie en diluciones de 1:30,000 para cada uno de ellos, agregando al final la solución cromogénica compuesta por NBT/BCIP. Las inclusiones virales se visualizaron en un microscopio de luz a 10 y 40 aumentos en forma de áreas irregulares con coloración azul oscura en el área del floema y fibras del floema en cortes efectuados con plantas infectadas por el CTV; los tejidos provenientes de plantas sanas no presentaron ningún tipo de coloración, lo que permitió discriminar plantas sanas e infectadas por el CTV.

Palabras clave adicionales: DIBA, serología, proteína recombinante, microscopía de luz.

Abstract: An *in situ* immunoassay is described for localization of *Citrus tristeza virus* (CTV) inclusion bodies by light microscopy with antibodies developed to the recombinant p20 non-structural protein. Free hand bark sections of *ca.* 100 µm thick from healthy or CTV infected plants were fixed with 70 % ethanol and subsequently incubated with specific polyclonal antiserum anti-p20 either from rat or rabbit at dilutions 1:5,000 y 1:10,000 y 1:1,000 and 1:3,000 respectively and IgG anti species at 1:30,000 dilution; at the end, the chromogenic solution NBT/BCIP was added. Viral inclusion bodies were visualized by light microscopy at 10 and 40X magnifications as dark blue irregular areas in phloem associated tissues in CTV infected plants; no dark blue color was observed in the phloem tissues of healthy plants.

Additional keywords: DIBA, serology, recombinant protein, light microscopy.

Citrus tristeza virus (CTV, genus *Closterovirus*, family *Closteroviridae*) consists of long flexuous particles of 2000 x 12 nm and it is phloem restricted in citrus infected plants (Bar-Joseph and Lee, 1989). The virus induces characteristic amorphous inclusion bodies in the cytoplasm of phloem associated cells in diverse citrus hosts infected with different CTV isolates with diverse biological properties (Bar-Joseph and Lee, 1989; Brlansky and Lee, 1990; Miao and Skaria, 2002; Schneider, 1959). Genomic RNA (gRNA) of CTV consists of 12 open reading frames which encodes at least 12 proteinaceous products (Karasev *et al.*, 1995); the presence of CTV inclusion bodies has been associated to the accumulation of a non structural protein of a molecular mass of *ca.* of 20kDa, expressed by the p20 gene

El virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV, género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*) consiste de partículas largas y flexibles de 2000 x 12 nm de tamaño y se restringe al floema de plantas infectadas (Bar-Joseph y Lee, 1989). El virus induce la formación de inclusiones amorfas características en el citoplasma de células asociadas al floema en diversos hospedantes cítricos infectados con diferentes aislamientos del virus con propiedades biológicas diversas (Bar-Joseph y Lee, 1989; Bransky y Lee, 1990; Miao y Skaria, 2002; Schneider, 1959). El RNA genómico del CTV (RNAg) consiste de 12 marcos de lectura abierta los cuales codifican para por lo menos 12 productos de naturaleza proteica (Karasev *et al.*, 1995); la presencia de inclusiones virales del CTV se ha asociado a la acumulación de una proteína no estructural con una masa molecular de aproximadamente 20kDa, producida por el gen *p20* situado en la porción proximal 3' del genoma del virus (Gowda *et al.*, 2000). El presente estudio reporta el uso de anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante p20 no estructural del CTV para la localización *in situ* de inclusiones virales empleando microscopía de luz.

