

Obtención de un anticuerpo contra la proteína p65 del virus de la tristeza de los cítricos y resultados preliminares de la expresión *in vivo*

Obtaining a citric tristeza virus p65 protein antibody and preliminary results of p65 *in vivo* expression

Yanneth Torres*, Mónica Guzmán* *, Orlando Chaparro* **, Ócar Oliveros* **, Orlando Acosta*, José Peñaranda*(q.e.p.d)

RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) pertenece a la familia Closteroviridae que incluye a los únicos virus vegetales que poseen en su genoma genes homólogos a las proteínas de choque térmico celulares HSP70. Recientemente se ha demostrado que las proteínas virales HSP70h, como la p65 de CTV, realizan funciones para el ensamblaje del virión, como proteína de unión a microtúbulos y de movimiento célula a célula. De allí la importancia de desarrollar trabajos relacionados con esta proteína en el CTV, considerado el patógeno más deletéreo para los cítricos. En el presente estudio, fueron utilizados cuatro péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxi-terminal de la proteína de choque térmico p65 del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), para inmunizar conejos con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales. Todos los péptidos utilizados fueron inmunogénicos. Ninguno de los anticuerpos obtenidos reaccionó contra el extracto de plantas no infectadas pero sí detectaron las proteínas p65 presentes en los extractos proteicos de cítricos infectados con el CTV. Se demostró un comportamiento inmunológico del anticuerpo anti p65 que parece ser independiente de la severidad sintomática del aislado de CTV utilizado, sobre la base de la exposición del anticuerpo a dos aislados colombianos con características serológicas diferentes. Se demostró que el ORF que codifica en el CTV para el homólogo de la HSP70 se expresa *in vivo* aunque el anticuerpo anti p65 solamente detectó extractos proteicos concentrados de plantas infectadas, lo que apoya lo informado en otros estudios sobre la baja concentración de esta proteína en plantas infectadas con el CTV. Es la primera vez que se obtiene en Colombia un anticuerpo policlonal anti CTV y, particularmente, contra p65, proteína que interviene en el ensamblaje y movimiento viral. La adaptación de una técnica de obtención de anticuerpos anti p65 a través de la utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos podría ser útil en un futuro para la detección o diagnóstico de proteínas p65 presentes en diversos aislados colombianos de CTV y, especialmente, para desarrollar estudios que aporten mayor comprensión sobre la biología viral, su control y la relación con el huésped.

Palabras clave: virus de la tristeza de los cítricos, proteína de choque térmico, anticuerpos.

ABSTRACT

The citric tristeza virus (CTV) belongs to the Closteroviridae family which includes the only vegetal viruses possessing genes homologous to HSP70 thermal cellular shock proteins in their genome. Such is the case of the gene encoding for the CTV p65 protein which presents high homology with the HSP70 protein family. It has been shown recently that HSP70h viral proteins (such as CTV p65) are involved both in viral assembly, as a microtubule binding protein, and in cell-cell movement. Since CTV is the most deleterious citrus pathogen, understanding this protein's role in the pathogenesis process is important. Rabbits were immunised with four synthetic peptides (corresponding to CTV p65 thermal shock protein's carboxyl-terminal region) to obtain polyclonal antibodies. All the peptides used were immunogenic, even though two of them showed greater response. Whilst none of the antibodies obtained reacted to non-infected plant extract, the p65 proteins was detected in extracts taken from citric plants infected with CTV. Based on the antibody's reaction to two Colombian isolates having different serological characteristics, the p65 antibody's immunological behaviour appeared to be independent of the symptomatic severity of the CTV isolates. It was shown

* Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

**Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.e mail: mmguzmanb@unal.edu.co

*** Centro Internacional de Física.

Recibido: Febrero 10 de 2003. **Aceptado:** Octubre 3 de 2003.

that the ORF encoded for the HSP70 homologue in CTV was expressed *in vivo*, even though the p65 antibody was only detected in concentrated protein extracts taken from infected plants, supporting reports from other studies that the concentration of this protein in plants infected with CTV is low. This is the first time that a polyclonal CTV antibody has been obtained in Colombia against p65 (a protein intervening in viral assembly and movement). Adapting a technique for obtaining p65 antibodies by using synthetic peptides as immunogens could be useful in the future for detecting or diagnosing p65 proteins present in different Colombian CTV isolates, especially in developing studies contributing towards greater understanding of viral biology, their control and relationship with the host.

Key words: citrus tristeza virus, heat shock protein, antibodies.

INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el patógeno causante de una de las enfermedades más importantes para los agrios (géneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*) y ha ocasionado la muerte de por lo menos 60 millones de árboles (Roistacher y Moreno, 1991). El CTV es el closterovirus más largo que infecta a las plantas (2000 nm de largo por 11 nm de ancho) y se localiza en el floema, lo que puede llevar a la necrosis de los vasos conductores y a la muerte de la planta (Bar-Joseph *et al.*, 1985). En Colombia hay sembradas en cítricos unas 40.000 hectáreas aproximadamente y se ha estimado una incidencia del virus mayor del 90% (Peñaranda *et al.*, 1995). El virus muestra una amplia variabilidad biológica, como el acanalamiento de tallo, el declinamiento rápido y el amarillamiento de las plántulas, entre otras características (Bar-Joseph *et al.*, 1989). En la naturaleza los aislados virales pueden presentarse como un complejo de cepas, con distribución de quasiespecies (Moreno *et al.*, 1990; Hilf *et al.*, 1998; Oliveros *et al.*, 2001; Brlansky *et al.*, 2001). La partícula viral está constituida por un RNA de cadena sencilla, de sentido positivo, que contiene 19.296 pb y está encapsidada por dos proteínas (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Febres *et al.*, 1996; Karasev *et al.*, 1997). El genoma codifica para por lo menos 17 proteínas dentro de las cuales se incluye la proteína de choque térmico p65, homóloga de la proteína celular de choque térmico HSP70 (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995). Es de anotar que hasta el momento, dentro de los virus vegetales, solamente se ha demostrado la presencia de proteínas de choque térmico (HSP70h) en la familia Closteroviridae (Germán-Retana *et al.*, 1999). Las proteínas HSP70h participan en una gran variedad de funciones (Agronovsky *et al.*, 1991; Craig *et al.*, 1993) como proteína de unión a microtúbulos (Karasev *et al.*, 1992) en el ensamblaje del virión (Satyaranayana *et al.*, 2000), como proteína de unión a canales intercelulares (Alzhanova *et al.*, 2000) y como proteína de movimiento célula a célula (Medina *et al.*, 1999; Peremyslov *et al.*,

1999., Napuli *et al.*, 2000). Se propone entonces una función dual de las HSP70h chaperonas virales tanto en el ensamblaje como en el transporte, lo que permite sugerir un modelo para el movimiento célula a célula en closterovirus (Alzhanova *et al.*, 2000). También se ha publicado la secuencia parcial (7292 pb) de la Hsp70 de CTV (Pappu *et al.*, 1994).

Para el diagnóstico y la caracterización del CTV se han obtenido diferentes anticuerpos contra las proteínas de la cápside (Permar y Garnsey, 1990; Mikolaeva *et al.*, 1997; Peroni *et al.*, 2001), pero solamente se ha informado un trabajo sobre la obtención de anticuerpos anti p65, (Rosales *et al.*, 2001). Para otro closterovirus, el virus del amarillamiento de la remolacha (BYV), la secuencia de la porción carboxi terminal de p65 no posee epítopes compartidos con las HSP70 celulares, proteínas conservadas en su porción amino terminal (NH₂) y variables en la región carboxiterminal (COO⁻) (Karasev *et al.*, 1995; Agronovsky *et al.*, 1997); por tanto, es posible utilizar péptidos específicos de p65 de CTV como inmunógenos. De otra parte, se sabe que la mayoría de péptidos sintéticos de más de 6 aminoácidos dan una buena respuesta inmunogénica que es interesante pues se pueden generar anticuerpos contra una región proteica específica (Kyte y Doolittle, 1982; McCallion *et al.*, 1996).

En el presente trabajo se exponen los resultados de la obtención de anticuerpos policlonales contra la p65 utilizando péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxi terminal de la proteína. Así se evitan reacciones cruzadas del anticuerpo con las proteínas del huésped puesto que existe una baja homología con las chaperonas celulares HSP70. Del mismo modo se presentan resultados preliminares que demuestran la expresión *in vivo* del gen p65. El uso de la estrategia de péptidos sintéticos permite contar con un anticuerpo para la detección de p65 en diferentes aislados colombianos infectados con el CTV, y permitirá en el futuro ampliar la caracterización serológica del virus, evaluar

la expresión del gen en plantas transgénicas realizando el seguimiento con el anticuerpo anti p65, y evaluar la expresión del gen p65 para regular el ensamblaje del virión y el transporte viral en la planta.

METODOLOGÍA

Para la obtención de anticuerpos policlonales se siguieron en general, las metodologías descritas por Kyte y Doffield (1982) y Ball *et al.* (1993).

