

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

MICROSCOPIA ELECTRONICA EN LA DETECCION DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DEL
LIMON MEXICANO, EN ALGUNAS PLANTACIONES CITRICOLAS DE TECOMAN, COL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JUAN CAMILO AGUAYO DOMINGUEZ

1983



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Pág.
1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCION.....	2
3.- OBJETIVOS.....	3
4.- ANTECEDENTES.....	
4.1. Antecedentes económicos.....	5
4.2. Antecedentes técnico-científicos.....	5
5.- METODOLOGIA.....	22
5.1. Toma de muestra.....	22
5.2. Purificación parcial.....	24
5.3. Microscopía electrónica.....	25
5.4. Espectrofotometría en el UV.....	25
5.5. Cortes histológicos.....	25
6.- RESULTADOS.....	26
6.1. Microscopía electrónica.....	26
6.2. Espectrofotometría.....	29
6.3. Histología.....	30
7.- DISCUSION.....	33
8.- CONSLUSIONES.....	44
9.- APENDICE.....	46
9.1. Esquema de purificación parcial.....	47
9.II. Tinción negativa.....	48
9.III. Recubrimiento de rejillas para microscopía electrónica.....	48
9.IV. Técnica de inclusión en parafina y tinción de cortes - histológicos.....	50 51
9.V. Técnica de cortes en Crióstato.....	51
9.VI. Tinción y montaje de cortes histológicos realizados en crióstato.....	51 51
10.- BIBLIOGRAFIA.....	52

INDICE DE FOTOGRAFIAS

1.- Características de un árbol atacado por un complejo viral de tristeza del grupo fulminante.....	10
2.- Aspecto del fenómeno de "Pitting".....	11
3.- Síntoma de necrosis celular causada por complejos virales de tristeza.....	13
4.- Corte transversal de tallo.....	14
5.- Micografía electrónica de estructuras vegetales.....	16
6.- Estructura viral de la tristeza.....	17
7.- Fibras sospechosas encontradas en extractos de material vegetativo de Tecomán, Col.....	27
8.- Bacteria flagelada.....	28
9.- Bacteriófago de la serie T.....	30
10.- Bacteriófago de la serie T.....	31
11.- Acúmulos aparentemente virales observados en extractos parcialmente purificados.....	36
12.- Acúmulos virales de papaya.....	37
13.- Virus del mosaico del tabaco.....	39
14.- Virus de la papaya amplificada.....	40
15.- Amplificación de las fibras sospechosas.....	41

INDICE DE FIGURAS

1.- Origen y supuestas rutas de distribución de los frutos cítricos.....	7
2.- Curva espectrofotométrico en el UV de nucleoproteínas.....	19
3.- Curva espectrofotométrica de Proteínas.....	20
4.- Zonas muestreadas del municipio de Tecomán, Col.....	23
5.- Curva espectrofotométrica obtenida a partir de extractos parcialmente purificados de material vegetativo de Tecomán, Col.....	32

INDICE DE CUADROS

1.- Resultados de los factores evaluados en la muestra..... 34

RESUMEN:

El presente trabajo está enfocado a la detección del virus de la tristeza en limón mexicano procedente de Tecomán, Col.

Con este propósito se seleccionaron plantas que presentaran una sintomatología similar a la reportada para el ataque del virus de la -- tristeza.

Las metodologías usadas para llevar a cabo el objetivo fueron, - La microscopía electrónica y espectrofotometría en el UV de extractos, - de hojas cloróticas, corteza y tallos secundarios sometidos a purifica-- ción parcial; además histología e indexación.

De todas ellas sólo la microscopía electrónica contribuye con -- evidencias para sospechar de la presencia del virus de la tristeza en - nuestro país, ya que fueron observados partículas flexuosas con una apa-- rente subestructura helicoidal; cuyas dimensiones caen dentro del inter-- valo de las reportadas para el virus de la tristeza.

INTRODUCCION.

El cultivo de los cítricos al igual que otras especies frutales, son susceptibles a que un gran número de factores afecten su productividad, entre estos se encuentran, las deficiencias nutricionales, ataques de insectos, enfermedades de origen bacteriano, fungal y viral, de este último, es relativamente reciente el descubrimiento de su naturaleza, sin embargo, no es así el reconocimiento de los daños que causa.

Las enfermedades de origen viral en cítricos constituyen uno de los factores más costosos, ya que una vez establecido el virus, las plantas, en ocasiones deben ser reemplazadas por otras jóvenes, desafortunadamente los árboles afectados difícilmente pueden recuperarse por sí solos, aunando a esto, no existen compuestos químicos que detengan o inactiven el desarrollo del virus, siendo el único método de control factible, la prevención.

Entre las enfermedades de los cítricos causadas por virus, tenemos; xiloporosis, psorosis, tristeza, exocortis, entre otras; destacando de todas ellas la denominada tristeza; posiblemente la que más problemas ha causado en la citricultura mundial.

En México, no se ha realizado ningún estudio experimental relacionado con la enfermedad de la tristeza, por lo que no se puede descartar o afirmar la presencia o ausencia del virus, ya que éste se puede encontrar desde una forma asintomática hasta otra totalmente devastadora y dado que México está localizado entre países que han sufrido fuertes ataques del virus como EEUU y casi todo Centro y Sudamérica, de los cuales se puede pensar como posibilidad de que en alguna ocasión hayamos adquirido material vegetativo.

Durante mucho tiempo los métodos de diagnóstico del virus de la tristeza, se efectuaron por medio de indexaciones, las cuales consisten en injertar yemas del árbol en estudio sobre algún patrón sensible al virus, como lo es el limón mexicano, de ahí que se denomine "método tradicional de la lima mexicana", teniendo como principales inconvenientes el tiempo requerido en la obtención de resultados, así como en lo que -

respecta a la infraestructura de invernaderos acondicionados y finalmente los recursos técnicos y humanos que implican tanto el montaje del invernadero como el mantenimiento del material vegetativo; durante la última década, se han utilizado para el estudio de esta enfermedad métodos y técnicas más sofisticadas entre ellas, la microscopía electrónica, centrifugación (ultracentrifugación), técnicas histológicas y serológicas- acompañadas de purificación; siendo la principal ventaja con respecto al "método tradicional de la lima mexicana" la rapidez con que se detecta el virus; incluyendo la gran especificidad que proporcionan las técnicas serológicas.

El propósito de este trabajo es el poder detectar, a través de un muestreo dirigido, material vegetativo sospechoso de estar infectado por el virus de la tristeza.

El material que se maneja en este proyecto, consiste en hojas -- cloróticas, ramas y corteza de árboles injertados, localizados en Tecomán, Col., municipio de mayor producción en el estado.

Las muestras se sometieron a técnicas de purificación parcial de virus, por medio de la combinación de centrifugación diferencial y precipitación con polietilén glicol, posteriormente se montaron las preparaciones para microscopía electrónica.

Paralelamente se aplicaron técnicas histológicas de peciolo y pedúnculo las cuales fueron analizadas al microscopio óptico, además indexación en plantas libres de virus y espectrofotometría en el UV.

OBJETIVOS.

Generales.

- 1.- Uso de microscopía electrónica y técnicas histológicas para la detección del virus de la tristeza del limón mexicano, en algunas plantaciones del municipio de Tecomán, Col.
- 2.- Uso de espectrofotometría para el análisis de nucleoproteínas.

Específicos:

- 1.- Determinar la técnica más confiable y económicamente posible de purificación del virus de la tristeza.
- 2.- Aplicar microscopía electrónica, técnicas histológicas y espectrofotometría en el UV para el diagnóstico de la enfermedad del virus de la tristeza.
- 3.- Establecer la sintomatología de la enfermedad de la tristeza con mayor precisión.

ANTECEDENTES ECONOMICOS.

En nuestro país el cultivo de los cítricos hasta 1979, representó el 35% de la superficie cultivada, equivalente a 226,000 ha, en donde se incluyen naranjo, limón, mandarina, toronja y lima, con una producción de 2,445,000 ton, para lo que se estimó un valor superior a los -- 3600 millones de pesos.

La producción de limón aportada por los 6 principales productores para el ciclo 78-79 se calculó en 437, 597 ton, siendo Tecomán, Col., la principal zona productora, con un aporte del 78% de la producción estatal que representa el 41% de la nacional. Del Castillo, T.N. (1979).

En el estado de Colima las plantaciones de limón mexicano hasta la fecha, se encuentran establecidas con material de pie franco; sin embargo, en los últimos diez años, se ha incrementado el número de árboles injertados como una medida preventiva contra enfermedades como la gomosis producida por Phytophthora sp. considerando que en 1979, el 10% de árboles en producción y el 58% de árboles en desarrollo se encuentran injertados con naranjo agrio y en base a que el principal medio de diseminación de las enfermedades virales es principalmente el injerto ya que en México existen las condiciones ecológicas que propician el desarrollo de la enfermedad de la tristeza, se considera necesario realizar un estudio confiable para la aplicación de Técnicas y Métodos de identificación de virus de cítricos, para así detectar el virus de la tristeza en una etapa en que aun no se ha manifestado, ya que es posible se encuentre -- presente en forma asintomática.

ANTECEDENTES TECNICO CIENTIFICOS.

Pocas enfermedades han causado pérdidas tan severas en los cultivos, como la enfermedad de la tristeza en los cítricos; ya que extensas áreas han sido destruidas completamente en un tiempo corto; siendo la única solución a este problema la sustitución con árboles tolerantes a este virus.

Aspectos históricos y distribución de los cítricos.

La enfermedad de la tristeza al igual que los cítricos son originarios de China y Japón, encontrándose la enfermedad en casi todas las áreas citrícolas del mundo. Fig. (1).

Así Price, W.C. (1970), reporta que el mecanismo de dispersión de una zona a otra, es a través del material vegetativo de árboles infectados, en los cuales la enfermedad es asintomática; este material se propagó sobre patrones tolerantes, distribuyéndose posteriormente a otros árboles por insectos vectores, donde la velocidad de diseminación del virus depende principalmente de la eficacia de las especies de insectos presentes en la zona. Los primeros países donde aparece ampliamente distribuida Wallace, (1956), son los que se encuentran en el África del Sur. En Australia es reportado por Frase, (1959), y casi en todo el continente Asiático, en donde el patrón naranjo agrio no se utilizaba como tal.