Se emplearon muestras de árboles de toronjo (*Citrus paradisi* Macf.) con antecedentes de infección positiva al CTV procedentes de la huerta Los Castores en el municipio de General Terán, Nuevo León. Como testigos negativos se emplearon árboles sanos de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limón (*Citrus limon* L.) y tangor Murcott (mandarino x naranjo) del Lote de Variedades del Campo Experimental General Terán, del INIFAP. Las muestras estuvieron compuestas por seis a ocho brotes recién expandidos, colectados alrededor de la copa de los árboles, a una altura aproximada de 1.50 m sobre el nivel del suelo. Todas las muestras se analizaron mediante inmunoadherencia a membranas de nitrocelulosa (DIBA = dot-immunobinding assay) (Rocha-Peña *et al.*, 1991) con anticuerpos policlonales desarrollados para la proteína recombinante p25 de la cápside (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) para verificar su estado con respecto a la infección por CTV. Las muestras positivas al CTV fueron las de los árboles de toronja con clave A2, A7, A12, A27, A110 y A111; mientras que las muestras de toronja A1, A6, A10, A11, A15 naranja F3A2, F4A1, F4A2, limón F5A3, F7A1 y el tangor Murcott dieron resultados negativos de infección por el CTV (Cuadro 1).

Para la localización de inclusiones virales se emplearon anticuerpos anti-p20 desarrollados en conejo raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus* L.) (clave 201) y en ratas albinas (*Rattus norvegicus* Berkenhout). Los anticuerpos anti-p20 se prepararon en ambas especies de mamíferos según lo descrito por Iracheta-Cárdenas *et al.* (2008) para la proteína recombinante p25 del CTV y se emplearon en forma de antisuero crudo diluido de 1:1,000 hasta 1:10,000 en solución de TBST-PVP (= TBS 1X, + Tween 0.05 % + PVP 2 %). Los ensayos de inmunoensayo *in situ* se efectuaron en cortes manuales de alrededor 100 µm de grosor de corteza de varetas de cada una de las muestras de cítricos positivas y negativas al CTV. Se emplearon de 3 a 5 varetas de cada una de las muestras de cítricos y se

located at the 3' end of the virus genome (Gowda *et al.*, 2000). The current work reports the use of antibodies developed to the recombinant p20 non structural protein for the *in situ* localization of viral inclusion bodies by light microscopy.

CTV infected grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) samples were from the citrus grove "Los Castores" located at the municipality of General Teran, Nuevo Leon. Healthy sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), lemon (*Citrus limon* L.) and tangor Murcott (mandarin x sweet orange) used as negative controls were from the Citrus Variety Block from the INIFAP General Teran Experiment Station. The samples consisted of six to eight fully expanded shoots taken around the canopy at a 1:50 m height from the ground. All samples were analyzed by dot-immunobinding assay (DIBA) (Rocha-Peña *et al.*, 1991) with polyclonal antibodies developed to the recombinant p25 capsid protein (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) to verify their status with respect of CTV infection. CTV infected samples were those grapefruit trees labeled with field code A2, A7, A12, A27, A110 and A111; whereas, samples of grapefruit A1, A6, A10, A11, A15, sweet orange F3A2, F4A1, F4A2, lemon F5A3, F7A1 and tangor Murcott provided negative results for CTV infections (Table 1).

For CTV inclusion bodies *in situ* localization, anti-p20 antibodies developed in New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) (code 201) and white rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout) were used. Anti-p20 antibodies in both mammalian species were prepared as described by Iracheta-Cárdenas *et al.* (2008) to the recombinant p25 protein of CTV, and used as crude antisera diluted at 1:1,000 to 1:10,000 in TBST-PVP (= TBS 1X, + Tween 0.05 % + PVP 2 %). *In situ* immunoassays were conducted on bark tissue of free-hand cross sections of ca. 100 µm thin of each CTV positive and healthy controls citrus samples. Three to five budsticks of each citrus samples were used and five cross sections of each budstick, to give a total of 25 to 50 cross sections by sample. The cross sections were immersed in 5mL 70 % ethanol for five min with continuous stirring at 25 °C. The ethanol was removed and the samples were individually incubated with 5 mL of the anti-p20 corresponding antibodies {rat (code R2) or rabbit (201)} diluted in TBST-PVP buffer}; the tissue samples were rinsed in 5 mL of TBST-PVP during five to ten min. Afterwards, the tissue samples were incubated with 5 mL of IgG anti-rat IgG -AP (Sigma A8438) or IgG anti-rabbit IgG -AP (Sigma A3812), at 25 °C. The tissue samples were rinsed once with 5 mL of TBST-PVP and twice with TBS - Tween 0.05 %, during five to ten min. At the end, the chromogenic substrate NBT (nitro blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate) (Sigma B3804) was added during two h to visualize the sites of the p20 protein accumulation. The cross sections were observed by using a Leica DME light microscope at 10X and 40X magnifications. As a general procedure, all the tissue samples were incubated with the corresponding anti-p20 antibodies (rat R2 and rabbit 201) for 14-18 h at 5-10 °C, at different antibody concentrations. The incubation with the