Selección de los péptidos

Teniendo en cuenta un grupo de 10 péptidos candidatos de la región correspondiente a los últimos 200 aminoácidos de la secuencia de p65 (Pappu *et al.*,

1994), se escogieron cuatro péptidos de 15 residuos cada uno con baja hidrofobicidad. Las secuencias de los péptidos se compararon con secuencias reportadas en el banco de datos, encontrándose homología solamente con la proteína p65. La figura 1 presenta en negrilla la posición de los péptidos usados como inmunógenos, dentro de la secuencia p65.

Los péptidos fueron producidos en el Instituto Nacional de Inmunología de Colombia mediante síntesis en fase sólida. Péptido 2: MFFGDYKVFERNERI correspondiente a la posición 429 - 443; Péptido 4: EFYKKGPSGELVNVQ en posición 478-492; Péptido 6: TLTREKREKFLRL en posición 527 - 541; Péptido 8: TRNDIDVVSSRMGIV en posición 564 - 578.

MVLLGLDFGTTTFSTVAMATPSELVILKQSNSSYIPTCLLLHAEPNSVSYGYDAEYLAA	58
SGESGSFYKDLKRWVGCTAKNYQTYLHKLSPSYKVVIVKEFGTKSVVPYLSPLNNDLG	116
LSVALPSLIASYAKSILSDAERVFNVSTGVICSVPAGYNLQRAFTQQSISMSGYSC	173
VYIINEPSAAAAYSTLPKLNADKYLAVYDFGGGTFDVSIVSVRLPTFAVRSSSGDMNL	232
GGRDIDKKLSDKIYEMADFPQKELNVSSLKEALSQTDPVKYTVNHYGMSETVSDIQ	290
TVLREIASVFINRTIDILTQVKVKSSMPESQSLKLVVVGSSYLPGLLDALATVPFVS	347
GIVPVEDARTAVARGCALYSECLDGRSKALLIDCITHHLSVTTFSADSVVVAAGSPI	406
PFEGERKLTLRKCVSTSNYQARM FEGDYKVFERNERI YAASVSLFTLGVNWSVPNDVE	464
MTLVTKVDSMGK EFYKKGPSGELVNVQ GTSHYDYADMPHPPRKLVRVLSDYNVNSAAL	521
VLALTLTREKREKFLRL FDL ADLRKTASLSEYSKK YPITRNDIDVVSSRMGIVV	577
SKVLRGSDLERIPL*	591

Figura 1. Posición de los péptidos usados como inmunógenos dentro de la secuencia de p65.

Selección del transportador y acople químico

Los haptenos se acoplaron a la albúmina como proteína transportadora soluble (Bovine Serum Albumine) que posee 59 lisinas, de las cuales 30 a 35 están disponibles para acople. El acople del péptido sintético a la albúmina se realizó con glutaraldehído, reactivo de acople bifuncional que une dos compuestos a través de sus grupos amino. Siguiendo la metodología de Ausabel (1992), básicamente se pesaron cantidades iguales (relación 1:1, peso/peso) de BSA (Fracción V) y de péptido y se disolvieron en 2 ml de buffer fosfato salino (PBS). Se adicionó lentamente una solución al 0.2% de glutaraldehído en PBS con agitación constante en cámara extractora. Se incubó con agitación durante 14 horas a temperatura ambiente y se añadió glicina a una concentración final de 200 mM en PBS (pH 7.2). Se incubó con agitación una hora y se realizó la diálisis contra PBS durante 24

horas con 4 cambios de buffer. Se midió la concentración del inmunógeno por medio de espectrofotometría utilizando BSA como estándar.

Rastreo y purificación del anticuerpo

Dos conejos de doce semanas se inmunizaron por vía intramuscular, inicialmente con una emulsión de 300ug de antígeno (mezcla de los péptidos -BSA) y 500 ul de coadyuvante completo de Freud; posteriormente, 3 veces más con intervalos de 20 días utilizando 300ug de antígeno mezclado con adyuvante de Freud incompleto. La respuesta se monitoreó mediante *dot blot* en membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm. El suero extraído después de la primera y segunda inyecciones se ensayó contra el hapteno usado en la inmunización. Como control se utilizó el suero preinmune (2 ml de suero del conejo previo a la inmunización). Después de sangrar los conejos y centrifugar la sangre a

6.000 rpm durante 30 minutos, los anticuerpos se precipitaron con sulfato de amonio, mezclando 2 a 4 horas con agitación constante a 4°C, en un volumen de solución SAS pH 7.0 (Tris 0.01 M, pH 7.0 y 767g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) en PBS con dos volúmenes de la mezcla que contenía los anticuerpos. Luego de centrifugación durante 20 minutos a 12.000g, se lavaron con SAS al 33% en PBS pH 7.0 según el volumen inicial de precipitado. Posteriormente se disolvió el pellet en PBS frío utilizando vórtex suave y se dializó la solución que contenía los IgG durante 48 h a 4°C contra 4 cambios de buffer.

