

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CITRUS TRISTEZA VIRUS, CTV), EN LA ZONA CENTRAL DE CHILE¹

Detection of citrus tristeza virus (CTV) in the central zone of Chile

Guido Herrera M.², Mónica Madariaga V.² y Mónica Santalices A.³

S U M M A R Y

During the season 1994/95 were observed, in the central zone of Chile, lemon plants grafted on the rootstock *Citrus macrophylla* which showed growth decreasing, chlorosis and stem pitting in the rootstock. Through indirect ELISA and electron microscopy was associated the symptoms to the citrus tristeza virus (CTV).

Key words: virus, citrus tristeza virus, lemon, citrus.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por el virus de la tristeza de los cítricos o citrus tristeza virus (CTV) es la más importante de origen viroso a nivel mundial (Garnsey y Lee, 1988). Esto queda demostrado por la pérdida de 16 millones de árboles en Argentina, 10 millones en Brasil y 4 millones en EE.UU. (Carrero, 1981).

Dentro de los cítricos, la reacción a la enfermedad va desde la tolerancia hasta la alta sensibilidad. Es así como, en Chile, por largo tiempo, estuvo prohibida la injertación de naranjo dulce sobre naranjo agrio, por su extrema sensibilidad a CTV (MINIAGRI, 1968). Sin embargo, Weathers *et al.* (1969), indican que CTV está universalmente distribuido en limoneros cv. Meyer, pero que no se encuentra en huertos comerciales.

En prospecciones de virus atacando cítricos en la zona central de Chile, se encontraron plantas de limoneros injertadas sobre el portainjerto *Citrus macrophylla*, mostrando síntomas semejantes a los causados por el CTV, consistentes en plantas con disminución de crecimiento, clorosis y presencia de concavidades alargadas en la madera del injerto en la zona cercana a la unión patrón injerto.

El objetivo de la presente investigación fue establecer la presencia del CTV asociada a la sintomatología descrita.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la temporada 1994/95, se recolectaron hojas y tejido de la corteza de plantas de limonero con los síntomas descritos, ubicados en 6 huertos, distribuidos en las Regiones Metropolitana, V y IV.

Las hojas y corteza de las plantas fueron puestas en contenedores a baja temperatura (8 a 10 °C) y transportadas al laboratorio para su posterior análisis. Los métodos empleados fueron: serológico de ELISA indirecto y microscopía electrónica.

En la prueba ELISA se incluyeron, separadamente, hojas nuevas y corteza de plantas afectadas, de las cuales, se colectaron cuatro submuestras de hojas, cada una orientada de acuerdo a los cuatro puntos cardinales. Posteriormente, se mezclaron en laboratorio, constituyéndose en el antígeno. Las muestras de corteza se colectaron, considerando trozos de aproximadamente 1 cm sobre la unión patrón-injerto y 5 cm bajo ella, con un grosor de 3 a 5 cm. Tanto hojas como corteza, después de colectadas, se mantuvieron en frío hasta su llegada al laboratorio, donde se mantuvieron a -20 °C hasta su utilización en las diferentes pruebas.

Cada muestra se trituró en bolsa de polietileno mediante un rodillo. El triturado, se diluyó (1:10 p/v) en solución de extracción (0,15 g de Na₂CO₃, 0,29 g de NaHCO₃ en 1 L de agua, pH 9,6), centrifugándose a 2.000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, se colocaron los antígenos en placas de poliestireno, duplicados en dos pocillos,

¹Recepción de originales: 22 de junio de 1995.

Investigación financiada parcialmente, Fondo de Investigación Agrícola (FIA), Proyecto N° 014/92.

²Centro Regional de Investigación La Platina (INIA) Casilla 439, Correo 3. Santiago, Chile.

