

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS CÍTRICOS

Lochy Batista, Inés Peña, Daylé. López, Juana M. Pérez y Raixa Llauger
Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba
virology@iift.cu

INTRODUCCIÓN

Los patógenos vasculares que infectan los cultivares comerciales de cítricos de forma sistémica, en ocasiones no son detectados por la manifestación de síntomas en las plantas, por lo que se requiere utilizar otros procedimientos para realizar su diagnóstico. Actualmente se dispone de procedimientos serológicos y moleculares para el diagnóstico de virus, viroides, bacterias y fitoplasmas que ocasionan severas enfermedades en cítricos. Sin embargo, existe un importante grupo de enfermedades poco caracterizadas cuyo diagnóstico está limitado al uso de plantas indicadoras.

El diagnóstico de enfermedades de forma precisa y confiable es la base para la aplicación exitosa de programas de producción de material de propagación certificado. Los programas de saneamiento y certificación, así como la protección de las fuentes de material de propagación contra insectos, ayudan a limitar la diseminación de bacterias, fitoplasmas, virus y viroides que infectan las plantas de cítricos. Los programas de certificación garantizan que el material de propagación que se lleve a las plantaciones esté sano, es decir libre de aquellos patógenos incluidos en la certificación. El material libre de patógenos transmisibles por injerto, se mantiene bajo control y es reanalizado periódicamente para detectar la presencia de fitopatógenos, antes de su distribución a los productores.

La selección del procedimiento de diagnóstico en estos programas se realiza teniendo en cuenta la rapidez de obtención de los resultados, exactitud, sensibilidad, costo, disponibilidad de reactivos específicos, así como los requerimientos de instalaciones y personal especializado. Teniendo en cuenta el valor del material de propagación certificado y el riesgo de multiplicar una infección por fitopatógenos, es indispensable utilizar métodos de diagnóstico de avanzada que confieran mayor precisión y confiabilidad a los resultados.

1. Ensayos biológicos

El diagnóstico biológico ha sido el método más utilizado para detectar la presencia de patógenos transmisibles por injerto, entre los que se encuentran bacterias, fitoplasmas, virus y viroides.

Las pruebas biológicas se basan en la utilización de plantas indicadoras de especies cítricas y herbáceas, que manifiestan los síntomas característicos de la enfermedad que se va a diagnosticar. Para desarrollar los ensayos en especies cítricas se toman muestras de fragmentos de corteza, sin incluir yemas, u hojas de la planta que se evaluará, se inoculan en dos o tres plantas y se conservan otras sin inocular como controles negativos. Se deben inocular, como controles positivos, plantas con síntomas débiles, moderados y severos ocasionados por aislamientos conocidos del patógeno que se pretende detectar. El ensayo concluye cuando los controles inoculados con aislamientos débiles manifiestan los síntomas.

Las plantas indicadoras se incuban en condiciones de temperaturas frías de 18-26°C o de calor entre 27-32°C, según los requerimientos para la multiplicación de cada patógeno y la manifestación de los síntomas específicos. Por ejemplo, los virus requieren temperaturas bajas, a diferencia de los viroides que se multiplican mejor a altas temperaturas.

Las especies herbáceas suelen ser muy sensibles, rápidas y específicas en la manifestación de los síntomas. La Tabla 1 muestra las principales plantas indicadoras utilizadas para la identificación y el diagnóstico de enfermedades producidas por bacterias, fitoplasmas, virus y viroides que afectan los cítricos.

Tabla 1. Principales plantas indicadoras utilizadas para la identificación de enfermedades de interés en los cítricos.