Especificidad de la respuesta y determinación del título de IgG

Diez días después de cada inyección se tomó 1 ml de sangre de la vena marginal de la oreja de los conejos. El suero se ensayó contra el mismo péptido usado en la inmunización. Un μg de antígeno se colocó en la membrana de nitrocelulosa, se incubó en buffer de bloqueo (PBS-gelatina 2%), se trató con antisuero anti p65 y posteriormente con un anticuerpo anticonejo acoplado a la fosfatasa alcalina (GAR, Sigma) y se reveló con el substrato Nitro Blue tetrasodium/bromo-cloro-indol-fosfato (NBT/BCIP). La especificidad de la respuesta de los sueros preclarificados (absorbidos con BSA) o no preclarificados, así como del suero control, se examinó por medio de *dot blot* contra el inmunógeno y contra extractos de plantas no infectadas e infectadas con el CTV que presentaban sintomatología suave (M79) o severa (A22) según su reacción serológica con el anticuerpo monoclonal de la Florida MCA 13.

El suero anti p65 de CTV obtenido de una cuarta inmunización, inactivado y parcialmente purificado por precipitación con sulfato de amonio también se preabsorbió con BSA para determinar el título del mismo, mediante un *dot blot*. El suero tratado se ensayó contra extractos de planta infectada con CTV y de planta sana como control, además contra BSA y el inmunógeno. Para la valoración del título, se utilizaron diferentes diluciones del antisuero puro o en diluciones de 1: 100; 1: 500; o hasta 1: 1000. Además se valoró el suero preinmune.

Detección de la proteína p65 por medio de Western Blot

Se preparó un extracto enriquecido de proteínas de cítricos infectados y sanos, las cuales se precipita-

ron con acetona. En resumen, a 60 g de tejido pulverizado en nitrógeno líquido se le adicionaron 30 ml de buffer de extracción (PBS más 0.5% de Tween 20). La mezcla se dejó reaccionar 30 minutos en agitación constante a 4°C. Después de centrifugación a 8.000 g durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se añadieron inhibidores de proteasas (aprotinina a concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 200 mM de PMSF). Las proteínas extraídas se precipitaron mezclando volúmenes iguales de acetona fría y solución de proteína durante 30 minutos a 4°C. La mezcla se centrifugó 15 minutos a 12.000g. El pellet se resuspendió en PBS. La muestra se enriqueció al concentrarla 50 veces mediante filtración por centrifugación con un Centricon 10.

Veinte microlitros (20 μl) de proteína total o extractos enriquecidos de proteínas totales de plantas infectadas (M79 y A22) y de plantas sanas se corrieron en condiciones desnaturalizantes en un gel discontinuo de poliacrilamida (SDS-PAGE) en un gradiente de separación de 10% y de concentración de 5%, según la técnica de Laemmli (1970). Antes de cargar las muestras, se añadió mercaptoetanol al 0.5% y se incubaron a 37°C durante 60 min. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm utilizando un sistema semiseco (SIGMA semi dry system). Las membranas se lavaron con PBS y se incubaron una hora a 37°C en buffer de bloqueo (PBS-gelatina 2%) y se trataron con una dilución 1: 250 del anticuerpo anti p65 durante 2 h a 37°C. Un anticuerpo GAR (SIGMA) en dilución 1:15.000 se utilizó conjugado a la fosfatasa alcalina. La banda correspondiente a la migración de p65 se detectó con el substrato de la fosfatasa alcalina Nitro Blue tetrasodium/bromo-cloro-indol-fosfato (NBT/BCIP).

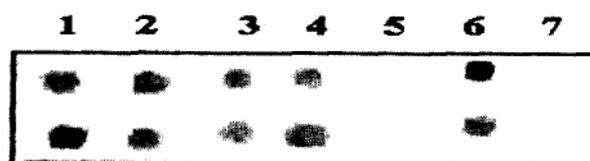


Figura 2. Detección por *dot blot* del suero clarificado anti p65 de CTV.

Dot blot suero de tercera inmunización con péptidos sintéticos preabsorvidos con BSA. El conjugado a la fosfatasa alcalina (dilución 1:15.000). Substrato NBT/BCIP. Línea 1: péptido 2; carril 2: péptido 4; línea 3: péptido 6; línea 4: péptido 8; línea 5: extracto de planta no infectada; línea 6: extracto de planta infectada con CTV; línea 7: BSA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El suero extraído después de la primera y segunda inoculaciones se ensayó contra el mismo péptido utilizado en la inmunización, teniendo como control el suero preinmune. En la figura 2 se presenta la respuesta del antisuero contra el inmunógeno.