realizaron cinco cortes de cada vareta, para tener un total de entre 25 a 50 cortes por muestra. Los cortes se sumergieron en 5 mL de etanol al 70 % por cinco minutos, en agitación a 25 °C. Se retiró el etanol y se incubaron por separado con 5 mL de los anticuerpos anti-p20 respectivos {rata (clave R2) o conejo (201)} diluidos en solución amortiguadora TBST-PVP; se lavaron con 5 mL de solución TBST-PVP de cinco a diez minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron con 5 mL de IgG anti-IgG de rata-AP (Sigma A8438) o IgG anti-IgG de conejo-AP (Sigma A3812), según fuera el caso, a 25 °C. Se lavaron en agitación con 5 mL de solución TBST-PVP y dos veces con TBS -Tween 0.05 %, por cinco a diez minutos. Finalmente, se adicionó como sustrato y cromógeno NBT (azul de nitro tetrazolio) y BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo) (Sigma B3804) por un período de dos horas para visualizar los sitios de acumulación de la proteína p20. Los cortes se observaron en un microscopio de luz Leica DME bajo aumentos de 10X y 40X. Por procedimiento general, las muestras de tejidos se dejaron incubando con los anticuerpos anti-p20 respectivos (rata R2 y conejo 201) por 14-18 h en refrigeración (5-10 °C) a diferentes concentraciones de los mismos. La incubación con los conjugados enzimáticos IgG anti rata y IgG anti conejo fue de 2 h a temperatura de laboratorio.

En términos generales, se encontró consistentemente la presencia de un precipitado azul oscuro en tejidos asociados a floema en los cortes efectuados con todas las muestras positivas al CTV con los anticuerpos anti-p20 tanto de rata R2, como de conejo 201. Los anticuerpos de rata R2 anti-p20, fueron efectivos para la observación de inclusiones virales en diluciones de 1:5,000 y 1:10,000 de antisuero crudo (Figuras 1 A y B). De igual forma, se observó la presencia de precipitado azul oscuro en tejidos asociados a floema con los anticuerpos de conejo (201) anti-p20 en diluciones de 1:1,000 (Figuras 1C y D) y de 1:3,000, con un número reducido de muestras positivas al CTV (datos no mostrados). Las muestras de cítricos sanos empleadas como testigos negativos (Cuadro 1), sometidas a inmunoensayo *in situ* con anticuerpos anti-p20 de rata R2 (Figura 1E) y de conejo 201 (Figura 1F), no presentaron ningún tipo de precipitado de color azul oscuro en ninguno de los tejidos analizados de naranjo dulce, limón, ni tangor Murcott.

enzyme conjugates IgG anti- rat and IgG anti- rabbit was by 2 h at room temperature.