³Laboratorio Apablaza y Santalices, Rojas Magallanes 126, La Florida, Santiago, Chile.

durante toda la noche a 6 °C. Enseguida, las placas se lavaron tres veces por 10 minutos con solución de lavado (cloruro de sodio 8 g, cloruro de potasio 0,2 g, trizma base 3 g y 0,05% de Tween-20 por litro de agua destilada). Antes de colocar las inmunoglobulinas las placas se bloquearon por 2 horas a 36 °C con solución de bloqueo (PBS-Tween más 3% de albumina de bovino). Las globulinas (comercializadas por SANOFI, Francia) se diluyeron 1:105 en sus respectivas soluciones y se incubaron a 36 °C, por 3 horas. Después del lavado y respectivo bloqueo como en los pasos anteriores, se agregó el segundo anticuerpo por toda la noche a 6 °C. El sustrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma 104) se adicionó a las placas al 0,04% en solución citrato, pH 5 más 0,012% de H₂O₂. Las placas se llevaron al lector ELISA (Bio-TeK, modelo EL 312) y las lecturas de absorbancia (492 nm) realizadas a los 60 minutos. Se consideró como muestras positivas aquellas que presentaban una absorbancia superior a dos veces el valor obtenido con los controles sanos. Como testigos sanos y enfermos se usaron antígenos deshidratados enviados gentilmente por el Dr. I. Mink, Universidad de Florida, Estados Unidos.

Para la observación directa de CTV por "Inmunosorbent electro microscopy" (ISEM), bajo el microscopio electrónico, se procedió de la siguiente manera: grillas de microscopía electrónica con membrana de colodión fueron activadas, colocándolas en una gota de IgG, diluido 1:1.000 en solución ISEM (6,45 g NaPO₄, 5,71 g KH₂PO₄ disueltos en 1 L de agua, pH 6,5), por 2 horas a 36 °C. Posteriormente, las grillas se lavaron colocándolas por 15 minutos en una gota de solución ISEM, tres veces. Enseguida, se agregaron las muestras haciendo flotar las grillas en una gota de extracto de planta. El extracto de planta se preparó triturando 1 g de tejido (corteza) en un mortero, diluido 1:10 en solución ISEM y centrifugando por 5 minutos a 2.000 rpm. Los primeros 25 µl de la superficie se usaron como muestra. El material preparado se incubó por 2 horas a 36 °C. Las grillas se lavaron haciendo escurrir sobre ellas, 20 gotas de solución ISEM. La tinción se realizó con KPT (fosfotungstato de sodio al 2% en agua destilada, y regulado el pH a 6,5 con KOH) escurriendo 10 gotas sobre la grilla.

RESULTADOS

La prueba ELISA fue eficiente en discriminar plantas enfermas de controles sanos, tanto en hojas como en tejido de corteza. Todas las plantas que presentaban en el campo amarillez generalizada y concavidades en el patrón, cerca de la

unión patrón injerto, reaccionaron en forma positiva a sueros contra CTV (Cuadro 1). Excepto, una planta en la zona de Malla-rauco, la cual, aún presentando la sintomatología del patrón no reaccionó a sueros de CTV. En los otros casos, hubo reacciones negativas en las hojas, pero positivas en tejido proveniente de corteza. Los resultados sugieren que, tejidos provenientes de corteza, presentan mayores contenidos de virus que aquellos provenientes de hojas.

CUADRO 1. Valores OD (492 nm) obtenidos mediante prueba ELISA indirecto de muestras de limoneros a sueros de Citrus Tristeza Virus (CTV)

TABLE 1. OD values (492 nm) by indirect ELISA from lemon samples against Citrus Tristeza virus antiserum

Localidad	OD 492 nm	
	Hojas	Corteza
1. La Serena		
Predio 1		
Planta 1	0,067	0,060
Planta 2	0,012	0,561
Planta 3	0,471	- ¹
Planta 4	0,018	-
Predio 2		
Planta 1	0,063	0,046
2. Limache		
Predio 1		
Planta 1	0,231	-
Planta 2	0,301	0,170
Planta 3	0,281	-
Planta 4	0,359	-
Planta 5	-	0,521
3. Curacaví		
Predio 1		
Planta 1	0,012	0,060
Planta 2	0,341	0,522
4. Malla-rauco		
Predio 1		
Planta 1	0,012	0,060
Planta 2	0,022	0,033
5. Melipilla		
Predio 1		
Planta 1	0,231	-
Planta 2	0,301	0,170
6. Paine		
Predio 1		
Planta 1	-	0,256
Testigos		
Sano	0,022	0,021
Enfermo	0,740	0,857

¹Sin información.