Enfermedad	Plantas indicadoras	Temp.	Período requerido
Tristeza	Limero mexicano	18-26°C	2-6 meses
Psorosis	Naranjos dulces Pineapple y Madame vinous, mandarinos y tangor Dweet. <i>Chenopodium quinoa</i>	18-26°C	2-6 meses
Leprosis ^a	Naranja dulce, naranja agrio y mandarinos. <i>Chenopodium album</i> , <i>Ch. amaranticolor</i> , <i>Ch. capitatum</i> , <i>Ch. foliosum</i> , <i>Ch. murale</i> , <i>Ch. polispermun</i> y <i>Ch. quinoa</i>	18-26°C	1-6 meses
Protuberancias nerviales-agallas de la madera	Limero mexicano y limonero rugoso	18-26°C	5-8 semanas
Hoja Rasgada- Enanismo del Citrango	<i>Citrus excelsa</i> , citranger, <i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Nicotiana</i> sp., frijol, chícharo de vaca	18-26°C	1-6 meses
Concavidad gomosa	Tangor Dweet, naranja dulce y mandarina	18-26°C	2-6 meses
Exocortis	Cidro Etrog Arizona 861 S-1, <i>Gynura aurantiaca</i> , <i>Petunia híbrida</i> , <i>Chrysanthemum morifolium</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i> cv. Nova.	27-32°C	3-6 meses
Cachexia	Tangelo Orlando, mandarina Parson's special, Clemelin 11-20.	27-32°C	6-12 meses
Otros viroides de cítricos (CBLVd, CDVd, CVd IV) ^b	Cidro Etrog Arizona 861 S-1	27-32°C	3-6 meses
Stubborn	Naranja Madame Vinous <i>Catharanthus roseus</i> (vicaria)	27-32°C	2-6 meses
Huanglongbing (aislamientos africanos)	Naranja Madame Vinous	18-26°C	2-6 meses
Huanglongbing (aislamientos asiáticos y americanos)	Naranja Madame Vinous	27-32°C	2-6 meses

^aLa transmisión del virus se logra con la inoculación de tejidos procedentes de lesiones necróticas.

^bEstos viroides no son causantes de enfermedad pero en algunas combinaciones pueden producir síntomas de enanismo.

Los ensayos biológicos tienen el inconveniente de ser laboriosos y costosos, debido al requerimiento de instalaciones con temperatura controlada, período prolongado para la manifestación de síntomas y la necesidad de utilizar plantas indicadoras específicas para cada enfermedad. Se ha observado, además, que algunos patógenos pueden interferir en la expresión de los síntomas cuando el material que se va a diagnosticar posee infecciones mixtas.

Teniendo en cuenta estos argumentos, el éxito de los ensayos biológicos depende de que se integren de forma armónica y adecuada tres elementos básicos: la planta indicadora, las condiciones del ensayo y la técnica de inoculación. Cuando estas condiciones no se ajustan a los requerimientos establecidos, se pueden obtener resultados erróneos.

A pesar de sus inconvenientes, los ensayos biológicos se mantienen como la única opción para el diagnóstico rutinario de importantes enfermedades de los cítricos como la cristacortis, impietratura, *gummy bark*, concavidad gomosa, enanismo clorótico, protuberancias nerviales-agallas de la madera, entre otras. Además, constituyen una prueba indispensable dentro de la caracterización de los fitopatógenos.

2. Técnicas serológicas o inmunoquímicas

La reacción antígeno-anticuerpo es la base del inmunodiagnóstico. En la fitopatología, estas técnicas ofrecen considerables posibilidades y ventajas para diagnosticar la causa de una enfermedad, así como identificar y caracterizar los fitopatógenos. Para ello se realiza la detección de antígenos, estructurales o no, presentes en estos patógenos.

Se han desarrollado diversos métodos sobre la base de las características de la reacción inmune y las propiedades físico-químicas de los antígenos y anticuerpos, con la finalidad de detectar la presencia de los patógenos. Actualmente, muchas de las técnicas más específicas, sensibles, sencillas y económicas para analizar un gran número de muestras de forma rápida y rutinaria, se basan en el uso de técnicas serológicas con anticuerpos específicos.

2.1 Técnica inmunoenzimática ELISA

Los métodos serológicos que emplean enzimas como marcadores se conocen como ensayos inmunoenzimáticos. El ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) forma parte de estos procedimientos. Esta técnica consiste en la inmovilización en una fase sólida, del antígeno o el anticuerpo, sobre el cual se adicionan, de forma secuencial y previo lavado para eliminar los elementos deficientemente fijados o no fijados, los demás componentes de la reacción. La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo se revela mediante la adición del sustrato específico de la enzima y la consiguiente formación de productos coloreados, que permiten la evaluación de los resultados de forma visual, cualitativamente, o mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro denominado lector de placas ELISA.

Existen numerosos tipos de ELISA, que pueden agruparse en dos categorías: ensayos directos o indirectos. En los ensayos directos se utilizan como conjugados los anticuerpos específicos, que reconocen al patógeno, marcados con la enzima, mientras que en los indirectos se emplean como conjugados anticuerpos que reaccionan con los anticuerpos de la especie animal en la que se produjeron los específicos del patógeno. Dentro de las numerosas variantes descritas, las denominadas *sandwich* de doble anticuerpo (ELISA-DAS)

y de doble anticuerpo indirecto (ELISA-DASI) son las más utilizadas para el diagnóstico rutinario de fitopatógenos.