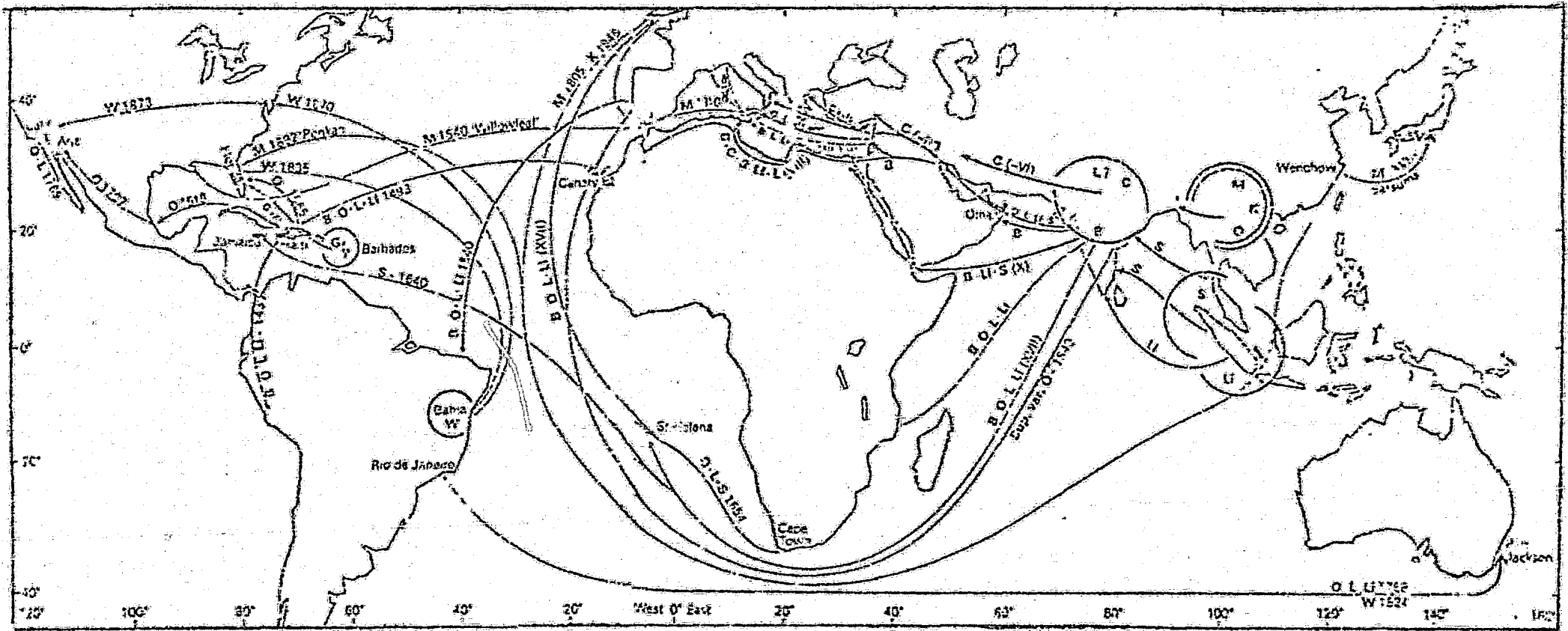
La tristeza aparece en Sudamérica, según Carrera (1933), quien sugiere que la introducción de la enfermedad en Argentina fue probablemente debida a la importación de grandes cantidades de cítricos injertados sobre limón rugoso (combinación tolerante a la tristeza) proveniente de Sudáfrica.

Sin embargo, en Brasil no se conoce con certeza si la enfermedad proviene directamente de Sudáfrica, Costa (1956), o bien de Argentina; hacia los años cuarenta; las plantaciones citrícolas de Perú, Uruguay, Venezuela y Colombia se encuentran infectadas.

En los EEUU, la enfermedad empieza a diseminarse en California hacia 1939, aunque no es claro como sucede; ya que los árboles infectados, y el material de propagación habían sido importados anteriormente, sin embargo, la tristeza aparece limitada en ciertos árboles de origen asiático. Posteriormente se detecta en Florida, aunque la introducción inicial se cree fue 15 años antes, Grant (1953).

En 1958, Planes (1965), establece que la tristeza empieza a dise

Fig. 1 Supuesto origen y rutas de propagación de los frutos cítricos.



- B - Bigarade (*Citrus aurantium*)
- O - Citron (*Citrus medica*)
- G - Grapafuit (*Citrus paradisi*)
- K - Kumquat (*Fortunella margarita*)
- L - Lemon (*Citrus limon*)

- Li - Lime (*Citrus aurantifolia*)
- M - Mandarin (*Citrus reticulata*)
- O - Orange (*Citrus sinensis*)
- S - Shaddock (*Citrus grandis*)
- W - Washington Navel

minarse en extensas áreas de España; reportándose hace pocos años una propagación limitada en Israel, Bar-Joseph (1973).

Es importante y de llamar la atención que en la mayoría de las plantaciones cítricas empezaron a manifestarse los daños causados por la enfermedad, cuando fueron substituidos los patrones tradicionalmente usados por el naranjo agrio, portainjerto altamente susceptible a la enfermedad de la tristeza.

Al detectarse la presencia de la enfermedad en casi todos los países, se iniciaron los estudios sobre la misma, basándose en características sintomatológicas que presenta el hospedero cuando éste es infectado.

Así Carrera en 1930, observa que el árbol muere debido a la "pudrición de las raicillas", denominando la enfermedad con este nombre, a diferencia de Moreira (1937), que en Brasil a la misma sintomatología la llama "tristeza de los cítricos". Sin embargo es hasta 1937, que Fawcett y Bitancourt, suponen que la enfermedad es causada por un agente infeccioso probablemente de origen viral.

Al encontrar la enfermedad en el estado de California, Fawcett (1940) la denomina "Quick decline". De manera paralela a Mc. Alpin, reporta una nueva enfermedad de los cítricos en Australia, nombrándola "bud union decline". Ya para 1946, Meneghini afirma que el daño es causado por un virus y que éste es transmitido por el pulgón negro de los cítricos (Toxoptera citricidus); Fawcett, Wallace y Fernández en esta misma fecha llegan a la misma conclusión, logrando comprobar que la transmisión de la enfermedad es tanto por insectos como por injerto.

Sintomatología de la enfermedad:

La gran mayoría de los virus patógenos de los vegetales se presentan como complejos de diferentes razas, el virus de la tristeza no es la excepción, siendo de suma importancia la clasificación y caracterización de las distintas cepas, debido a que ciertos complejos de las mismas pueden ser utilizados para proteger árboles contra cepas más

fuertes o agresivas, Primo (1971).

De acuerdo con la cepa que haya atacado el árbol se presenta:

- a).- Una tristeza violenta, la cual en un lapso de 15 días hace que las plantas que hasta entonces no habían presentado sintomatología, -- aparezcan como quemadas, sus hojas se enrollan longitudinalmente, presentándose una gran defoliación, sin brotación posterior, ni -- fructificación, el colapso es tan violento que la planta muere --- de inmediato. A este tipo de tristeza se le denomina fulminante.- Foto (1).
- b).- Tristeza moderada, complejo viral que desarrolla en el hospedero -- una sintomatología caracterizada por hojas cloróticas; según la va- riedad del cítrico se puede presentar moteado, la nervadura princi- pal se torna amarillenta y más pronunciada asemejando deficiencia de calcio, las hojas nuevas son pequeñas presentándose ligeramente agrupadas formando un ángulo cerrado, se presenta gran defoliación, aparecen brotes pegados al tronco y ramas principales, la fructifi- cación se ve acelerada con frutos abundantes que maduran sin desa- rrollar, en algunos casos se presenta el fenómeno de "pitting", que consiste en la formación de finísimas agujas de madera (extremida- des de los radios medulares), bajo la línea de injerto, a estas -- agujas que salen de la madera corresponden unas cavidades muy fi- nas de la parte interna de la corteza. Foto (2).

Los árboles afectados con este complejo viral mueren entre los 10 y 14 meses.

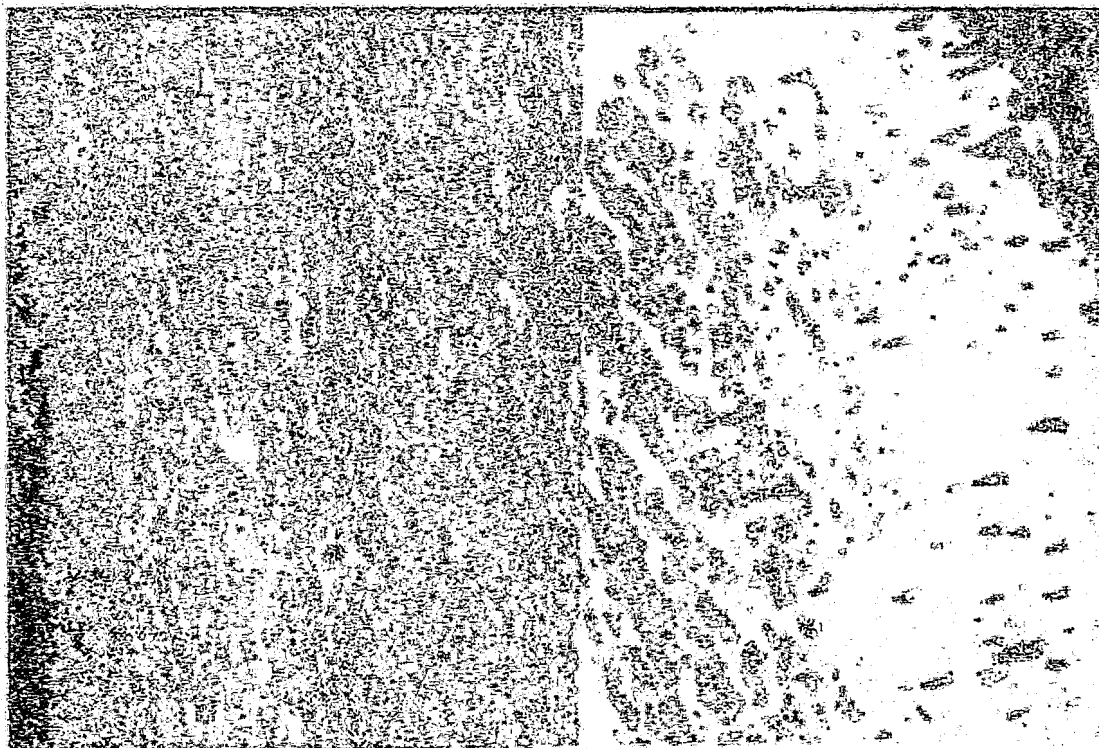
- c).- Tristeza débil, se caracteriza porque a pesar de que se encuentra el virus en el árbol este no desarrolla ningún síntoma, la capa- cidad productiva no se ve afectada, la presencia del virus puede -- demostrarse por microscopía electrónica y por el método tradicional de la lima mexicana.

Este tipo de complejo viral puede usarse masivamente para inocu- lar árboles como medio de protección contra otras cepas virales, por lo



Fotografía No. 1

- A) Arbol sano.
- B) Arbol atacado con un complejo moderado de tristeza.
- C) Arbol infectado con un complejo viral de tristeza del grupo fulminante; obsérvese en este caso, la gran defoliación y la abundancia de frutos.



Fotografía No. 2

Aspecto del leñador de Pittia, desarrollado por
complejos virales de triterenos del grupo moderado, en
donde la corteza presenta acilas las cuales coinciden
con el mismo número de gradaciones en el tallo.

tanto puede considerársele como razas virales benéficas.

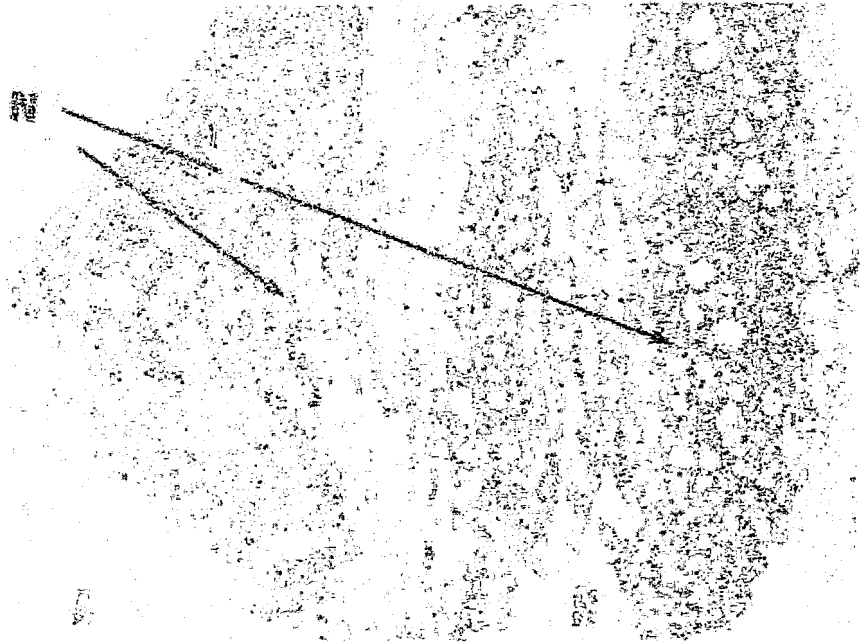
Acción del virus.

A partir de la sintomatología del hospedero infectado por el virus de la tristeza, los siguientes aspectos son con el fin de explicar los daños que causa el virus a la planta cuando éste se ha establecido.