Overall, the presence of a dark blue precipitate was consistently found in phloem associated tissues in all cross sections assayed with all CTV infected samples with either rat R2 or rabbit 201 anti-p20 antibodies. Anti-p20 rat R2 antibodies were effective to the inclusion bodies visualization at 1:5,000 and 1:10,000 dilution of crude antiserum (Figures 1 A y B). Likewise, comparative results of the presence of a dark blue precipitate in phloem associated tissues were obtained with rabbit (201) anti-p20 antibodies at 1:1,000 dilution (Figures 1C y D) and at 1:3,000 dilution with a limited number of CTV infected samples (not shown). The healthy citrus samples used as negative controls (Table 1), subjected to the *in situ* immunoassay with anti-p20 rat R2 (Figure 1E) and rabbit 201 (Figure 1F) antibodies, did not show the dark blue precipitate in all analyzed samples of sweet orange, lemon, or Murcott tangor.

According to the results, the presence of the dark blue precipitate was placed only in the phloem associated tissues of CTV infected plants, showing the reactivity of the anti-p20 antibodies with the p20 non structural protein of CTV. The inclusion bodies observed in this study in the phloem tissue by using the anti-p20 antibodies not only show a similarity with those reported for CTV either with the Azure A stain (Bar-Joseph and Lee, 1989; Brlansky and Lee, 1990; Miao and Skaria, 2002), and with anti-CTV monoclonal antibodies reported by Lin *et al.* (2000), but they have similarity with those inclusion bodies formed by other virus members of the *Closteroviridae* family, such as beet yellows virus (BYV) (Esau *et al.*, 1967), grapevine leaf roll virus (Faoro *et al.*, 1991), lettuce infectious yellow virus (LIYV) (Medina *et al.*, 1998), tomato infectious chlorosis (TICV) (Wisler *et al.*, 1996) and tomato chlorosis (ToCV) (Wisler *et al.*, 1998) viruses.

According to the literature, there are only two published reports where there have been used antibodies for detection of the p20 no structural protein of CTV: the original work by Gowda *et al.* (2000) in which it was determined the function and expression of the p20 protein in citrus CTV infected tissue, and the work by Ecale-Zhou *et al.* (2002) which was a study at ultrastructural level and

Cuadro 1. Muestras de cítricos empleados para la localización *in situ* de inclusiones por el CTV.

Table 1. Citrus samples used for *in situ* localization of CTV inclusion bodies.

Clave	Especie	DIBA ²	Clave	Especie	DIBA ³	Clave	Especie	DIBA ³
A 1	Toronja ¹	-	A 12	Toronja ¹	+	F4A1	Naranja ²	-
A 2	Toronja ¹	+	A 15	Toronja ¹	-	F4A2	Naranja ²	-
A 6	Toronja ¹	-	A 27	Toronja ¹	+	F5A3	Limón ²	-
A 7	Toronja ¹	+	A 110	Toronja ¹	+	F7A1	Limón ²	-
A 10	Toronja ¹	-	A 111	Toronja ¹	+	Murcott	Tangor	-
A 11	Toronja ¹	-	F 3A2	Naranja ²	-			

¹Huerta Los Catores, General Terán, Nuevo León, México.

²Lote de variedades Campo Experimental del INIFAP, General Terán, Nuevo León, México.

³Reacción positiva (+) o negativa (-) en pruebas DIBA.