Para todas las variantes mencionadas se refieren diferentes procedimientos, que varían fundamentalmente en los tiempos y temperaturas de incubación de cada fase y en los tipos de anticuerpos utilizados. La elección de uno u otro depende de diferentes factores y criterios, pero el más importante debe estar basado en la calidad de los resultados que se obtienen para cada fitopatógeno, con los reactivos y materiales disponibles en cada laboratorio. Además para garantizar la calidad del diagnóstico mediante estas metodologías, es esencial la determinación de indicadores de validación: sensibilidad, especificidad, eficacia, precisión, límite de detección y valores predictivos (de positividad y de negatividad).

En laboratorios donde no existe experiencia sobre el uso de estas técnicas, en ocasiones se presentan problemas vinculados fundamentalmente a errores de manipulación. La etapa de preparación de extractos también puede considerarse problemática en esta técnica, atendiendo fundamentalmente al tipo de material que se va a procesar. Para materiales leñosos, como las muestras de cítricos, el uso de homogenizadores de vástago y la agrupación de muestras son prácticas que han permitido solucionar este problema.

Debido a las ventajas de esta técnica, el ELISA es el método más comúnmente utilizado para la detección de fitopatógenos. Su versatilidad y la automatización de todas sus fases, han facilitado notablemente el incremento del número de análisis que se han realizado con diversos fines en todo el mundo, influyendo positivamente en el desarrollo de los programas de producción y certificación de material de propagación, mejoramiento genético y manejo de las enfermedades. Su amplia utilización como técnica de rutina debido a su sencillez y costo, está limitada en algunos casos por la disponibilidad de anticuerpos comerciales.

Las diferentes variantes de la técnica ELISA y en particular las conocidas como ELISA-DAS y ELISA-DASI, se utilizan desde hace varios años con resultados satisfactorios para la detección del *virus de la tristeza de los cítricos* (CTV). Los juegos de reactivos producidos en España han mostrado su utilidad en este sentido, caracterizados fundamentalmente por su amplio espectro de detección, que abarca gran parte de los aislamientos del virus conocidos en la actualidad. Por otra parte, estas técnicas se han utilizado para la detección de CVC, cancrrosis, stubborn, psorosis y hoja rasgada-enanismo del citrange, teniendo en cuenta la disponibilidad actual de anticuerpos específicos.

2.2 Inmunoimpresión-ELISA

Dentro de las técnicas inmunoenzimáticas sobre soportes sólidos se ha descrito también la Inmunoimpresión ELISA (IIP-ELISA) para la detección de CTV. Esta técnica se basa en los mismos principios que el ELISA: el antígeno se une a una membrana de nitrocelulosa o nylon, con afinidad por las proteínas, al presionar un corte de material vegetal sobre ésta y la detección se realiza directa o indirectamente utilizando anticuerpos. Este procedimiento ofrece la gran ventaja de no tener que realizar extractos, con lo que se amplía el número de muestras que se va a procesar, se eliminan los problemas de contaminación entre muestras y la posibilidad de liberar inhibidores vegetales.

La IIP-ELISA es un método sencillo, que permite la separación temporal de los procesos de toma y análisis de muestras, debido a que las membranas impresas se pueden conservar por largos períodos, con resultados de alta confiabilidad, eficiencia y correlación

con el ELISA. Estas ventajas han conducido a que en la actualidad su uso se haya extendido a muchos modelos virus-hospedante. La IIP-ELISA resulta ideal para el diagnóstico rutinario en viveros y empresas agrícolas, por lo que ha sido empleada como sistema de diagnóstico en varios países.

Las ventajas mencionadas anteriormente han propiciado la gran aceptación del método de inmunopresión para la detección de CTV en los programas de vigilancia y las prospecciones masivas del *virus de la tristeza de los cítricos* en varios países. La IIP-ELISA se ha aplicado, también, para la detección de otros patógenos en cítricos, tales como el *virus de la psorosis de los cítricos*, la bacteria *Xanthomona axonopodis pv. citri* causante del cáncer de los cítricos y el *virus de la variegación infecciosa de los cítricos*. Por otra parte, resulta un procedimiento adecuado en investigaciones epidemiológicas o aquellas dirigidas al estudio de la distribución y localización de patógenos en los tejidos del hospedante.