En el follaje de las plantas enfermas de tristeza, Meneghini, -- (1946) demuestra que el porcentaje de nitrógeno se encuentra reducido. Por su parte, Trippi, al realizar análisis enzimáticos de material foliar determina que las catalasas y amilasas se encuentran por debajo del valor normal, impidiendo así una actividad metabólica adecuada de carbohidratos y en consecuencia la deficiencia de éstos en el sistema radical.

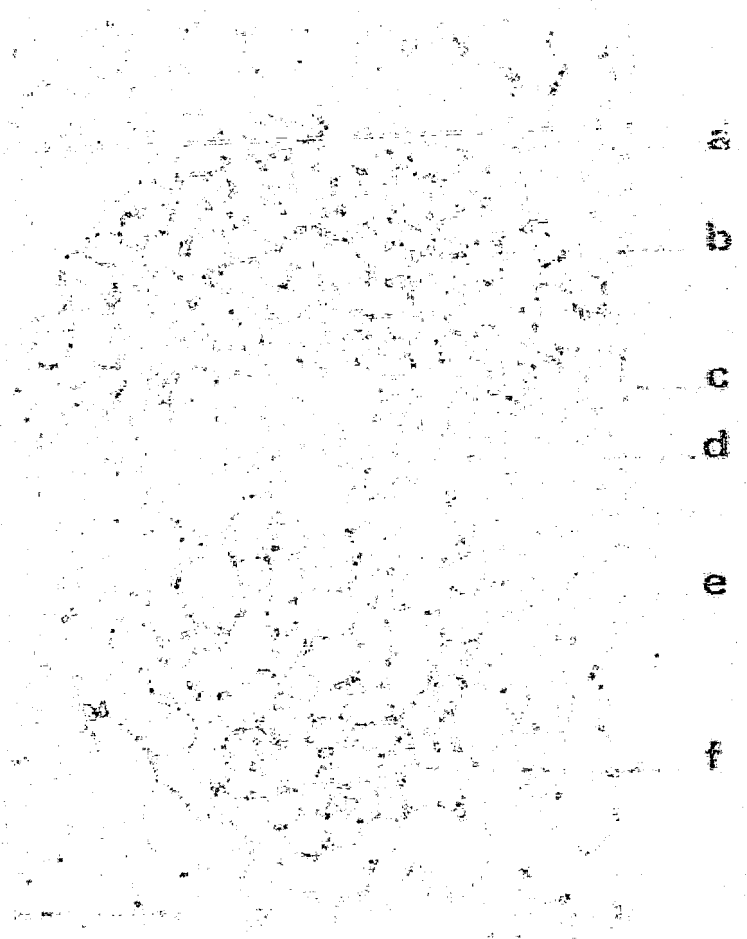
En cuando a la acción del virus y el colapso que sufre la planta al ser infectada, Costa (1956), demuestra que la multiplicación del virus se realiza en el follaje de la planta, produciendo posteriormente una necrosis en los vasos cribosos, a la altura de la zona de injerto. Costa y Grant (1957), explican la forma de como se produce esta necrosis. Foto (3).

En las plantas afectadas con la enfermedad de la tristeza, empieza a notarse en la zona del floema funcional y en las células cercanas al tejido parenquimatoso y a los vasos liberianos de reciente formación, una acumulación del material citoplásmico: En estas células denominadas cromáticas por que se tiñen con la tinción de Giemsa (púrpuras), aparece alrededor del núcleo una zona blanquecina que posteriormente se oscurece, al mismo tiempo que se endurece la pared celular por espesamiento del material protoplásmico, estas células aumentan de volumen, se necrosan, presionan a los vasos liberianos estrangulándolos, impidiendo así la circulación del material nutritivo del follaje hacia las raíces. En el cambium se forman células cromáticas y por este motivo parte de él se necrosa, al suceder esto, la zona correspondiente a éstas dejan de formar liber y leño, sin embargo las células vecinas normales continúan en su actividad, lo que da como resultado la formación de concavidades



Fotomicrogr. No. 3

- 1) Sitios de necrosis celular causada por complejos virales de triplete de los virus colorados y fulminantes al aplicación de A.



Fotografía 14.

Corte transversal de tallo de un árbol sano

- a - Granelos de abaxil
- b - Fibra
- c - Elementos de la savia
- d - Cambio
- e - Metaxilem
- f - Anillo de crecimiento

denominadas "pitting".

La savia encuentra una barrera en la línea de injerto para descender a las raíces y llevar allí el material necesario. Por su parte las raicillas toman como único recurso las reservas de almidón localizadas en el tronco por debajo de la línea de injerto y raíces principales, agotadas éstas, el sistema radical empieza a morir por falta de alimento, produciéndose la deterioración de raicillas en consecuencia muerte de ramas y amarillamiento de hojas.

CARACTERIZACION DE LA PARTICULA VIRAL.

Muchos son los trabajos que hasta la fecha se han publicado, con el objeto de llegar a una caracterización completa del virus de la tristeza.

A este respecto destacan los realizados por Kitajima, E.W. (1960) Silva, D.M. (1965) y Bar-Joseph, M. (1970), quienes reportan la técnica de purificación parcial del virus de la tristeza, basada en la combinación de centrifugación diferencial y precipitación con polietilenglicol (PM 6000).

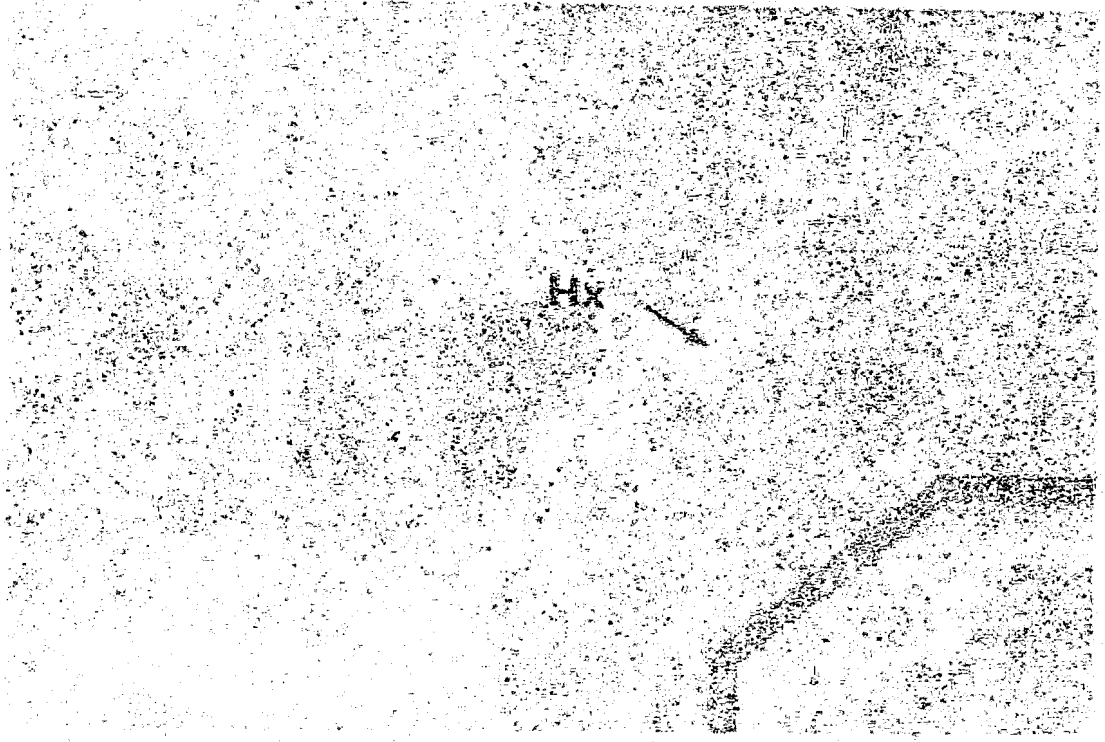
Una vez lograda la purificación parcial del virus, Kitajima, E.W. (1964), observa por primera vez al microscopio electrónico la presencia de dos tipos de partículas, unas flexuosas de 10 a 12 nm de diámetro y de 2000 nm de longitud y otras de apariencia más rígida y carentes de material genético; estos mismos resultados son reportados por Price (1966) y Cohen (1967). Foto (5) y (6).

Con esto, se inician los estudios para la caracterización química de ambas partículas, llegando a coincidir que, aquéllas de 6 a 9 nm de diámetro correspondían a estructuras vegetales, ya que se les encontraba invariablemente en extractos de material sano y afectado; mientras que las otras sólo eran observadas en extractos provenientes de material de árboles afectados de tristeza, Kitajima, (1965).

Sin embargo las estructuras virales no estaban lo suficientemen-

Fotografía No. 5

Micrografía electrónica de fibras correspondientes a estructuras vegetales. (Mitajina 1964).



Fotografía No. 1

Comparación visual de la estructura de la pared, con la estructura de la pared, en la que se observa la diferencia en las fibras con respecto a las fibras de un árbol sano.

te puras para lograr una buena caracterización por lo que Bar-Joseph -- (1972), introduce a la técnica una segunda purificación por ultracentrifugación por gradiente de densidad en cloruro de cesio, obteniéndose -- por este método la purificación del virus, aunando a la caracterización específica del mismo. Para lo cual hizo uso del virus del mosaico del tabaco cuya densidad es de 1.325 g/cc* y del virus del mosaico del pepino con densidad de 1.336 g/cc como marcadores, conjuntamente con el virus de la tristeza sometidos al procedimiento antes mencionado, en la columna de fraccionamiento se encontró al virus de la tristeza localizado por debajo de las partículas del mosaico del tabaco y por encima de las del pepino, deduciendo que las partículas del virus de la tristeza tienen una densidad de 1.328 g/cc.

Posteriormente se procedió a determinar, dada la naturaleza proteica, el espectro de absorción en el ultravioleta de las partículas purificadas el cual revela un espectro típico de nucleoproteínas con un pico máximo a 260 nm y un mínimo a 245 nm Fig. (2).

A diferencia del espectro dado por el material purificado proveniente de árboles sanos, el cual correspondía a proteínas, con un máximo a 280 nm y un mínimo a 258 nm, Cuñat (1973) Fig. (3).

Procediendo a montar la reacción de orcinol con el purificado de las partículas asociadas a la enfermedad se demuestra con esto la presencia de RNA como material genético de las mismas, siendo negativa con la prueba de la difenilamina para DNA.

El peso molecular de la nucleoproteína fué estimado en 25000+ -- 10000 mediante el uso de electroforesis en gel de poliacril amida, interpolando en una curva estandar de proteínas de peso molecular conocido.

El peso molecular de la partícula en si, es de $144 \pm 23 \times 10^6$, -- cuando ésta es de una longitud de 2000 nm, una estructura helicoidal con 540 vueltas, 10 subunidades protéicas por vuelta y conteniendo 6% de material genético, (RNA), Bar-Joseph, M. (1970).

