



DETECCIÓN DE VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS POR MEDIO DE DAS-ELISA, INMUNOIMPRESIÓN Y RT-PCR

Ana Lilia Bolaños-Miquel; Antonio Novelo Cocom¹; Abril Chumba Sarmiento; Juan Jasso Argumedo¹ y Juan Manuel Zadívar-Cruz².

¹Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Yucatán

²Colegio de Posgraduados-Campus Tabasco

Calle 19 # 207 x 26 y 28, Cd. Industrial, Mérida, Yucatán. C.P. 97118

Tel y Fax: 946-00-10, e-mail: zaldivar@colpos.mx

Palabras clave: virus, técnicas, cítricos

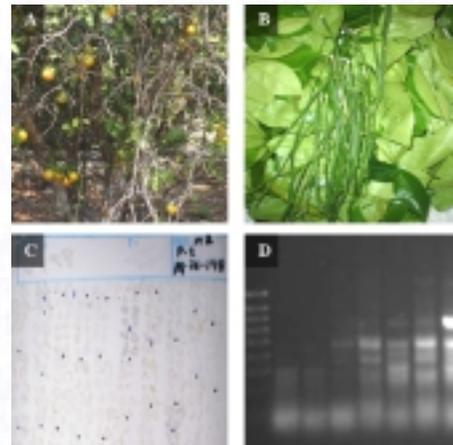
Introducción. La citricultura es una actividad de importancia social y económica en el Estado de Yucatán, con una superficie estimada de 25,500 ha. Entre las especies más importantes cultivadas en Yucatán se encuentran las naranjas, limas, limones y toronjas, dedicándose a esta actividad aproximadamente 12,000 productores. De la superficie cultivada el 80 % se encuentran injertados sobre naranjo agrio el cual es altamente susceptible a la tristeza de los cítricos, enfermedad provocada por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC). El VTC pertenece a la familia Closteroviridae, es el virus más largo que se conoce dentro de la naturaleza. Su presencia en las plantas está limitada a los tejidos del floema. La detección del virus se puede realizar mediante diferentes métodos (1). Entre estos métodos se encuentra la inmunopresión, DAS-ELISA y RT-PCR (Transcripción Reversa acoplada a la Técnica de la Reacción de la Polimerasa). Hasta ahora en Yucatán no se tienen reportes sobre la detección del VTC por medio de estas tres técnicas, por lo que el objetivo de este proyecto fue determinar la mejor técnica para el VTC en huertos del sur del Estado de Yucatán.

Metodología. Para la detección del VTC se emplearon pecíolos de hojas de cítricos de huertos del sur del Edo. de Yucatán (Fig. 1 Panel A), los cuales fueron impresos en membranas de nitrocelulosa por medio de la técnica de inmunopresión (PlantPrint, Diagnostics, S.L); mientras que para la técnica de DAS-ELISA (AGDIA) se utilizaron varetas descortezadas, secadas y picadas (Fig. 1 Panel B). Para la caracterización de los aislamientos del VTC por medio de RT-PCR se colectaron muestras de hojas jóvenes y/o varetas de los árboles que dieron positivo a inmunopresión, de los cuales se extrajo el RNA. Los oligonucleótidos utilizados para la detección del virus fueron: 5'-GGC-GGA-ATT-CGA-CGA-AAC-AAA-GAA-A-3' y 5'-GAA-GAT CTT-CAA-CGT-GTG-TTG-AAT-TTC-C-3', que amplifican un fragmento de 689 pares de bases. Las condiciones empleadas para la amplificación fueron: desnaturalización inicial 94°C/2 min, desnaturalización 94°C/30 seg, alineamiento 55°C/30 seg, amplificación 72°C/30 seg y amplificación final 72°C/10 min.

Resultados y Discusión. Con la Técnica de Inmunopresión (Fig. 1 Panel C) se detectaron 115 árboles positivos distribuidos en Akil (2), Samahil (2),

Muna (1), Yotholin (108), Sacalum (1) y Oxcutzcab (1) y 49 con la técnica de DAS-ELISA (datos no mostrados) distribuidos como sigue: 2 en Oxcutzcab y 47 en Yotholin. Estos mismos árboles fueron analizados con la técnica de RT-PCR, resultando 95 de ellos positivos, los cuales presentaron una banda de aproximadamente 689 pb (Fig. 1 Panel D)

Fig. 1. Panel A: Árbol positivo al VTC localizado en Cabaché, Yotholin. Panel B: muestras de varetas y hojas para la detección de VTC por diferentes técnicas. Panel C: Membrana de inmunopresión para la detección de VTC. Panel D: Detección de VTC por medio de la Técnica de RT-PCR.



Conclusiones. Hasta ahora se ha confirmado la presencia del VTC por medio de las tres técnicas y faltaría por caracterizar los aislamientos con secuencias específicas con el fin de comprobar si los aislamientos son diferentes o los mismos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Yucatán. Los autores agradecen el apoyo técnico del Dr. Isidro Almeida León.

Bibliografía.

1. Silva-Vara, S, Peña del Río, M., Peña-Martínez, R, Villegas-Jiménez N, Byerly-Murphy, K. y Rocha-Peña, M. (2001) Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia*. 35:441-450.