3. Microscopía óptica y electrónica

La microscopía óptica permite determinar la presencia de agentes virales mediante la observación de cuerpos de inclusión que están confinados fundamentalmente al floema, así como de alteraciones citopáticas específicas. Las inclusiones pueden detectarse, igualmente, utilizando inmunofluorescencia. Por ejemplo, para la detección de CTV, el procedimiento de microscopía óptica de mayor aplicación es la observación de inclusiones virales que aparecen como grandes agregados en forma de bandas, localizados en el tejido del floema.

La microscopía electrónica se emplea con resultados satisfactorios para la detección de fitopatógenos. Sin embargo, esta técnica tiene la desventaja de que es costosa, por lo que su uso en programas de diagnóstico masivo ha sido muy limitado. No obstante, combinada con la serología (inmunomicroscopía electrónica) se aplica con buenos resultados en la detección de virus. Este método de diagnóstico serológico no enzimático, que combina las ventajas de la serología (especificidad) y la microscopía electrónica (poder de resolución), se utiliza, además, para la cuantificación de virus en extractos crudos. Por otra parte, las bacterias y los fitoplasmas pueden distinguirse en secciones ultrafinas por microscopía electrónica.

Estos procedimientos, aunque permiten un diagnóstico eficiente de los fitopatógenos, en general no se usan en programas masivos debido a su limitada capacidad de análisis, alto costo y requerimiento de personal especializado.

Mediante técnicas de microscopía es posible la detección de CTV, *Xylella fastidiosa*, *Spiroplasma citri*, *Phytoplasma auratifolia*, *Ca. Liberibacter sp.*, el *virus de la psorosis de los cítricos* (CPsV) y el *virus de la leprosis de los cítricos* (CiLV), entre otros patógenos. Por otra parte, la inmunoelectromicroscopía ha sido empleada para detectar los viriones de CTV.

4. Técnicas moleculares

El diagnóstico basado en la detección de ácidos nucleicos presenta numerosas ventajas sobre los métodos precedentes. Estas técnicas pueden emplearse para la detección de cualquier tipo de patógeno, abarcan una mayor información relativa a éstos, son versátiles y su especificidad y sensibilidad son superiores. Sin embargo, tienen en contra los requerimientos de infraestructura, el costo del equipamiento, los gastos periódicos

elevados por consumo de reactivos y la necesaria calificación del personal ejecutor, unido a las estrictas exigencias de bioseguridad si se emplea el marcaje radiactivo.

El carácter específico de la complementariedad entre bases de los ácidos nucleicos, la capacidad de dos cadenas complementarias de formar moléculas bicatenarias estables (híbridos o “dúplex”) bajo ciertas condiciones y la reversibilidad de esta reacción, son los principios fundamentales que sustentan las técnicas moleculares. Para el diagnóstico se dispone de técnicas moleculares basadas en este principio, que se emplean en la actualidad: las de hibridación y las de amplificación enzimática *in vitro* de ácidos nucleicos, conocidas comúnmente como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En ambos grupos existen numerosas variantes que se emplean para la detección de fitopatógenos.

4.1 Electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida

Los análisis mediante electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (sPAGE) aplicados a la detección de viroides, confirman la presencia de dos formas moleculares infectivas: la circular de simple cadena covalentemente cerrada y la correspondiente a la estructura lineal, en dependencia de la talla y carga neta en la superficie. Ambas moléculas migran como simples especies de ARN cuando se analizan por PAGE. Sin embargo, el empleo de condiciones desnaturalizantes (dPAGE) permite detectar dos poblaciones distintas que migran como bandas discretas, lo que incrementa la sensibilidad de la técnica. No obstante, el perfeccionamiento de estos métodos de diagnóstico es un reto que ha conducido a la aplicación de técnicas más sensibles, como la hibridación de ácidos nucleicos y la PCR.

Esta técnica se ha utilizado como complementaria a los ensayos biológicos en cidro Etrog para la detección de viroides de cítricos y en la certificación de material de propagación libre de estos patógenos.

4.2 Hibridación de ácidos nucleicos

La hibridación de ácidos nucleicos (NASH) se encuentra entre las técnicas más empleadas en los últimos años para la detección de patógenos, especialmente cuando se procesa un gran número de muestras. La NASH se basa en el principio de la complementariedad de las bases, que permite la unión del ácido nucleico genómico del patógeno, previamente fijado a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa o nylon), con ácidos nucleicos complementarios que reciben el nombre de sondas. La sensibilidad del método depende de la concentración y distribución del patógeno, del método de extracción de la muestra y de la calidad de la sonda utilizada.