Se observa una clara reacción de reconocimiento del anticuerpo anti p65 con cada uno de los péptidos sintéticos utilizados como antígenos. Durante la inmunización se generaron anticuerpos dirigidos contra la proteína transportadora, por lo que estos se removieron para que no enmascarara la respuesta específica. Los antisueros se preclarificaron mediante una preabsorción con BSA. La especificidad de la reacción se muestra en las líneas 1-4 donde se utilizó cada uno de los péptidos por separado. Igualmente, se observa una reacción positiva cuando se expuso el anticuerpo al extracto proteico de plantas infectadas con el CTV. La línea 7 muestra la reacción antigénica leve a negativa contra el BSA después de la preclasificación. El suero preinmune no mostró reacción contra los péptidos examinados ni contra la albúmina.

Algunos de los péptidos sintéticos mostraron ser más inmunogénicos que otros, seguramente por la cantidad o calidad de aminoácidos hidrofílicos o hidrofóbicos presentes en cada uno de ellos o por diferencias en la eficiencia de unión a la proteína transportadora o por característica intrínseca de cada secuencia de nucleótidos en cada peptido particular.

Por otra parte, en la determinación del título del anticuerpo se observó reacción positiva cuando se utilizó el antisuero puro o cuando se utilizaron diluciones de 1: 100; 1: 500 o hasta 1:1000. Sin embargo, ninguna de las muestras reaccionó con el suero preinmune utilizado como control (figura 3).

También los anticuerpos anti p65 obtenidos con los cuatro péptidos sintéticos se probaron en extractos de plantas infectadas con dos aislados de CTV, determinados como suave (M79) y severo (A22),

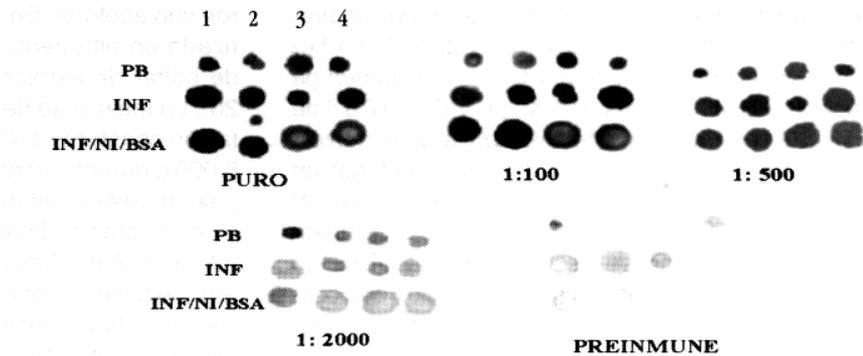


Figura 3. Reacción positiva del antisuero puro y en diferentes diluciones 1: 100; 1: 500; 1:2000 y la condición preinmune. Fila 1: PB = péptidos acoplados; línea 1: péptido 2; línea 2: péptido 4; línea 3: péptido 6; línea 4: péptido 8. Fila 2: INF: Líneas 2 a 4: extracto enriquecido de planta infectada. Fila 3: INF/NI/BSA. Líneas 1 y 2: extracto enriquecido de planta infectada; línea 3: extracto enriquecido de planta no infectada; línea 4: BSA.

sobre la base de resultados previos con el anticuerpo MCA 13 que discrimina entre cepas suaves y se veras con un 95% de confiabilidad. Sin embargo, los anticuerpos anti p65 obtenidos no discriminaron entre los aislados de CTV de plantas sintómicamente diferentes (figura 4).

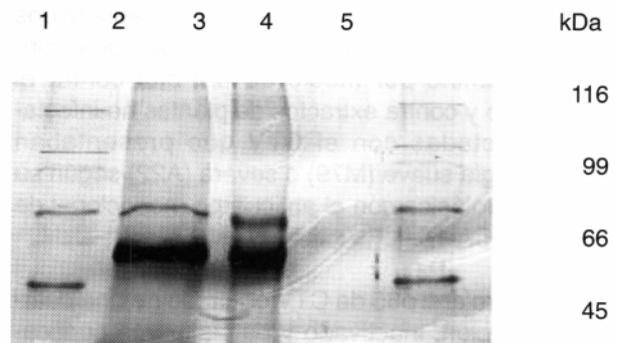


Figura 4. Inmunodetección de p65 en aislados suaves y severos de CTV.

Extractos proteicos totales de plantas infectadas con CTV fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti p65 de CTV y separados en SDS-PAGE 100 V constantes. Tinción con plata. Líneas 1- 5: marcadores de peso molecular. Línea 2: extracto infectado con aislado suave. Línea 3: extracto infectado con aislado severo. Línea 4: extracto de planta sana.