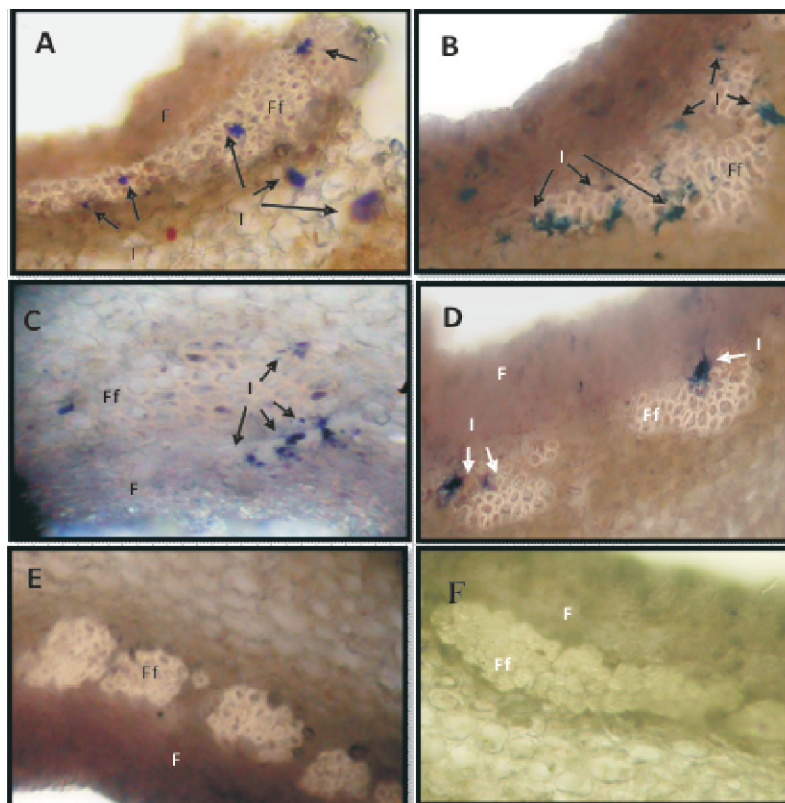


Figura 1. Inmunoensayo *in situ* con anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante p20 del virus de la tristeza (CTV) en cortes transversales de corteza de muestras de cítricos sanos e infectados por el CTV. **A y B**, uso de anticuerpos anti-p20 de rata R2 a diluciones 1:5,000 y 1:10,000 con muestras de toronja A7 y A110 positivas al CTV, respectivamente. **C y D**, uso de anticuerpos anti-p20 de conejo 201 en dilución 1:1,000 con muestras de toronja A7 y A110 positivas al CTV, respectivamente. **E y F**, cortes de cítricos sanos de naranja F3A2 y toronja A11 (CTV negativos), analizadas con anticuerpos anti-p20 de rata R2 (1:5,000) y conejo 201 (1:1,000), respectivamente. F = floema; Ff = fibras del floema; I = inclusiones (señaladas con flechas).

Figure 1. *In situ* immunoblotting with antibodies developed to the recombinant CTV p20 protein in cross sections of bark of healthy and CTV infected citrus samples. **A and B**, rat R2 anti-p20 antibodies at 1:5,000 and 1:10,000 dilutions with A110 CTV positive A7 and A110 grapefruit samples, respectively. **C and D**, rabbit 201 anti-p20 antibodies at 1:1,000 dilution with A110 CTV positive A7 and A110 grapefruit samples, respectively. **E and F**, cross sections of healthy sweet orange F3A2 and grapefruit A11 (CTV negative), analyzed with rat R2 anti-p20 (1:5,000) and rabbit 201 (1:1,000), respectively. F = phloem; Ff = phloem fibers; I = inclusions (pointed by arrows).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la formación del precipitado azul oscuro del cromógeno se ubicó en forma particular en los tejidos asociados al floema en plantas infectadas por el CTV; lo anterior demostró la reactividad de los anticuerpos anti-p20 con la proteína p20 no estructural del CTV. Los cuerpos de inclusión observados en el floema mediante los anticuerpos anti-p20 en el presente estudio, no solo presentan gran similitud con los reportados para este virus tanto con las tinciones con Azure A (Bar-Joseph y Lee, 1989; Brlansky y Lee, 1990; Miao y Skaria, 2002), y con anticuerpos monoclonales anti-CTV reportados por Lin *et al.* (2000), sino que también lo tienen con los cuerpos de inclusión formados por otros miembros de la familia *Closteroviridae*, como es el caso de los virus del amarillamiento de la remolacha (BYV) (Esau *et al.*, 1967), del enrollamiento de la hoja de vid (Faoro *et al.*, 1991),