Las sondas, que pueden ser ADN complementario (ADNc) clonado, oligonucleótidos sintéticos o ARN complementario (ARNc) obtenido por transcripción *in vitro*, son marcadas radioactivamente con ^{32}P , o no radioactivamente con biotina o digoxigenina. La detección de los híbridos formados se podrá realizar mediante autorradiografía, colorimetría o quimioluminiscencia, en dependencia del marcaje empleado. De éstas, las sondas ADNc marcadas con digoxigenina son las más empleadas en el diagnóstico de fitopatógenos.

Los procedimientos de NASH que más se emplean en la actualidad constituyen ensayos heterogéneos que se realizan sobre membranas de nitrocelulosa o nylon. Se distinguen

por su utilización los siguientes métodos: *Southern-blot* (para ADN), *Northern-blot* (para ARN) y *Dot-Blot* o *Slot-Blot* (para ADN y ARN).

Recientemente se ha desarrollado la variante de hibridación utilizando impresiones que permiten simplificar el procesamiento de las muestras. Las impresiones se obtienen presionando la superficie de un corte transversal de un vástago sobre la membrana. Esta variante tiene, además, la ventaja de que las muestras una vez fijadas en la membrana pueden enviarse a otros laboratorios o conservarse durante un tiempo para su posterior análisis.

Al igual que para las técnicas inmunoquímicas, la aplicación de la hibridación de ácidos nucleicos requiere de ensayos previos de validación que permitan establecer los indicadores de desempeño del procedimiento. Por lo general, estos métodos muestran altos porcentajes de eficacia y son preferidos por muchos laboratorios para análisis masivos de viroides y virus ARN, debido a que han resultado muy útiles en la detección de patógenos presentes en bajas concentraciones, limitados al floema o en la detección de virus en su insecto vector. La NASH se ha utilizado para la detección de CTV y viroides de cítricos.

4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es otra de las técnicas empleadas para la detección de patógenos. Se basa en el principio de la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos y la capacidad de síntesis del ADN por parte de la enzima polimerasa. Para la síntesis *in vitro* del ácido nucleico de interés, éste se amplifica con el empleo de oligonucleótidos cebadores que se unen a ambos lados en la cadena de nucleótidos. Este proceso se realiza mediante ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del ADN, unión de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de los cebadores mediante la enzima ADN polimerasa termoestable.

Esta técnica posee una elevada fidelidad debido a la constante estabilidad de la Taq polimerasa durante la síntesis de diferentes productos. La detección del ADN amplificado puede realizarse mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio o nitrato de plata, por hibridación con sondas específicas marcadas o mediante ensayos colorimétricos.

Para la realización exitosa y repetible de la PCR es necesario tener en cuenta las buenas prácticas de laboratorio y mantener un riguroso control de la calidad de los ensayos. Es de particular importancia garantizar la calidad del agua que se emplee y evitar contaminaciones por problemas de manipulación (pipeteo, producción de aerosoles, uso de puntas o tubos no estériles, entre otros).

Varios factores pueden afectar la eficacia y la especificidad de la PCR. Entre ellos se encuentran las características de los iniciadores; las concentraciones de los componentes de la reacción; la temperatura en cada etapa y fundamentalmente la del alineamiento (*annealing*), así como su duración y el número de ciclos que se realice. El establecimiento de parámetros optimizados de realización como parte de los ensayos de validación, garantiza la calidad y precisión de los resultados de esta técnica.

A nivel internacional el diagnóstico de patógenos no cultivables *in vitro*, fitoplasmas y bacterias no cultivables, se realiza fundamentalmente mediante técnicas moleculares, de

ellas, la que continúa ocupando el lugar primordial es la PCR debido a su reconocida sensibilidad y amplias posibilidades de aplicación.

Por medio de la variante convencional de PCR se han diagnosticado los patógenos de cítricos *Xylella fastidiosa*, *Spiroplasma citri*, *Phytoplasma aurantifolia*, *Ca. Liberibacter* sp, y recientemente un nuevo fitoplasma con sintomatología semejante a la de HLB.

4.3.1 PCR con transcripción inversa (RT-PCR)

La mayoría de los virus de las plantas y todos los viroides tienen un genoma ARN, lo que imposibilita utilizar la metodología original de la PCR para su detección. Debido a esto la PCR se realiza precedida por la transcripción inversa (RT), en la cual el ARN es convertido a ADNc, por medio de la enzima reverso transcriptasa, en presencia de cebadores. Luego de sintetizado el ADNc, se procede a su amplificación mediante el procedimiento clásico de PCR.