En los extractos proteicos purificados provenientes de cítricos infectados con aislados suaves o severos de CTV se detectó por western blot una proteína de 65kDa que reaccionó con el anticuerpo anti p65 (figura 5), lo que demuestra la expresión *in vivo* del ORF p65 (HSP70h).

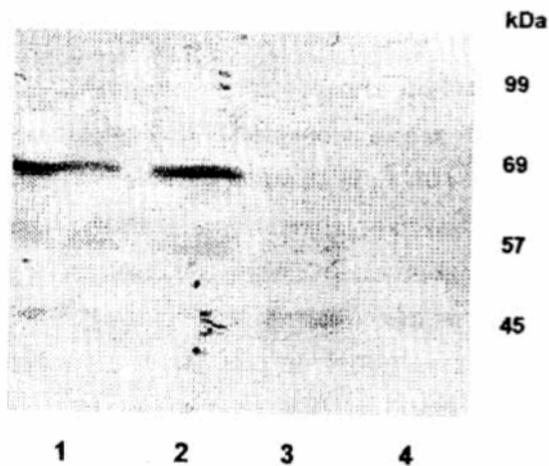


Figura 5. Detección de la proteína purificada p65 con el anticuerpo p65 proveniente de plantas infectadas con CTV. *western blot*, detección con NBT/BCIP. Línea 1: proteína purificada de aislado suave; línea 2: proteína purificada de aislado severo; línea 3: marcador de peso molecular; línea 4: proteína purificada de planta sana.

Es importante tener en cuenta que con la técnica de *Western blot* solamente se detectó la proteína p65 en aquellos extractos proteicos enriquecidos o concentrados, lo cual sugiere que la cantidad de proteína p65 en las células infectadas es muy baja. Lo anterior puede explicarse por bajos niveles de traducción de la misma o por inestabilidad postraduccional. De hecho Medina *et al.* (1999) y Tian *et al.* (1999) indican que la producción de p65 en closterovirus es baja. Napuli *et al.* (2000) también apoyan estas observaciones al demostrar que viriones de BYV contienen solamente 10 moléculas de HSP70h, las cuales se unen de manera no covalente con los componentes del virión. También Dolja *et al.* (1994) detectan una muy pequeña cantidad de partículas de oro del anticuerpo anti p65 con relación a una cantidad 100 veces mayor de partículas anti-CR. De otra parte, la expresión de p65 puede ser regulada durante la infección, como lo plantea Hagiwara *et al.* (1999) en BYV.

La proteína p65 de CTV participa, al igual que en otros Closteroviridae, en el ensamblaje del virión como proteína de unión a microtúbulos y en el movimiento célula a célula (Satyaranayana *et al.*, 2000; Karasev *et al.*, 1992; Alzhanova *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos en este trabajo son novedosos en cuanto a la utilización de péptidos sintéticos específicos para la obtención de anticuerpos que detectan una proteína

chaperona (p65) de gran interés biológico porque se ha demostrado que interviene tanto en el ensamblaje del virión como en el movimiento del mismo célula a célula. De allí que se pueda utilizar en un futuro esta proteína y la detección de la misma por anticuerpos como una alternativa para la caracterización y el control biotecnológico del CTV. Sin embargo, no se puede proponer la producción de estos anticuerpos para efectos de diagnóstico generalizado, a no ser que se concentre el extracto vegetal por lo menos 10 veces para que se puedan apreciar las diferencias con relación a los controles sanos. También es de señalar que los anticuerpos obtenidos no discriminaron entre los dos aislados de CTV compuestos de cepas biológicamente diferentes, lo que exigiría ampliar los estudios para buscar si se trata de epítopes comunes entre las distintas cepas de CTV o condiciones particulares de las mismas, que no permiten generalización de los resultados.