*gramos/centimetro cúbico

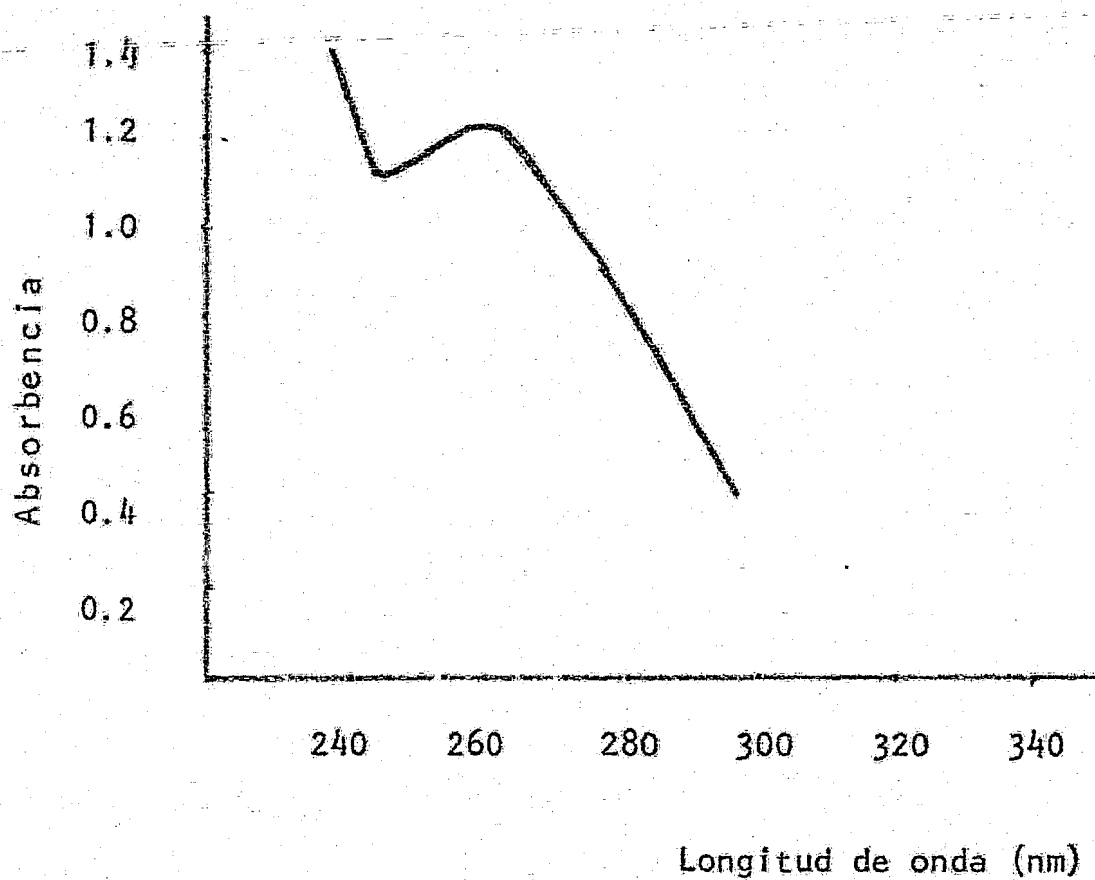


Fig. No. 2

Espectro de absorción en el ultravioleta desarrollado por nucleoproteínas (Primo 1973).

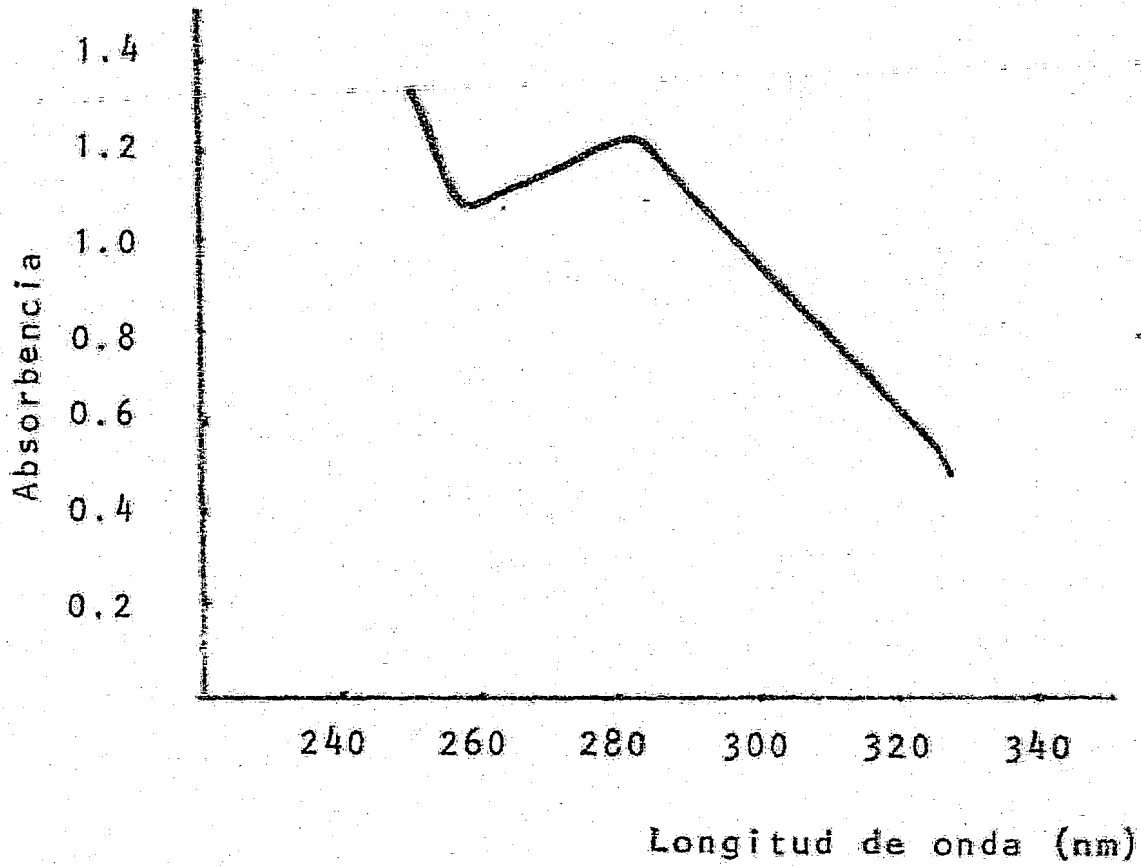


Fig. No. 3

Espectro de absorción en el ultravioleta desarrollado por proteínas (Primo 1973).

Por técnicas de difracción óptica y densitometría, Bar-Joseph, M. (1970) determinó que la hélice base contiene 10 subunidades en cada --- vuelta y una inclinación de $37 \pm 2 \text{ \AA}$.

METODOLOGIA.

Los árboles de limón mexicano injertados sobre naranjo agrio, de los cuales hasta el último censo se reportaron un 10% en producción y un 58% en desarrollo, fueron considerados como elementos para el marco de muestreo.

Las huertas sometidas a este estudio se encuentran distribuidas de acuerdo a la figura (4), de las cuales fueron revisadas 35, seleccionándose 20; tomándose de cada una de ellas los datos siguientes: edad; 3 a 5 años, de sintomatología sospechosa de ataque viral (clorosis, brotes con hojas pequeñas, defoliación, etc) y por último de las labores culturales: número de riegos, aplicación de productos, entre ellos fungicidas, bactericidas, fertilizantes e insecticidas.

De las 20 huertas, los árboles correspondientes a 10 de ellas -- fueron marcados previamente al inicio del muestreo, con el propósito de verificar si la sintomatología de éstos, persistía. Las 10 restantes -- fueron seleccionadas posteriormente tomando en cuenta los mismos factores, así como su ubicación, con el fin de obtener una muestra representativa en los distintos puntos del municipio de Tecomán, Col.

Se tomaron muestras de ramas jóvenes, hojas cloróticas y corteza de tallos secundarios, de un total de 225 árboles, todas fueron empacadas en bolsas de polietileno y transportadas al laboratorio en refrigeración.

De las 225 muestras, 150 fueron sometidas a purificación parcial de virus usando la técnica de Bar-Joseph, (1970), en la cual se emplea una combinación de centrifugación diferencial y precipitación con polietilén glicol (PM6000) cuyo fundamento es el siguiente:

Cuando la concentración de polietilén glicol es baja, las proteínas difunden a través de los espacios intermoleculares de la cadena polimérica, la cual al aplicar una fuerza centrífuga sedimenta arrastrando las moléculas proteicas.

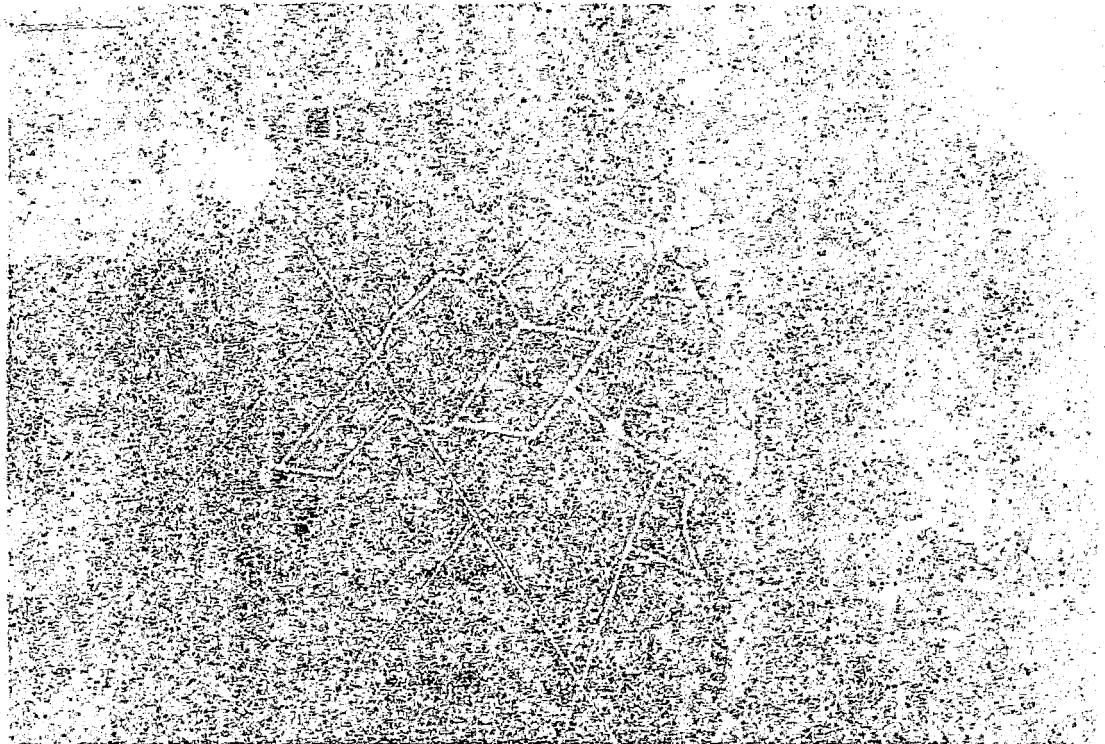


Figura 4. 4

Municipio de Tocumán, Col.

Las áreas de siembra de material vegetativo se encuentran distribuidas en las zonas II, V, III y III.

Si la concentración de polietilén glicol aumenta; debido al agrupamiento que forman las cadenas del mismo, surge una reacción de exclusión o desplazamiento de proteínas; esto, aunado a las características deshidratantes del polímero, contribuyen a la precipitación de las proteínas debido a su elevado peso molecular.

De cada una de las muestras se toman 100 g, se congelan haciendo uso de nitrógeno líquido, se trituran con un molino manual o eléctrico, hasta obtener un polvo fino; se añade amortiguador de Tris (hidroximetil) amino metano 0.05 M, en una proporción de 12 ml por gramo de tejido a pH=7.4 cuando se trabaja con corteza y pH=8.4 cuando se hace con hojas; se homogeniza y se filtra a través de algodón, la materia vegetal retenida se resuspende en el mismo amortiguador en proporción de 1.5 ml/g, filtrándola nuevamente; se mezclan los filtrados y se clarifican por medio de centrifugación lenta a 5000 g durante 10 minutos; por cada 100 ml de sobrenadante se adicionan 4 g de polietilén glicol (PM6000) y 4 ml de cloruro de sodio al 20%, agitando en frío durante 20 minutos; la suspensión se centrifuga a 19,600 g por 15 minutos, haciendo uso de un rotor GSA, el sedimento se resuspende en amortiguador de fosfatos 0.04M, pH=8.2 en un cuarto del volumen original (25 ml), se centrifuga a 4,400g durante 10 minutos en un rotor SS-34, se separa el sobrenadante y por cada 25 ml de éste, se agrega 0.5 g de polietilénglicol (PM6000) y 0.6 ml de cloruro de sodio al 20% agitando en frío hasta su disolución, posteriormente se centrifuga a 20,000 g por 15 minutos, el sedimento se resuspende en amortiguador de fosfatos 0.025M pH=8.2 y se centrifuga a 4,400 g durante 10 minutos; el sobrenadante se considera el purificado parcial; (ver apéndice).