La RT-PCR es más laboriosa y tiene un costo más elevado que otras técnicas de diagnóstico, por lo que su uso para los análisis de rutina se ha visto limitado. Se ha aplicado en cítricos para la detección de los siguientes patógenos: CTV, CPsV, CiLV, *citrus tatter leaf virus* (CTLV) o *virus de la hoja rasgada-enanismo del citrange* y *citrus leaf blotch virus* (CLBV) o *virus del moteado de la hoja de los cítricos*.

4.3.2 PCR con inmunocaptura

Esta es una variante atractiva que combina la PCR y la RT-PCR mediante el uso de la captura como en la técnica ELISA, lo que facilita la utilización de extractos crudos y de cierta forma logra la “purificación” parcial del patógeno en cuestión. Esta variante se ha usado fundamentalmente para el diagnóstico de virus, entre ellos, el CTV.

La técnica consiste en la captura o inmovilización de las partículas virales presentes en el extracto vegetal crudo sobre un soporte sólido (microtubos) que ha sido previamente recubierto o tapizado con anticuerpos específicos. Posteriormente, se añade la mezcla de la RT-PCR.

La alta sensibilidad de esta técnica, muy superior a la del ELISA, le confiere un gran potencial para la certificación de semillas, la detección de virus de plantas leñosas o aquellos limitados al floema que se encuentran en bajas concentraciones en las plantas.

En el caso de la detección de partículas virales presentes en los insectos vectores, se ha desarrollado una metodología denominada “escachado-captura-PCR”, que consiste en la impresión del vector en papel de filtro y luego se realiza la captura y PCR de igual forma que para el virus en la planta.

4.3.3 Nested-PCR

La PCR anidada o *nested-PCR* es otra variante que consiste en someter la misma muestra de ADN a dos reacciones consecutivas de PCR, la primera con iniciadores que amplifican una región más amplia, y la segunda con iniciadores específicos internos de la región primeramente amplificada. La PCR anidada resulta mucho más sensible que una reacción simple de PCR y su empleo se extiende a diferentes tipos de patógenos.

Es posible realizar la llamada *heminested-PCR* que se basa en el mismo principio de la anidada, sólo que en la segunda amplificación se emplea un cebador interno y uno de los cebadores externos empleados en la primera amplificación. Estas variantes resultan altamente sensibles en el diagnóstico de virus, viroides, fitoplasmas y bacterias fitopatógenas, que generalmente se encuentran en baja concentración en sus hospedantes. Se ha aplicado en el diagnóstico de CVC, HLB y fitoplasmas en cítricos.

4.3.4 PCR múltiple

La PCR múltiple fue originalmente usada para co-amplificar productos génicos en una única PCR. La técnica se ha empleado con frecuencia para la amplificación simultánea de más de una secuencia diana en una sola reacción, utilizando más de una pareja de iniciadores. Esta co-amplificación de dos o más dianas en una sola reacción es dependiente de la compatibilidad de los iniciadores usados en la PCR, fundamentalmente en lo que respecta a las temperaturas de alineamiento o *annealing* y en general, a las condiciones en que se realiza cada una de las etapas de la técnica. Este procedimiento está siendo utilizado en la actualidad para la detección de las diferentes especies de *Candidatus Liberibacter* causantes de HLB.