CONCLUSIONES

Por primera vez en Colombia se obtiene un anticuerpo policlonal anti p65 de CTV utilizando 4 péptidos sintéticos provenientes de la secuencia de la proteína p65. El anticuerpo detectó una proteína de 65kDa específica de CTV que está de acuerdo con lo esperado para el producto del gen p65, homólogo de la chaperona celular. La metodología utilizada permitió descartar reacciones cruzadas con la albúmina utilizada como proteína transportadora y demostró una alta especificidad. Algunos de los péptidos sintéticos mostraron ser más inmunogénicos que otros, seguramente por la cantidad o calidad de aminoácidos hidrofílicos o hidrofóbicos presentes en cada uno de ellos o por diferencias en la eficiencia de unión a la proteína transportadora o por característica intrínseca de cada secuencia de nucleótidos en cada péptido particular. El suero anti p65 reaccionó positivamente con extractos proteicos de cítricos infectados con los aislados de CTV suave (M79) y severo (A22), por lo que, de una manera preliminar, se puede decir que los epítopes reconocidos por los péptidos sintéticos son comunes y no específicos para discriminar entre diferentes aislados de CTV. Se puede sugerir que el anticuerpo anti p65 es útil para la detección de una amplia gama de aislados del virus puesto que no discriminó entre aislados catalogados como suaves o severos. Es de anotar que la detección de p65 en plantas infectadas se realizó en extractos concentrados, lo que está de acuerdo con los hallazgos de otros autores en cuanto a la baja concentración de p65 *in*

vivo. Por otra parte, de manera preliminar, este estudio permitió demostrar que el ORF que codifica en el virus de la tristeza cítrica para el homólogo de la HSP70 se expresa *in vivo*.

La limitante para el uso de este anticuerpo p65 en el diagnóstico estaría en la baja concentración de la proteína por detectar en las plantas infectadas, lo que en casos particulares podría generar falsos positivos o negativos. Además, la disponibilidad de un anticuerpo p65 posibilita el uso no sólo en aspectos diagnósticos sino, principalmente, para complementar estudios sobre la caracterización del CTV en el nivel serológico para la detección de la expresión de genes y de la manipulación genética. Otros trabajos han demostrado que p65 participa en el ensamblaje viral y como proteína de movimiento viral. Por tanto, si p65 cumple un papel en el movimiento viral, también sería posible pensar en manipular este gen o su proteína en plantas transgénicas para regular o anular el transporte viral en la planta y hacer el seguimiento de la expresión proteica con anticuerpos específicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los doctores A. Agranovsky y S. Garnsey por la donación de anticuerpos, y a Colciencias por su financiación grant No.1101-12-652-96 (Contrato 202-97).

BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel, F. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. Second Edition. New York: Green Publishing Associates Ed.
- Agronovsky, A.; Boyko, V.; Karasev, A.; Koonin, E.; Dolja, V. 1991. Putative 69kDa protein of beet yellows closterovirus is homologue of HSP 70 heat shock proteins. *Journal Molecular Biology*, 217: 603-610.
- Agronovsky, A.; Folimonova, S.; Folimonova, A.; Denisenko, O.; Zinovkin, R. 1997. The beet yellows closterovirus p65 homologue of HSP70 chaperones has ATPase activity associated with its conserved N-terminal domain but does not interact with unfolded protein chains. *Journal General Virology*, 78: 535-42.
- Alzhanova, D.V.; Hagiwara, Y.; Peremyslov, V.V.; Dolja, V.V. 2000. Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. *Virology*, 268 (1): 192-200.
- Ball, E.M.; Hampton, R.O.; De Boer, S.H.; Schaad, N.W. Polyclonal Antibodies. In: *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Pathogens. A Laboratory Manual*. Hampton et al/editors. APS Press. 36-76(1993).

- Bar-Joseph, M.; Gumpf, D.; Doods, J.; Rosner, A.; Ginzberg, I. 1985. A simple purification method of citrus tristeza virus and estimation of its genome size. *Phytopathology*, 75: 195-197.
- Bar-Joseph, M.; Marcus, R.; Lee, R. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291-316.
- Brlansky, R.H.; Damsteegt, V.D.; Howd, D.S.; Roy, A. 2001. Separation of citrus tristeza virus subspecies using aphid transmission and their molecular analyses. XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Pathos, Cyprus (Abstract).
- McCallion, D.; Stirk, C.M.; MacNally, S.; Thompson, W.D.; Melvin, W.T. 1996. Use of synthetic peptides to produce a variety of fibrin antibodies. *Biochemical Society Trans*, 24(2): 285S.
- Craig, E.; Gambill, B.; Nelson, R. 1993. Heat shock proteins molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiological Review*, 57:402-14.
- Dolja, V.V.; Karasev, A.V.; Koonin, E.V. 1994. Molecular Biology and evolution of closterovirus: sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 261-285.
- Febres, V.; Ashoulin, L.; Mawassi, M.; Frank, A.; Bar-Joseph, M.; Manjunath, K.; Lee, R.; Niblett, C. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Molecular Plant Biology*, 86 (2): 1031 - 1034.
- German-Retana, S.; Cadress, T.; Martelli, G. 1999. Closteroviruses (Closteroviridae). In: *Encyclopedia of Virology*. Granoff Al. and Webster, R. Second Edition. Vol 1, pp. 266 -273.
- Hagiwara, Y.; Peremyslov, V.V.; Dolja, V.V. 1999. Regulation of closterovirus gene expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization. *Journal of Virology*, 10: 7988-93.
- Hilf, M.E.; Karasev, A.V.; Dawson, W.O.; Bar-Joseph, M.; Garnsey, S.M. 1998. Genetic heterogeneity of isolates of citrus tristeza virus (CTV). *Phytoparasitica*, 26-1.
- Karasev, A.; Kashina, A.; Gelfano, V.; Dolja, V. 1992. HSP70 related 65kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Lett*, 304:12-14.
- Karasev, A.; Boyko, V.P.; Gowda, S.; Nicolaeva, O.V.; Hilf, M.E.; Koonin, E.V.; Niblett, C.L.; Cline, K.; Gumpf, D.J.; Lee, R.F.; Garnsey, S.M.; Lewandowski, D.J.; Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology*, 208 (2): 511-520.
- Karasev, A.; Hilf, M.; Garnsey, S.; Dawson, W. 1997. Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5' termini of the citrus tristeza virus subgenomic RNA. *Journal of Virology*, 71: 6233 - 36.
- Kyte, J.; Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157 (1): 105-32.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Moreno, O.; Guerra, J.; Muñoz, N. 1990. Identification of spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology*, 80: 477-482.