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Con el objeto de buscar las partículas virales en el extracto -- parcialmente purificado; se montaron rejillas de 3.2 mm de diámetro y -- una malla de 400 aberturas; las rejillas fueron cubiertas con una capa de Formvar disuelto en 1.2 dicloroetano, (ver apéndice).

La técnica usada en el revelado de las partículas fué la tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2%, neutralizado con NaOH o KOH -- al 1% (ver apéndice).

Las rejillas preparadas con el extracto, fueron examinadas en un microscopio electrónico (jeol, modelo JEM 100S) a 60 Kv de aceleración y con una apertura de objetivo de 20 ó 40 μ m. Debido al caracter proteico del virus y al diferente espectro que revelan las nucleoproteínas en si, se determinó el espectro de absorción en la zona del ultravioleta -- (240-360 nm), haciendo uso de un espectrofotómetro UNICAM Sp, modelo -- 1800, en el cual se determinó dicho espectro de las muestras sometidas a purificación parcial.

Otro tipo de pruebas montadas para confirmar la presencia del virus en el tejido del huésped, consistió en las técnicas histológicas, -- cuyo objetivo es localizar necrosaciones, degeneraciones o inclusiones virales desarrolladas por el mismo, en células floemáticas de pedúnculo y pecíolo, para este fin fueron realizados cortes histológicos de 75 -- muestras haciendo uso de un crióstato (American Optical Cryo-cut) cuando las muestras eran frescas y llevando a cabo técnicas de inclusión en parafina en tejidos que previamente son deshidratados, (ver apéndice); ambas fueron teñidas con Azur-A.

Además, el material vegetativo con sintomatología característica de ataque viral fué injertado sobre plantas de limón mexicano libre de virus, en cuyo caso los resultados no serán publicados en el presente -- trabajo debido al tiempo prolongado de obtención de los mismos.

RESULTADOS.

De acuerdo a los puntos establecidos en la metodología sobre el muestreo de las huertas analizadas, todas como se puede observar en el cuadro No. (1), presentan características semejantes en lo que se refiere a portainjerto (naranja agrio) labores culturales (número de riegos, productos aplicados), así como el estado fitosanitario cuya apariencia es más o menos adecuada, sin embargo, se acentuaban en algunos árboles síntomas de decaimiento, mostrándose semidefoliados cloróticos, asociando estas características a un posible ataque.

Así las muestras fueron tomadas de las plantas que presentaban las características antes citadas, procediendo al análisis de las mismas considerando todos los posibles ataques, para luego continuar con el procedimiento, haciendo uso de cuatro metodologías enfocadas a la detección del virus de la tristeza.

1).- Microscopía electrónica.

Mediante el microscopio electrónico fueron examinadas 150 preparaciones procedentes de material vegetativo previamente sometido a purificación parcial del virus, siendo encontradas comúnmente en gran número las estructuras siguientes.

Partículas largas de aspecto rígido de un diámetro aproximado de 6 a 9 nm, con longitud variable y sin estructura helicoidal aparente, encontradas en un 90% de las preparaciones revisadas.

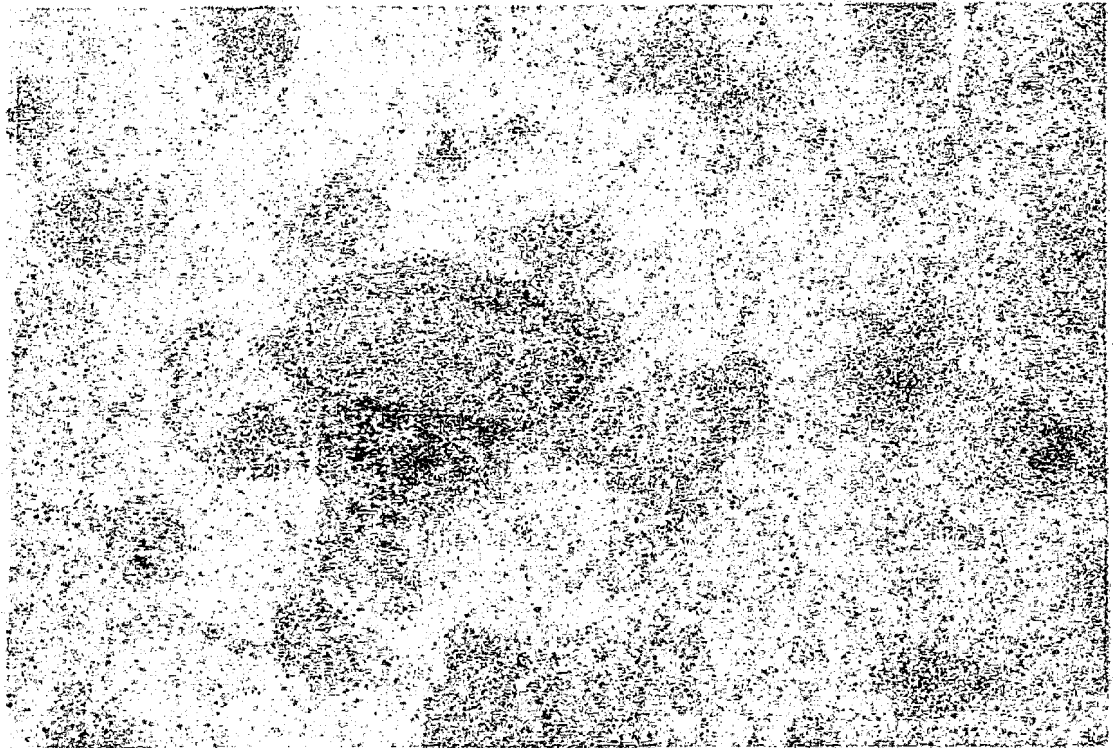
En las muestras correspondientes a 4 huertas se observaron estructuras filiformes completamente distintas a las anteriores, de aspecto flexuoso, probablemente con una subestructura helicoidal Foto (7).

Flagelos de origen bacteriano, procedentes de microorganismos bacilares; Foto (8), por lo general los flagelos se encontraban unidos de uno a tres a las bacterias, sin embargo gran número de ellos, se observaron aislados.



micrografía no. 7

Fibras encontradas en extractos parcialmente purificados de material vegetativo proveniente de Taccaea, Col., exhibiendo una estructura celular (10) 40,000x, tomada a 400 micras posteriormente.



Fotografía No. 8

Bacteria flagelada encontrada en fósiles foliares: -
10,000x.

Las bacterias fueron aisladas y teñidas por tinción de Gram, teniendo afinidad por la safranina; (Gram negativos).

En un 90% de las preparaciones fueron observados por lo menos dos tipos de bacteriófagos de la serie T, en un número aproximado de 5 por campo, diferenciados entre sí por su tamaño Foto (9) y (10).

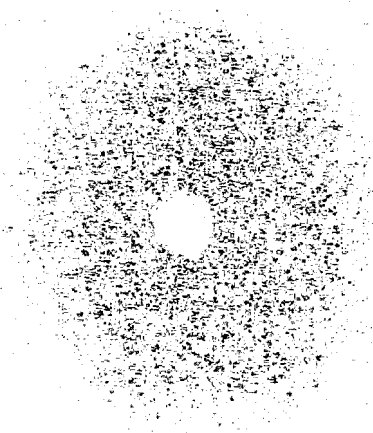
Con el propósito de medir y comparar las semejanzas de las estructuras sospechosas, fueron montadas rejillas con extractos de virus de papaya y virus del mosaico del tabaco.

2).- Espectrofotometría.

De las 150 muestras sometidas a purificación parcial, se obtuvieron los espectros de absorción en la zona del ultravioleta (240-360nm) de 25 muestras, dándole prioridad a los extractos provenientes de las huertas en las que fueron observados al microscopio electrónico partículas sospechosas; los espectros obtenidos por esta técnica revelan una curva característica de proteínas en la cual se obtiene un valor máximo a 280 nm y un mínimo a 258 nm; ilustrado en la figura (5), donde se grafica longitud de onda contra absorbencia.

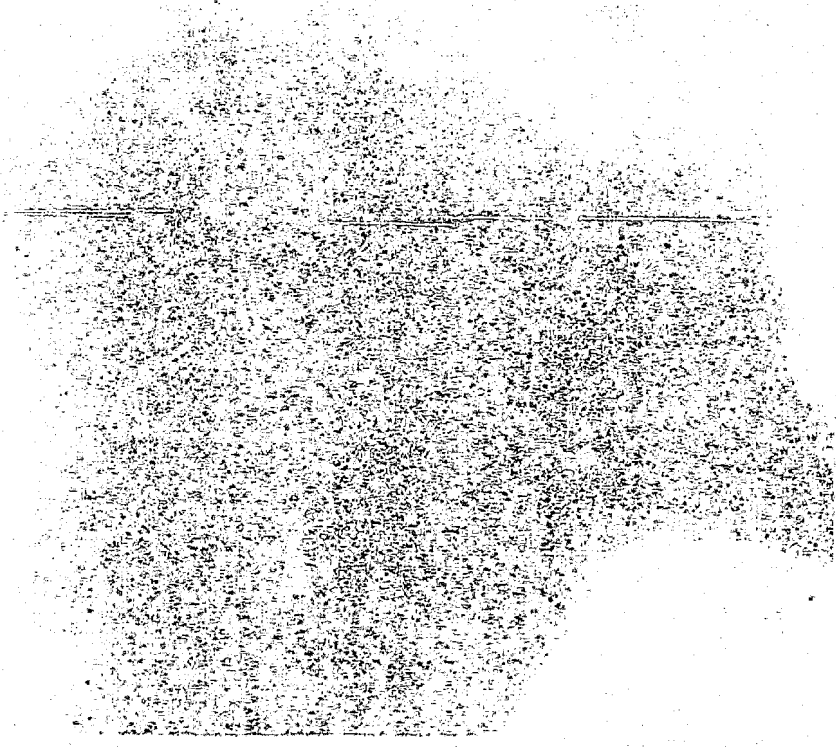
3).- Histología.

Por microscopía óptica fueron revisados cortes histológicos de pedúnculo y pecíolo, cuyos resultados muestran un tejido aparentemente sano; ya que no fueron encontradas en ningún caso células necrosadas, deformaciones o inclusiones virales desarrolladas por el virus de la tristeza.



Fotografía No. 9

Bacterioides de la serie T. Poliedrico con Cauda, encontrados en material vegetativo procedente de Tecoman, Col. 25,000x.



Fotografia Nr. 10

Caracterologia de la serie I, din grupa, encontrada en material
vegetativo precezent de Tecoman, Col. 25,000x, comparese
regulata con la fotografia anterior.