4.3.5 PCR en tiempo real

Existe una variante muy novedosa de estas técnicas, la PCR en tiempo real, que permite de manera automatizada no solo la detección sino la cuantificación exitosa de los fitopatógenos, eliminando las posibilidades de contaminación y aumentando ostensiblemente la sensibilidad y eficiencia de estos métodos. Otra de sus ventajas es que permite el análisis de un mayor número de muestras en menor tiempo. Esta técnica se ha aplicado exitosamente en la detección cuantitativa de numerosos patógenos, entre ellos CTV y las bacterias causantes de HLB. Sin embargo, solo se justifica en casos excepcionales, debido a que por el momento su costo es muy elevado para su empleo en el diagnóstico masivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K.; Litchman A.H and Pober J.S. 1991 Celular and Molecular Immunology, Ed. Wonsiewicz, 417 pp.
- de Blas, C.; Zabalgoeazcoa, I.; Castro, S. y Romero, J. 1996. Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales. En: Patología Vegetal. Yacer, G.; López, M.; Trapero, A. y Bello, A. (Eds). Phytoma. pp: 255-274.
- Bertolini E; Moreno A; Vidal E; Martínez M.C.; Capote N; Olmos A; Gorris M.T. and Cambra M. 2007. Quantitative detection of citrus tristeza virus by direct tissue-print and squash Real-Time RT-PCR procedures. Program and Abstracts of 17th Conf. Inter. Org. Citrus. Virol. Adana, Turquía. p. 48.
- Bové, J.; Nguyen, M.Ch.; Trug, H.M.; Bourdeaut, J.; Garnier, M. 1996. Huanglongbing (Greening) in Vietnam: Detection of *Liberobacter asiaticum* by DNA hybridisation with probe Ln.2.6 and PCR amplification of 16S ribosomal DNA. In: da Graça, J.V., Moreno, P. and Yokomi, R.K. (Eds). Proc. 13th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 258-266.
- Cambra, M. y Moreno, P. 2000. En: Duran-Vila, N. y Moreno, P. (Eds). Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. 165pp.

- Cambra, M.; Gorris, M.T.; Camarasa, E.; Román, M.P.; Narváez, G.; Terrada M.E. y Martínez, M.C. 1999. Inmunoimpresión-ELISA: Método ideal para detección del virus de la tristeza de los cítricos. Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca. Serie Fullets Divulgació. Valencia (ES). 13: 4-14.
- Cambra, M.; Gorris, M.T.; Olmos, C.A.; Martínez, C.; Román, M.P.; Bertolini, E.; López, A. and Carbonell, E.A. 2002. Validated European diagnostic protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* (CTV) in adult trees. *In: Duran-Vila, N.; Milne, R.G. and da Graça, J.V. (Eds). Proc. 15th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 69-77.*
- Crowther, J.R. 1995, *Methods in Molecular Biology: ELISA: theory and practice.* Ed. J. R. Crowther. Vol 42, 223 pp.
- Djelouah, K.; Daccache G.; Frasher, D.; Milano, R. and D'Onghia. 2004. Setting up and validation of DTBIA for the assessment of Citrus Variegation Virus. *In: Moreno, P.; da Graça, J.V. and Timmer, L. W. (Eds). Proc. 16th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. p. 512.*
- Garnsey, S.M.; Permar, T.A.; Cambra, M. and Henderson C.T. 1993. Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). *In: Moreno P.; J.V. da Graça and W. Timmer (Eds), Proc. 12th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 39-50.*
- Haelteman, R.M.; Canteros, B.I.; Nome, S.F. and Duchase, N.A. 2004. Citrus Canker Diagnosis by tissue printing. Program and abstracts of the Intern. Society of Citriculture. Agadir, Morocco. p. 92.
- Hampton, R.; Bael, E and De Boer, S (Eds). 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A Laboratory Manual. APS Press, 338 pp.
- Ishii, T. and Usugi, T. 1982. Detection of citrus tristeza virus serologically specific electron microscopy. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 48:231-233.
- Jagoueix, S.; Bové, J.; Garnier, M. 1996. Techniques for the specific detection of the two Huanglongbing (Greening) Liberobacter species: DNA/DNA hybridisation and Dna amplification by PCR. *In: da Graça, J.V., Moreno, P. and Yokomi, R.K. (Eds). Proc. 13th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 384-387.*
- Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin F.A.; Camargo, L.E.A. and Rezende, J.A.M. 1998. Doenças dos citros. Manual de Fitopatología, Tercera Edición, Capítulo 25: 261-295.
- Lemattre, Monique; Albouy, Josette; Balesdent, M-Hélène and Spire, D. 1991. Les méthodes sérologiques appliquées an diagnostic de routine des agents phytopathogènes. *Phytoma - La Défense des négetanx*, 430: 3-5.
- Lin, N.S; Hsu, Y.H. and Hsu, H.T. 1990. Immunological detection of plant viruses and mycosplasmatic organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membrane. *Phytopathology*, 80: 824-828.
- Liátcer G. 1991. Técnicas de detección de virus. *Rev. Hortofruticultura* 7:62-77.
- Llauger, R.; Dollet, M.; Cueto, J.R.; Peralta, E.L.; Alonso, M.; Rodríguez, M. and González, V. 2006. Current outbreaks of Lethal Yellowing in Cuba and use of Molecular Diagnostic Techniques in phytoplasma Detection. *Revista Italiana Petria* 15 (3).253-282. IO Incontro sul Fitoplasma.
- López, D. 2007. Prospección y caracterización de aislamientos del *virus de la tristeza de los cítricos* (CTV) en Cuba. Tesis de Maestría. IIFT. 84pp.