cytopathology on sweet orange (*C. sinensis*) and mexican lime [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle]; in both studies gold labeled antibodies were used and the detection was carried out by transmission electron microscopy. According to our knowledge, this is the first work where antibodies developed to the recombinant p20 protein are used to discriminate CTV infected from healthy citrus tissue; likewise, the study involved the combination of antibodies labeled with alkaline phosphatase and a chromogenic solution that precipitates on the sites of accumulation of the p20 protein present in the inclusion bodies, which can be relatively easily visualized by light microscopy. The use of gold labeled antibodies reported by Gowda *et al.* (2000) and Ecale-Zhou *et al.* (2002) has as a main inconvenience the need of transmission electron microscopy.

amarillamiento infeccioso de la lechuga (LIYV) (Medina *et al.*, 1998), clorosis infecciosa (TICV) (Wisler *et al.*, 1996) y clorosis del tomate (ToCV) (Wisler *et al.*, 1998).

De acuerdo a la literatura, solo existen dos trabajos en donde se han empleado anticuerpos para la detección de la proteína p20 no estructural del CTV: el trabajo original de Gowda *et al.* (2000) en donde se determinó la función y expresión de la proteína p20 en tejido infectado de cítricos y el trabajo de Ecalle-Zhou *et al.* (2002) que consistió en un estudio a nivel de ultra estructura y citopatología en naranjo (*C. sinensis*) y limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle); en ambos estudios se emplearon anticuerpos conjugados con oro y la detección se llevó a cabo mediante microscopía electrónica. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en que se emplean anticuerpos desarrollados contra la proteína p20 recombinante del CTV para la discriminación de plantas sanas e infectadas por el CTV; asimismo, el estudio comprendió el modelo con una combinación de anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina y una solución cromogénica que precipita en los sitios de acumulación de la proteína p20 presente en las inclusiones virales, las cuales se pueden visualizar con facilidad a nivel de microscopía de luz. El empleo de anticuerpos marcados con oro reportado en los trabajos de Gowda *et al.* (2000) y Ecalle-Zhou *et al.* (2002) tiene como inconveniente la necesidad de recurrir a la microscopía electrónica.

La opción de emplear anticuerpos dirigidos contra la proteína p20 no estructural del CTV con fines de detección, se puede sustentar en los reportes que existen sobre la abundancia en que se producen los RNAs subgenómicos relacionados con el gen p20 y a la relativamente alta concentración de la proteína p20 en el hospedero (Gowda *et al.*, 2000), lo cual podría asegurar la presencia de las inclusiones virales para su detección. Los reportes de la presencia consistente de inclusiones virales en plantas infectadas por el CTV (Brlansky y Lee, 1990) apoyan esta aseveración. No obstante lo anterior, el uso del inmunoensayo *in situ* con anticuerpos anti-p20 no sustituye otros métodos para la detección serológica del CTV como son la técnica ELISA (Bar-Joseph *et al.*, 1979) o la inmunopresión (Garnsey *et al.*, 1993).

CONCLUSIONES

Partiendo de los resultados obtenidos en el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

Los anticuerpos anti-p20 de rata R2 y de conejo 201 reconocieron a la proteína no estructural p20 en su forma nativa mediante inmunoensayo *in situ* en cortes de corteza de plantas de cítricos infectados por el CTV. Con los anticuerpos anti-p20 de rata R2 y de conejo 201 se discriminó tejido infectado por el CTV, de tejido de plantas sanas.

Agradecimientos. La presente investigación tuvo financiamiento del CONACYT-México, Proyecto 83427 CB 2007-1. 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

The alternative of using antibodies developed to the p20 non structural protein for CTV detection, relies on the reports on the abundance by which p20 gene related subgenomic RNAs are produced, as well as the relatively high concentration of the p20 protein in the citrus host (Gowda *et al.*, 2000), which could assure the presence of the inclusion bodies for their detection. The reports of the consistent presence of inclusion bodies in CTV infected plants (Brlansky y Lee, 1990) support this conclusion. Nevertheless, the use of the *in situ* immunossay with anti-p20 antibodies do not substitutes other serological CTV detection methods such as either ELISA (Bar-Joseph *et al.*, 1979) or direct tissue blot immunoassay (Garnsey *et al.*, 1993).