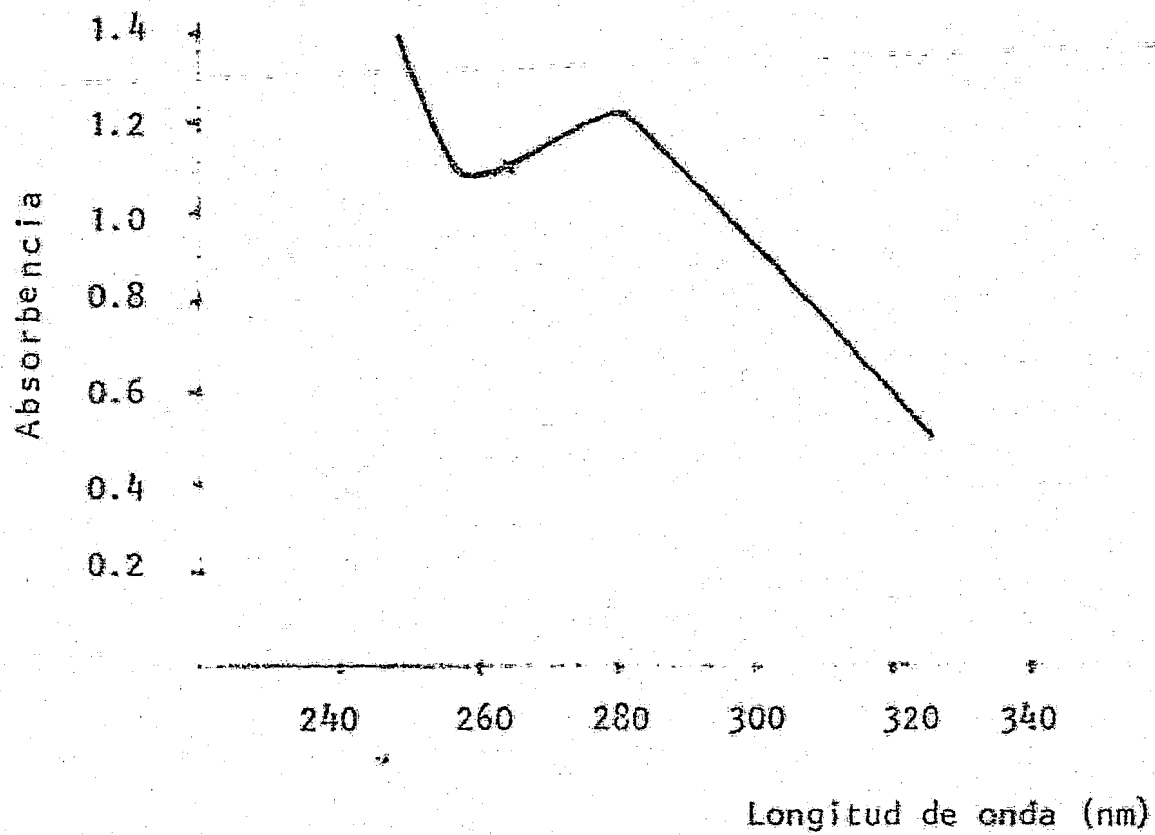


Fig. No. 5

Espectro de absorción en el ultravioleta obtenido en extractos parcialmente purificados de material vegetativo procedente de Tecomán, Col.

DISCUSION.

Los resultados que aparecen en el cuadro No. (1), indican en general que en las huertas muestreadas, se llevan a cabo diferentes medidas de control químico dirigidas a hongos, bacterias e insectos, en algunas con poco éxito, dado que se observan dichos parásitos causando -- síntomas patológicos.

Las labores culturales y el estado fitosanitario de las huertas -- era más o menos bien conducido, sin embargo en algunas plantas, se observan síntomas anormales destacándose principalmente la clorosis generalizada, defoliación y pudrición de raíces, características que se asemejan con los publicados por Wallace, Moreira y Bitancourt entre otros, -- quienes confieren dicha sintomatología al virus de la tristeza tanto a complejos moderados como fulminantes; ratificándose dichas observaciones por Kitajima (1964), al observar las partículas virales al microscopio electrónico. En los resultados obtenidos en este caso no se puede confirmar que los síntomas presentados en las huertas sean debidos a -- etiología viral ya que algunas especies de hongos, bacterias, insectos y nemátodos, en combinación y por sí solos pueden desarrollar la clorosis y en consecuencia defoliación.

Las bacterias pueden ser encontradas atacando hoja, tallo y raíz, en esta última causando pudrición, lo cual repercute en la absorción de micro y macroelementos, presentándose en consecuencia síntomas de deficiencias nutricionales, representados por la clorosis y la defoliación entre otras.

Por lo regular las cepas bacterianas que se encuentran parasitando raíces pueden atacar hojas por lo que ^{el} fenómeno de fotosíntesis se -- verá afectado, disminuyendo por tal causa, en algunos casos, el material elaborado, recalándose los síntomas antes citados.

Los hongos, nemátodos y algunas larvas de insectos presentan un cuadro similar; mientras que los virus vegetales principalmente refiriéndose al de la tristeza, su acción es diferente, aunque los resultados -- sean semejantes. Costa en 1956 demuestra que la multiplicación del vi--

Cuadro No. 1 RESULTADOS DE LOS FACTORES EVALUADOS EN LA HUERTA (20 huertas)

1º L. Culturales	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
a) No. Riegos-----	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
b) Insecticidas-----	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
c) Fungicidas-----	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
d) Bactericidas-----	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
e) Fertilizantes-----	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
f) Suelo-----	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
g) Maleza-----	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

2º Aspecto general de la huerta-----	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
--------------------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

3º Aspecto del árbol

Hojas	Defoliación-----	+	+	+	A	-	-	+	A	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	
	Clorosis-----	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	Hongos-----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	Bacterias-----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
	Insectos-----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tallo	Bacterias-----	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	Insectos-----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hongos-----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raiz	Apar. Física-----	dX	dX	dX	N	N	N	N	dX	dX	d	d	N	d	N	N	N	d	d	X	dX
	Pudrición-----	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
	Hongos-----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Insectos-----	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fruto-----	PC	PC	N	N	N	N	BC	N	N	N	PC	PC	PC	N	N	N	N	N	N	PC	

M = mensualmento N = normal (-) = no presente
 A = anualmente R = removido d) = descascarado
 E = escasa + = síntoma presente X = acanalado
 D = decaída + = síntoma débil PC = pequeño maduro

rus se lleva a cabo en el follaje de la planta, produciendo posteriormente necrosis de los vasos cribosos a la altura de la zona de injerto, al obstruirse éstos, el material elaborado por las hojas no llega al sistema radical por lo que se produce la pudrición de raicillas por escases de alimento, en consecuencia la disminución de sales minerales, - mostrándose finalmente los síntomas de clorosis y defoliación.

Partiendo de los factores ya comentados (clorosis, defoliación, etc.), se seleccionaron muestras que posteriormente fueron divididas para los diferentes análisis.

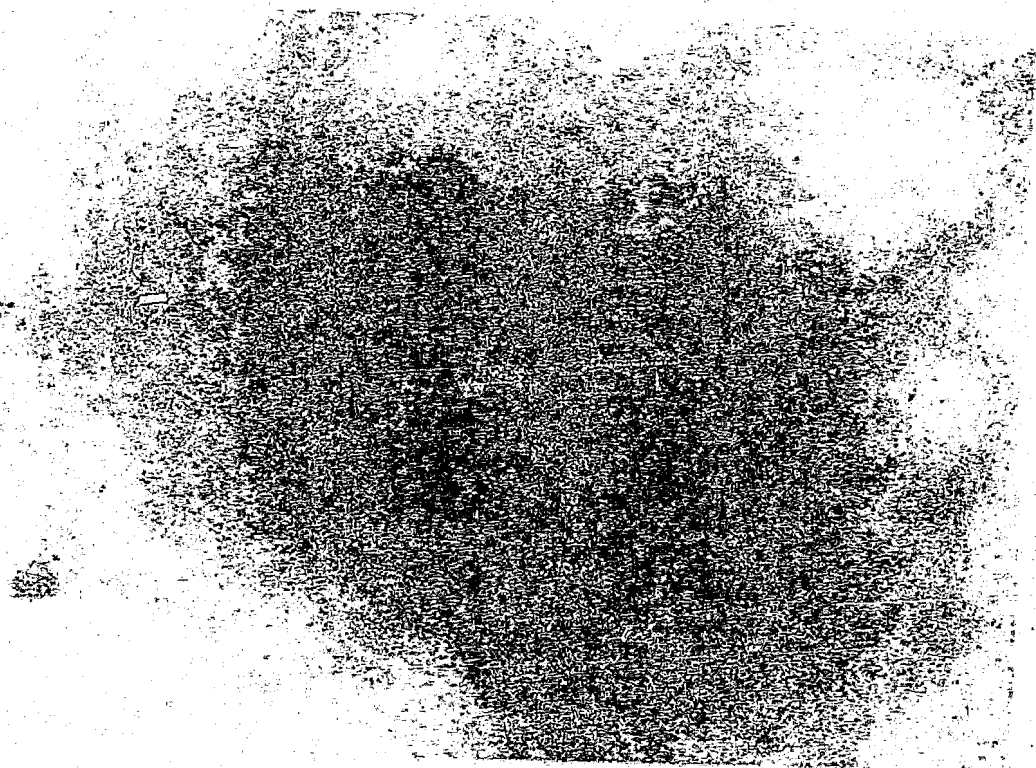
Las muestras que se utilizaron para microscopía electrónica, fueron sometidas previamente a purificación parcial del virus por la técnica utilizada por Bar-Joseph, (1970), esta metodología según reportes del mismo tiene como inconveniente principal la formación de agregados virales, en este trabajo se comprobó lo anterior al ser observados acúmulos aparentemente de naturaleza viral. Foto (11 y 12) sin embargo, la eficiencia del método es demostrada por la presencia de partículas de propiedades fisicoquímicas semejantes a las del virus de la tristeza; aunando la precipitación de dos tipos de fagos de peso molecular y coeficiente de sedimentación menores a los de las partículas asociadas a la enfermedad de la tristeza.

1.- Microscopía electrónica.

Posteriormente a la purificación parcial se procedió al análisis de las muestras por medio del microscopio electrónico en el cual fueron observadas partículas filamentosas, rígidas, de un diámetro aproximado de 6 a 9 nm y de longitud variable, correspondientes a estructuras vegetales; lo cual coincide con lo reportado por Kitajima en 1964.

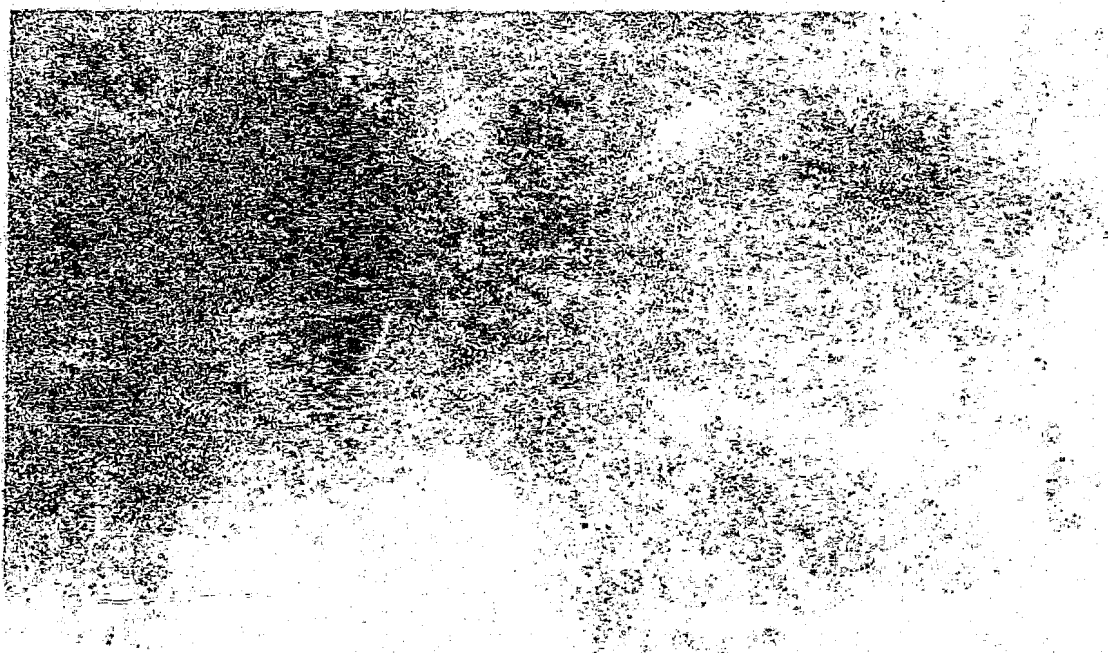
En solo 4 muestras que representa un 2.6% del total, se encontraron partículas flexuosas, aparentemente con una estructura helicoidal, - cuyas características concuerdan con las publicadas por Loebenstein, -- Cohen y Bar-Joseph (1972).