- Martín, S.; Alioto, D.; Milne, R.G.; Guerri J. and Moreno P. 2002. Detection of *Citrus psorosis virus* in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection test. *Plant Pathology*, 51: 134-141.
- Matthews, R.E.F. (1993). *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press, 372 pp.
- Patniat, A.; Izadpanah, K.; Afsharifar, A.R. and Mosalaie, M.K. 2004. Serology and survey of Citrus tristeza virus in southern Iran. Program and Abstract of 16th Conf. Inter. Org. Citrus. Virol. Monterrey, Mexico. p. 141.
- Peña, I.; López, D.; Batista, L.; Torres, M.C. y León, Y. 2006. Validación de la técnica de Inmunoimpresión ELISA indirecta para el diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos. *Citrifrut*, 23 (2): 25-31.
- Peña, I.; López, D.; Batista, L. y Aguilar, J. 2007. Comparación de tres métodos serológicos para la detección del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). *Memorias II Simposio internacional Fruticultura 2007*, La Habana, Cuba. ISBN 978-959-296-001-5.
- Peralta, E.L.; Pedroso, M.; Martínez, Y. 1997. Diagnóstico de fitopatógenos. *Manual teórico-práctico*. Ed. CENSA, 134 pp.
- Pérez, J.M.; Peña, I.; Batista, L. y López, E. 2007. Metodologías para el diagnóstico biológico de enfermedades transmisibles por injerto en los cítricos. *Memorias II Simposio internacional Fruticultura 2007*, La Habana, Cuba. ISBN 978-959-296-001-5.
- Putman, M.L. 1995. Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. *Crop Protection*, 14 (6): 517-525.
- Rocha- Peña M.A.; Lee, R.F. and Niblett, C.L. 1991. Development of a dot-immunobinding assay for detection of citrus tristeza virus. *J. Virol. Methods* 34: 297-309.
- Roistacher, C.N. 1993. Arguments for establishing a mandatory certification program for citrus. *Citrus Industry*. Oct. 8pp.
- Slack, S.A.; Drennan, J.L. ; Westra, A.A.G. ; Gudmestad, N.C. and Oleson, A.E. 1996. Comparison of PCR, ELISA and DNA hybridization for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicum* in field - grown potatoes. *Plant Disease*, 80: 519-524.
- Texeira, D.C.; Saillard, C.; Eveillard, S.; Danet, J.L.; Ayres, A.J. and Bové, J.M. 2005. A new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus* sp. nov., is associated with citrus Huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil. *In: Moreno, P.; da Graça, J.V. and Timmer, L. W. (Eds)*. Proc. 16th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 325-340.
- Van Regenmortel, M.H.V. and Dubs, M.C. 1993. Serological procedures. *En Diagnosis of plant virus diseases* Ed. R.E.F. Matthews: CRC Press. Capítulo 7: 159-212.
- Varm, A.; Ahlaval, Y.S.; Chakraborty, K.; Garnier, M. and Bové, J.M. 1993. Detection of greening BLO by electron microscopy, DNA hybridization in citrus leaves with and without mottle from various regions in India. *In: Moreno P.; J.V. da Graça and W. Timmer (Eds)*, Proc. 12th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 280-284.
- Velázquez, K. 2003. Identificación y caracterización de especies de viroides en cítricos de Cuba. Perfeccionamiento del método de diagnóstico. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en C. Agrícolas. Villa Clara. Cuba. 122 pp.

- Velázquez, K.; Pérez, J.M.; Alonso, M.; Batista, L.; Rodríguez, J.; Legarreta, G.; Grau, O. and García, M.L. 2005. Detection of Citrus Psorosis Virus in Cuba. *In*: Moreno, P.; da Graça, J.V. and Timmer, L. W. (Eds). Proc. 16th Conf. Inter. Org. Citrus Virol. Riverside, California. pp: 427- 428.
- Wang, Z.; Yin, Y.; Hu, H.; Yuan, Q.; Peng, G. and Xia, Y. 2006. Development and application of molecular-based diagnosis for 'Candidatus Liberibacter asiaticus', the causal pathogen of citrus huanglongbing. [Plant Pathology](#), 55 (5): 630-638(9).