CONCLUSIONS

In the light of the results obtained in this work, the following conclusions were established:

Both the rat R2 and rabbit 201 anti-p20 antibodies detected the non structural p20 protein in its native form by *in situ* immunoassay in thin cross sections of bark from CTV infected plants. Both rat R2 and rabbit 201 anti-p20 antibodies discriminated CTV infected tissue from tissue from healthy plants.

Acknowledgments. The current research work had financial support of CONACYT-Mexico, grant 83427 CB 2007-1. The authors thank the Nuevo Leon State Plant Protection Board at Montemorelos, Nuevo Leon, to allow the access to CTV infected trees in the process of being eradicated from groves in General Teran, Nuevo Leon, Mexico.

LITERATURA CITADA

- Bar-Joseph M, and Lee RF. 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, Garnsey SM, Gonsalves D, Moscovitez M, Purcifull DE, Clark MF, and Loebenstein D. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194.
- Brlansky RH, and Lee RF. 1990. Numbers of inclusion bodies produced by mild and severe strains of citrus tristeza virus in seven citrus hosts. *Plant Disease* 74: 297-299.
- Ecalle-Zhou CL, Ammar ED, Sheta H, Kelley S, Polek M, and Ullman DE. 2002. *Citrus tristeza virus* ultrastructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia*. *Canadian Journal of Botany* 80: 512-525.
- Esau K, Cronshaw J, and Hoefert LL. 1967. Relation of beet yellows virus to the phloem and to movement in the sieve tube. *The Journal of Cell Biology* 32:71-87.
- Faoro F, Tornaghi R, and Belli G. 1991. Localization of closteroviruses on grapevine thin sections and their identification by immunolabeling. *Journal of Phytopathology* 133:297-306.

muestras en plantas infectadas por el CTV en proceso de erradicación en huertas de General Terán, Nuevo León, México.

-
- 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: Proc.12th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Gowda S, Satyanarayana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, and Dawson WO. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274:246-254.
- Iracheta-Cárdenas M, Sandoval-Alejos BD, Román-Calderón ME, Manjunath KL, Lee RF, and Rocha-Peña MA. 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.
- Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, Garnsey SM, Lewandowski DJ, and Dawson WO. 1995. Complete sequence of citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208:511-520.
- Lin Y, Rundell PA, Xie L, and Powell CA. 2000. *In situ* immunoassay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Plant Disease* 84:937-940.
- Medina V, Tian T, Wierzchos J, and Falk BW. 1998. Specific inclusion bodies are associated with replication of lettuce infectious yellows virus RNAs in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. *Journal of General Virology* 79:2325-2329.
- Miao H, and Skaria M. 2002. Quantitative and qualitative differences of inclusion bodies induced by *Citrus tristeza virus*. *Subtropical Plant Science* 54: 1-5.
- Rocha-Peña MA, Lee RF, and Niblett CL. 1991. Development of a dot-immunobinding assay for detection of citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods* 34:297-309.
- Schneider H. 1959. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: *Citrus Virus Diseases* (Wallace, J.M., ed.), pp. 73-84. Berkeley, CA: University of California Division of Agricultural Sciences.
- Wisler GC, Liu HY, Klaassen VA, Duffus JE, and Falk BW. 1996. Tomato infectious chlorosis virus has a bipartite genome and induces phloem-limited inclusions characteristic of Closteroviruses. *Phytopathology* 86:622-626.
- Wisler GC, Li RH, Liu HY, Lowry DS, and Duffus JE. 1998. Tomato chlorosis virus: A new whitefly-transmitted, phloem limited, bipartite Closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88:402-409.