Con el objeto de obtener más datos sobre estas partículas se re-



Fotografía No. 11

Aspecto de los acinulus aparentemente virales, observados -
en extractos parcialmente purificados con polietilenglicol,
procedentes de material vegetativo de Tecomán, Col. 25,000x.



Fotografía No. 12

Virus de la papaya; 25,000x comparese aspecto y tipo de aglomeración con respecto a la fotografía anterior.

recurrió a realizar comparaciones tanto de aspectos como de magnitud de las mismas, tomando como marco de referencia virus de dimensiones conocidas.

Con este propósito se contó con el virus de la papaya que tiene un diámetro de 12 nm y una longitud de 800 nm, además del virus del mosaico del tabaco cuyas dimensiones son de 300 nm de longitud y 17 nm de diámetro, la longitud de la partícula sospechosa se tomó poco en cuenta debido a que por la purificación a que fueron sometidas las muestras -- con frecuencia llegan a romperse, observándose en la mayoría de los casos solo fracciones de las mismas.

Las preparaciones tanto de limón mexicano como las del virus de papaya y tabaco fueron examinadas y fotografiadas a 25,000 X (diámetros) amplificándolas posteriormente a 333,000 X. Foto (13), (14) y (15).

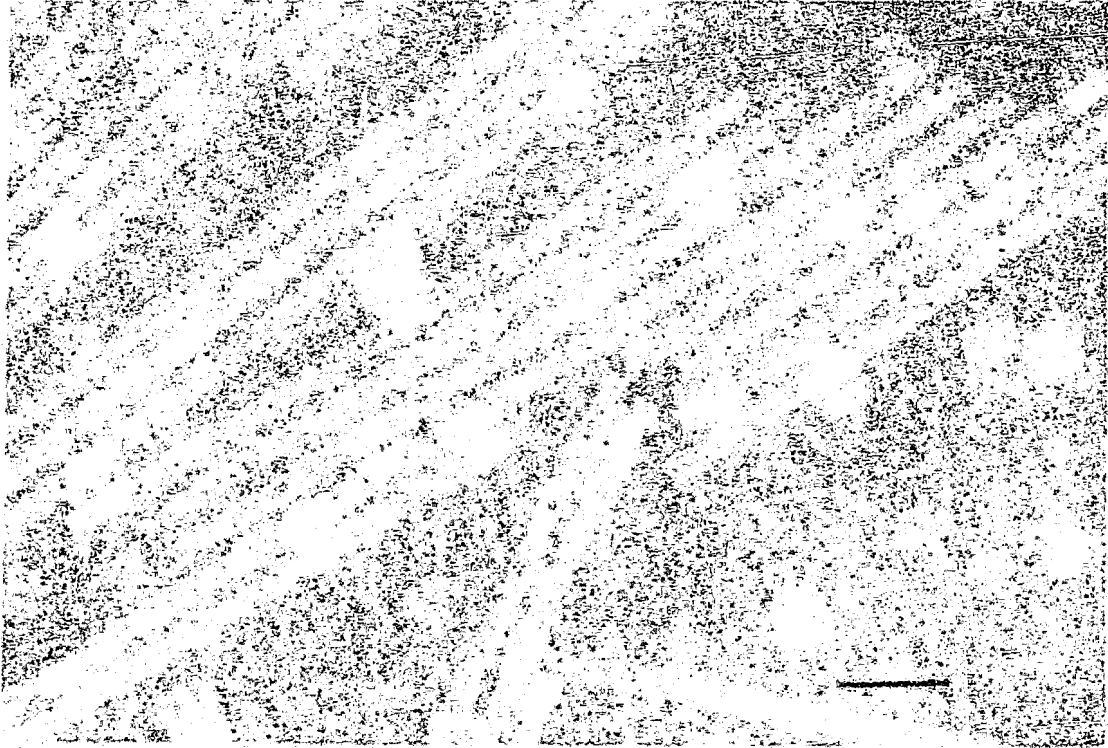
Como puede verse en las fotografías el virus de la papaya a --- 333,000 X tiene una magnitud de 3.33 mm de diámetro.

El virus del mosaico del tabaco al mismo aumento mide 4.66 mm - de diámetro cuya extrapolación corresponde a 17 nm.

Las partículas encontradas en el extracto del limón mexicano alcanzan un diámetro de 3 mm; por lo tanto extrapolando dichas magnitudes con el virus del mosaico del tabaco; los 3.33 mm de diámetro del virus de la papaya corresponden a 12 nm comparando la medida del diámetro de las fibras sospechosas con las de ambos virus esta última cae dentro -- del intervalo de 10 a 12 nm; la cual coincide con la reportada por Kitajima en 1964.

Las evidencias anteriores, así mismo las características de flexuosidad y la aparente subestructura helicoidal de las partículas encontradas; hacen suponer que estas pertenecen al virus relacionado con la enfermedad de la tristeza.

En un 90% de las huertas examinadas se encontraron por lo menos dos tipos de fagos de la serie T, diferenciados entre sí por su tamaño. Foto (9) y (10), evidencias tales como la observación de bacterias fla-



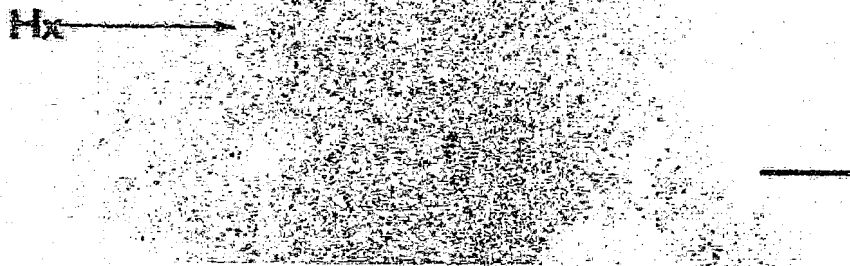
Estadístico No. 17
Virus del mosaico del tabaco
Corte "A" M.



Fotografía No. 14

Virus de la Papaya

Barra = 30 μ m



Fotografía No. 15

Estructuras sospechosas encontradas en material vegetativo
Procedentes de árboles de Tecoman, Col., (hx) aparente subes-
tructura helicoidal.

Barra = 36 μ m.

geladas lisadas, conteniendo gran cantidad de bacteriófagos, hacen suponer que estos son parásitos de las mismas.

2.- Otra técnica usada con el propósito de poner de manifiesto la presencia del virus de la tristeza en los extractos parcialmente purificados, fué el análisis espectrofotométrico en la zona del ultravioleta.

Se esperaba obtener por este método una curva característica de nucleoproteínas con un valor máximo a 260 nm, dado por la presencia de triptofano y un mínimo a 245 nm. Cuñat, Primo (1973).

La gráfica obtenida a partir de los extractos corresponde a proteínas, con un valor máximo a 280 nm y un mínimo a 258 nm. Este método aparentemente revela la ausencia de nucleoproteínas, sin embargo, con tales resultados no debe descartarse la presencia del virus, ya que entre otras causas pudiera suceder lo siguiente:

"Una substancia dará el espectro esperado siempre y cuando ésta, se encuentre homogéneamente distribuida en toda la suspensión"; ahora bien, considerando que la técnica de purificación parcial llevada a cabo, tiene el inconveniente de formar acúmulos virales, por lo que puede pensarse que éstos debido a su peso, tiendan a precipitar y en consecuencia la luz incidente no logra coincidir con dichos grumos; por lo tanto al no detectar las nucleoproteínas no se puede asegurar la inexistencia del virus.

Otro factor importante que se toma en cuenta en esta metodología es la cantidad y pureza de la substancia analizada.

La microscopía electrónica pone de manifiesto una alta concentración de estructuras contaminantes como son; bacterias, flagelos, material bacteriano producto de lisis, bacteriófagos y partículas vegetales y la poca cantidad de fibras sospechosas las cuales pueden ser enmascaradas por las anteriores y obtener así una gráfica de proteínas.

3.- Los cortes histológicos de pedúnculo y peciolo a nivel de tejido floemático teñidos con azur-A, colorante diferencial que pone de manifiesto el floema de un color verde claro, y el xilema de azul, te--

niendo gran afinidad por las inclusiones virales, formados por virus vegetales, las cuales se tiñen de magenta.

En esta fase del trabajo se esperaba observar desórdenes celulares, como zonas de necrosis o inclusiones virales causadas por el virus de la tristeza, que debido a la agrupación y cantidad de las mismas --- absorben una concentración mayor de colorante que el resto de las estructuras celulares sanas, Garnsey (1980).

Por éste método no se lograron los resultados esperados, sin embargo cabe pensar que las técnicas tienen ciertas limitaciones, tomando en cuenta la proporción de tejido analizado (aproximadamente 5 a 6 mm²), con respecto al área total del árbol, lo que repercutirá en la baja probabilidad de encontrar dichas inclusiones. Por otro lado, las inclusiones teñidas alcanzan una magnitud de 1 a 5 micras x 5 a 20 micras, por lo que al microscopio óptico, estas pueden ser confundidas con estructuras celulares o precipitaciones del mismo colorante.

Por lo tanto esta metodología debe aplicarse en el diagnóstico de árboles atacados por razas o cepas fulminantes y moderadas, donde el virus está diseminado en la totalidad del tejido floemático y que por medio de comparaciones entre magnitudes de acúmulos de colorante, coinciden de las mismas al ratificarse con la observación en el microscopio -- electrónico.

Sin embargo, la técnica seguida tiene varias ventajas, siendo -- las principales, la rapidez de diagnóstico, el uso de aparatos no muy -- sofisticados como son: el microscopio óptico, crióstato y microtomo; -- aunando lo económicamente accesible y la relativa facilidad del manejo de los mismos.

CONCLUSIONES.

- 1).- La presencia de bacterias, hongos e insectos con manifestaciones patológicas en un alto porcentaje de los árboles revisados, demuestran la poca actividad de los productos químicos asperjados en las huerta, sin embargo los síntomas de clorosis y defoliación no se atribuyen totalmente a dichos agentes.
- 2).- La eficacia de la técnica de purificación parcial, se confirma al lograr sedimentar o extraer las partículas correspondientes a estructuras vegetales muy similares en sus características químicas y morfológicas a las del virus de la tristeza; además fueron precipitadas fibras aparentemente virales en forma de agregados, lo cual ratifica el inconveniente reportado por el autor de la metodología; con el propósito de disgregar dichos acúmulos, González (1970) recomienda EDTA.
- 3).- Con respecto a las bacterias flageladas observadas, continua el trabajo de identificación de las mismas. Sin embargo sí se asegura que los bacteriófagos de la serie T encontrados, parasitan a las bacterias antes citadas, según observaciones hechas, donde se encuentran cantidades considerables de fagos dentro de los microorganismos y entre productos procedentes de lisis bacteriana.
- 4).- Las evidencias dadas por microscopía electrónica sobre el aspecto flexuoso y la aparente subestructura helicoidal de las fibras encontradas; así mismo la agrupación tan semejante de éstas, respecto al virus de la papaya, y las magnitudes obtenidas a través de la extrapolación con el virus del mosaico del tabaco y el de la papaya, se llega a la conjetura de que las partículas sospechosas pueden pertenecer al virus de la tristeza; a pesar de lo antes dicho no se afirma la naturaleza de las mismas, hasta haber realizado un estudio más intenso con el objeto de llegar a la caracterización completa de las mismas, en tal caso es necesario llevar a cabo técnicas de purificación por ultracentrifugación en gradiente de densidad y pruebas serológicas.
- 5).- La espectrofotometría en el UV y las técnicas histológicas no aportó datos favorables que confirmen la presencia del virus; sin embargo se -

hace incapié de introducir a la purificación parcial, una segunda purificación con el fin de eliminar las estructuras contaminantes.