- Medina, V.; Peremslov, V.; Hagiwara, Y.; Dolja, V. 1999. Subcellular localization of the HSP70 homolog encoded by Beet Yellows Closterovirus. *Virology*, 260 (1): 173-81.
- Napuli, A.J.; Falk, B.W.; Dolja, V.V. 2000. Interaction between HSP70 homolog and the filamentous virions of Beet yellows virus. *Virology*, 7JA (1): 232-9.
- Nikolaeva, O.; Karasev, A.V.; Powell, Ch.A.; Gumpf, D.; Garnsey, S.; Lee, R.L. 1996. Mapping of epitopes for citrus tristeza specific monoclonal antibodies using bacterial expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, 86 (9): 974-979.
- Oliveros, O.; Torres, Y.; Morales, G.; Guzmán, M., Acosta Peñaranda, J. 2001. Two SSCP Common haplotypes of the CPm gene (p27) in Colombian field isolates of citrus tristeza virus. XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Pathos, Cyprus (Abstract).
- Pappu, H.R.; Karasev, A.V.; Anderson, E.J.; Pappu, S.S.; Hilf, M.E.; Febres, V.J.; Eckloff, R. M.; McCaffery, M.; Boyko, V.; Gowda, S.; Dolja, V.; Koonin, E.V.; Gumpf, D.J.; Cline, K.C.; Garnsey, S.M.; Dawson, W.O.; Lee, R.F.; Niblett, C. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology*, 199 (1), 35-46.
- Peñaranda, J.; Acosta, O.; Guzmán, M.; Alegría, A.; Manjunath, K.; Lee, R.; Garnsey, S.; Niblett, C. 1995. Biological and molecular characterization of mild and severe isolates of citrus tristeza virus from Colombia. In: Proceedings of the 13th International Conference of the Organization of Citrus Virologists. (IOCV). Riverside, pp. 57- 62.
- Peremslov, V.; Hagiwara, Y.; Dolja, V. 1999. HSP70 homolog functions in cell to cell movement of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96 (26): 14771-6.
- Permar, T.A.; Garnsey, S.M.; Gumpf, D.F.; Lee, R.F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 80: 24- 28.
- Peroni, LA.; Días, L.C.; Azevedo, E.M.; Caporino, M.C.; Müller, G.W.; Machado, M.A.; Stach-Machado, D.R. 2001. Identification of citrus tristeza strains by monoclonal antibodies. XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Pathos, Cyprus (Abstract).
- Roistacher, C.N.; Moreno, P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza Virus: A review. In: Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). Bransky R. et al/Editors. Riverside, pp:7-19.
- Rosales, I.M.; Manjunath, K.L.; Niblett, C.L.; Bransky, R.; Lee, R.F. 2001. Characterization of the HSP70 protein homolog (HSP70h) of citrus tristeza closterovirus. In: XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Pathos, Cyprus (Abstract).
- Satyanarayana, T.; Gorda, S.; Mawassi, M.; Albiach-Marti, M.R.; Ayllon, M.A.; Robertson, C.; Garnsey, S.M.; Dawson, W.O. 2000. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat protein function in efficient virion assembly. *Virology*, 278 (1): 253-65.
- Tian, T.; Rubio, L.; Yeh, H.H.; Crawford, B., Falk, B.W. 1999. Lettuce infectious yellows virus: In vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly Bemisia tabaci. *Journal General Virology*, (115): 1111-7.