Bajo el microscopio electrónico se confirmó la presencia de CTV al observarse partículas tipo closterovirus (aproximadamente 2.000 nanómetros de largo) en muestras de corteza de plantas afectadas (Foto 1). Estas partículas estuvieron ausentes en muestras provenientes de plantas sanas.

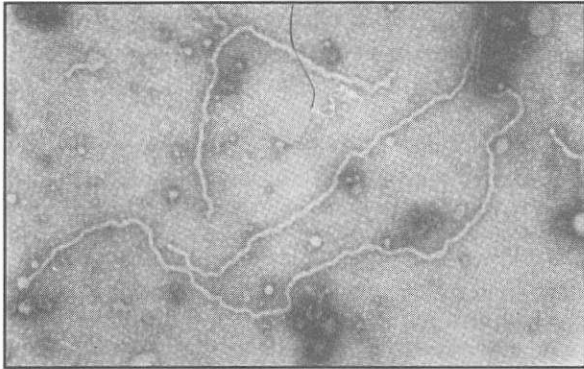


FOTO 1. Partícula de virus en extracto de corteza de *C. macrophylla*, detectado por el microscopio electrónico mediante la técnica inmuno-específica (ISEM).

PLATE 1. Virus particle from bark extract of *C. macrophylla* detected by ISEM under electron microscopy.

DISCUSIÓN

Considerando los resultados de la prueba ELISA y las observaciones bajo el microscopio electrónico es posible establecer una asociación entre los síntomas que presentan las plantas y la pre-

sencia del virus CTV. En Chile, Weathers *et al.* (1969) indican que CTV está presente en limoneros, cv. Meyer, en todo el país, como asimismo los áfidos vectores del virus. En los últimos años, ha existido libertad para la introducción y utilización de patrones en cítricos. De esta forma, entre los patrones introducidos está *C. macrophylla* que, entre sus características, otorga un alto grado de productividad a las plantas de limonero. No obstante, la literatura cita a este patrón como de alta susceptibilidad al virus CTV (Carrero, 1981).

El CTV no se transmite a través de la semilla, por esta razón, la infección en las plantas afectadas no ocurriría por medio del patrón. Por lo tanto, el virus necesariamente se diseminaría por áfidos vectores o por medio de yemas infectadas en las variedades. Estos antecedentes sugieren que, es posible, que el virus esté ampliamente distribuido en el país, y que, por razones de uso de patrones tolerantes, la enfermedad no se ha manifestado en toda su magnitud. Sólo ha sido posible visualizarla cuando se presenta en combinación con patrones de alta susceptibilidad como el mencionado portainjerto.

Los resultados de la presente investigación confirman las estimaciones de Weathers *et al.* (1969) y Sánchez y Weathers (1971), respecto de la presencia de CTV en Chile e indican la necesidad de realizar mayores estudios del virus, tales como: distribución, vectores, comportamiento de patrones, etc.

RESUMEN

Durante la temporada 1994/95, se observaron en la zona central de Chile, plantas de limoneros injertadas sobre patrón *Citrus macrophylla* que mostraban una disminución de crecimiento, clorosis y concavidades en el patrón. Mediante las técnicas de ELISA indirecto y observación bajo el mi-

croscopio electrónico se asoció los síntomas descritos al virus de la tristeza de los cítricos (Citrus tristeza virus, CTV).

Palabras claves: virus, citrus tristeza virus, limonero, citrus.

LITERATURA CITADA

CARRERO, J.M. 1981. Virosis y enfermedades afines a los cítricos. Ed. Publicaciones de Extensión Agraria. Madrid. España. 411 p.

GARNSEY, S.M. y LEE, R.F. 1988. Tristeza. En: Compendium of Citrus Diseases. The American Phytopathological Society. Edit. APS Press. p.: 48-50.

MINAGRI-MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1968. Decreto Ley N° 15. Modificación Reglamento de Viveros 1968.

SÁNCHEZ L., A. y WEATHERS L., G. 1971. Enfermedades de los cítricos. Servicio Agrícola y Ganadero y Universidad de Chile. Facultad de Agronomía. Boletín Técnico N° 45. p.: 9-12.

WEATHERS L., C., SÁNCHEZ L., A. y PLATT R., G. 1969. Naturaleza y distribución de las enfermedades virosas de cítricos en Chile. Agricultura Técnica (Chile) 29: 166-170.