6).- Por todo lo antes mencionado y principalmente lo expuesto en el inciso 4 de este capítulo, cabe suponer que si las partículas sospechosas corresponden al virus de la tristeza, éste, se está presentando en complejos débiles debido a que en nuestro país no se ha manifestado la enfermedad con resultados devastadores; sin embargo, si la suposición resulta positiva, es importante establecer la ruta de entrada de estos complejos, el tiempo en que lo hicieron y de ser posible la variedad de cítricos que usaron como portador, previendo la posibilidad de que con éstas, se hayan introducido cepas moderadas o fulminantes en huéspedes tolerantes a ellas, que posteriormente se manifiesten al propagar masivamente el empleo de injertos, esencialmente si se utiliza el limón mexicano sobre naranjo agrio, combinación altamente susceptible a la enfermedad de la tristeza.

7).- Los beneficios que pueden ofrecer los complejos débiles, son: la protección cruzada en los árboles contra cepas más agresivas, además de la obtención de sueros específicos como medio de diagnóstico para la enfermedad de la tristeza.

APENDICE

ESQUEMA DE PURIFICACION PARCIAL

1)

Pulverizado de Corteza

Pulverizado de Hojas

pH 7.4

Suspender en amortig. frio de tris (hidroximetil) amino ametano-HCl 0.05 M (12 ml/gr). Filtrar a través de algodón, centrifugar el filtrado a baja velocidad, 5000 g por 10 minutos, rotor usado GSA.

pH 8.4

Sedimento

Sobren.

Sobren

Sedimento

a 100 ml añadir 4 g PEG y 4 ml NaCl 20% centrifugar 15 min. a 19,600 g Rotor usado GSA.

Sobren.

Sedimento

Resuspender en amortiguador de fosfato 0.04M pH 8.2 a 1/4 del volumen original (25 ml). Centrifugar a baja velocidad, 4,400 g por 10 minutos, rotor usado SS-34.

Sedim.

Sobrenadante

Por cada 25 ml añadir 0.5 g de PEG y 0.6 ml NaCl al 20% Centrifugar 15 min a 20,000 g. rotor usado SS-34.

Sobren.

Sedim.

Resuspender en 3-4 ml de amort. de fosfato 0.15 pH 8.2 Centrifugar 10 min. a 5,000 g. rotor -- usado SS-34

Sedim.

Sobren.

(Susp. de partículas parcialm. purif.)

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

II) Tinción negativa de los virus con ácido fosfotúngstico.

- I) Preparación de las rejillas cubiertas con película de formvar.
Solución de formvar (0.2 g de Formvar + 86 ml de 1-2 Di-CLORO ETANO), Filtrar la solución antes de usarla.

III) Preparación de película de Formvar:

- a) Lavar con jabón de tocador cuatro portaobjetos, secarlos con Kleenex y terminar de secar en el horno a 40°C.
 - b) Una vez secos, limpiar los portaobjetos con papel que no desprenda pelusa. Manipular los portaobjetos por los bordes.
 - c) Introducir el portaobjeto en un vaso kouplin que contenga la solución de formvar, secarlo y dejar secar a temperatura ambiente.
 - d) Una vez que se ha secado la solución de formvar, cortar la película formada por los lados y extremos del portaobjeto.
 - e) Tener listo el cristizador con agua bidestilada hasta los bordes, sumergir lentamente el portaobjeto, observando que la película se desprenda por la tensión superficial del agua.
 - f) Una vez desprendida la película depositar sobre ella las rejillas y después, recogerlas con un papel filtro.
 - g) Poner a secar, de preferencia en el horno a 40°C.
- 2) Sombreado de rejillas con carbón evaporado.
 - a) Prender evaporadora hasta que alcance un vacío de 10^{-5} mm Hg.
 - b) Colocar barras de carbón en los electrodos.
 - c) Colocar rejillas en el disco giratorio, de tal forma que el carbón se deposite sobre la película de formvar.

- d) Aplicar corriente eléctrica: de 10-30 amperes.
- e) Los carbones se observarán incandescentes y desprenderán carbón el cual caerá sobre las rejillas.

3) Aplicación de la muestra y tinción.

- a) En una caja petri con papel filtro, humedecido previamente con 1-2 Di-cloroetano, colocar las rejillas y dejarlas durante 10-15 minutos, para disolver la capa de formvar.
- *b) Someter las rejillas a un arco voltaico (120 volt. x 30 segundos en el vacío), para hacerlas hidrofílicas y tener una mejor distribución de la muestra.
- c) Poner 5-10 ml de una muestra sobre la rejilla, dejar un minuto y secar con papel filtro teniendo cuidado que la muestra - continúe húmeda.
- d) Poner una pequeña gota de ácido fosfotúngstico al 2%, neutra lizado con KOH 1% inmediatamente antes de usar.

Dejar un minuto y secar con papel filtro CUIDANDO QUE LA REJILLA NO SE SEQUE TOTALMENTE.

- e) Observar en el microscopio electrónico.

*Puede reemplazarse con alcohol absoluto.

IV) TECNICA DE INCLUSION EN PARAFINA.

Las muestras de pecíolo y pedúnculo se cortan de un tamaño aproximado de 1 cm.

- 1.- Fijación: Los cortes fueron fijados en solución FTPA (Formol-AC. propiónico-Alcohol) durante 24 a 48 horas. Posteriormente se lavan en 2 cambios de etanol al 50% por dos horas; los cortes se transfieren a una solución de ácido fluorhídrico al 25% (solución ablandadora) durante 3 semanas.
- 2.- Deshidratación: Los cortes se pasan por alcoholes porcentuales empezando por etanol al 50%, 70% y 96% y absoluto durante 15 minutos cada una.
- 3.- Los cortes se transfieren a una solución aclaradora de xilol al 70% posteriormente en una al 100% durante 15 minutos en cada una.
- 4.- Infiltración: En parafinas porcentuales empezando por una al 30% a 29-32°C durante 24 horas, después al 50% a 35°- 40°C, durante 24 horas, por último en parafina pura a 56-58°C durante 24 horas.
- 5.- Inclusión: El material impregnado, se coloca en un molde con teniendo parafina pura fundida a 58°C.
- 6.- Recorte de las muestras: Se lleva a cabo con un microtomo de ro tación o de Minot, haciendo cortes de 10, 15 y 20
- 7.- Montaje de las cintas: En portaobjeto, utilizando el adhesivo de Houp se pone una película de adhesivo en el portaobjeto, se depositan las tiras cortadas y se pasa momentáneamente a la flama de un mechero de alcohol.
- 8.- Se remueve la parafina por medio de 2 cambios en xileno 15 minutos cada uno, después se pasa por cambios de alcohol.

absoluto -- 10 minutos

96% -- 10 minutos

80%

70% -- 10 minutos

50%

V) TECNICA DE CORTES EN CRIOSTATO.

- 1.- Las muestras se cortan en trozos de 1 cm aproximadamente.
- 2.- Los cortes se colocan en la platina del criostato.
- 3.- Se realizan los cortes a un espesor de 5 a 8 μ , éstos se depositan en agua destilada para practicar la tinción.

TINCION.

- 1.- Los cortes se pasan a un amortiguador de fosfatos 0.2 M -- pH=7.2, se prosigue la tinción usando para cortes incluidos en parafina.

VI) TINCION Y MONTAJE DE LOS CORTES.

Los cortes ya fijados en el portaobjeto se tiñen con Azur-A al 1% en 2 metoxietanol, durante 24 horas, posteriormente se destiñen con etanol al 96% durante 1 minuto y por último se montan en resina sintética o euparal.

BIBLIOGRAFIA CITADA.

- 1.- Bar-Joseph, M.G. Loebenstein. And J. Cohen. Partial purification of viruslike particles associated with the virus tristeza disease. 1970. *Phytopathology*. 60:75-78.
- 2.- Bar-Joseph, M.G. Loebenstein. and J. Cohen, Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease. 1972, *Virology*, 50:821-828.
- 3.- Bar-Joseph, M. and G. Loebenstein. Effects of strain, source plant and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. 1973, *Phytopathology*. --- 63:716-720.
- 4.- Carrera, C. 1930. De: *Citricultura moderna*, Jorge Palacios Editorial Hemisferio Sur, edición 1978: 219-223.
- 5.- Carrera, C. Informe preliminar sobre una enfermedad nueva comprobada en los cítricos de Bellavista (Corrientes) Argentina. -- 1933. *Min-Agr. Bol.* 37: 15-37.
- 6.- Costa, A.S. Situación actual de la tristeza de los cítricos en Sudamérica. 1956, *Bol. Fit. FAO.* 7: 97-105.
- 7.- Costa, A.S. y T. Grant, Investigoes sobre a tristeza dos cítricos - *Bragantia*. 10: L: 49:59.
- 8.- Del Castillo, T.M. Memoria del seminario de citricultura efectuado en Monterrey, N.L. 1979 editado por Banco de México, -- S.A. F.I.R.A. de Agricultura.
- 9.- Fawcett, H.S. 1940 De: *Citricultura moderna*, Jorge Palacios; Editorial; Hemisferio Sur, edición 1978:219-223.

- 10.- Fawcett, H.S. y A.A. Bitancourt. 1937. De: Citricultura Moderna, - Jorge Palacios; Editorial; Hemisferio Sur, edición 1978: 219 - 223.
- 11.- Fraser, L.R. The relation of seedling yellows. In citrus virus disease 1959. J.M. Wallace, ed. University of California.
- 12.- Kitajima, E.W. 1960, Pub en 1961. Empleo de un pulverizador de Presao para obtencao de exudatos de plantas. Bragantia 20: 23 - 24 IOCV.
- 13.- Kitajima, E.W., D.M. Silva, A.R. Oliveira, G.W. Muller y A.S. Costa 1964 Nature 201, 1: 1011 - 1012.
- 14.- Kitajima, E.W., D.M. Silva, A.R. Oliverira, G.M. Muller y A.S. Costa Electron Mucroscopical Investigations of tristeza. Proc Conf. Intery. Organ. Citrus virol. 3ths 1963: 1-9
- 15.- Meneghini, M. Sobre a natureza e transmissibilidade de doenca -- "tristeza" dos citris. 1946, O Biologico 12: 285 - 287.
- 16.- Moreira, S. 1937. De: citricultura moderna, Jorge Palacios, editorial; Hemisferio Sur, edición 1968: 219 - 223.
- 17.- Planes, S.E., González-Sicilia y F. Marti. Studies on citrus virus diseases. 1965. In Price (ed) Proc. 3th. conf. Intern. - organ. citrus virol. Univ. Flo Press.
- 18.- Price, W.C. Flexuos rods in phloem cells of lime plants infected -- with citrus tristeza virus. 1966. Virology 29: 285 - 294
- 19.- Primo, E., E. Hernández, M. Martínez, P. Cufat y R. Vila. diagnósti co. Precoz de la tristeza del naranjo. Separación y reacciones serológicas de las particulas nucleoproteicas. -- 1971. Rev. A.T.A.: 11 - 12.

- 20.- Primo, E., P. Cuñat, R. Garro y E. Hernández. Virosis de los cítricos, características de las partículas filamentosas aisladas de cítricos afectados de tristeza. 1973. I.A.T.A.- Vol 13: 288 - 294.
- 21.- Silva, D.M., A.R. Oliveira and E.W. Kitajima, partial purification of tristeza virus. 1965. Proc. 3th, Conf. Intern. Organ citrus virol. (EOCV) 1963: 10 - 13.
- 22.- Wallace, J.M., P.C.J: Oberholzer and J.D.S. Hofmeyer. Distribution of virus of tristeza and other diseases of citrus in -- propagative material. Plant disease; Repr. 1978 40: -- 1 - 10.
- 23.- Garnsey, S.M., R.G. Christie, K.S. Derrick and M. Bar-Joseph, Detection of citrus tristeza virus. II. Light and electron - microscopy of inclusions and virual particles. 1980 -- Proceedings of the 8th conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).