



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

### ESTRUCTURA POBLACIONAL DE AISLAMIENTOS DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS (CTV) EN MÉXICO Y BRASIL

PATRICIA RIVAS VALENCIA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: **Estructura poblacional de aislamientos del Citrus Tristeza Closterovirus (CTV) en México y Brasil**, realizada por la alumna: **Patricia Rivas Valencia**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

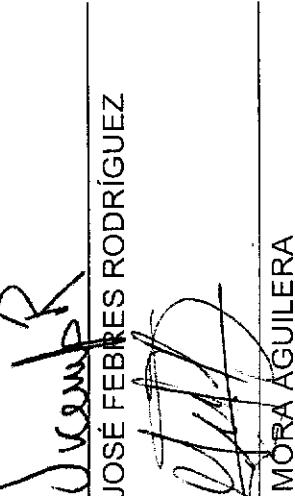
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:   
DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR:   
DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTINEZ

ASESOR:   
DRA. MA. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR:   
DR. VICENTE JOSÉ FEBRES RODRÍGUEZ

ASESOR:   
DR. ANTONIJÓ MORA AGUILERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero de 2008.

Patricia Rivas Valencia, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2008

**RESUMEN**

La tristeza es causada por un complejo viral constituido por diversos haplotipos (*hps*) del Citrus tristeza virus (CTV). El objetivo fue realizar un análisis de la estructura poblacional en diferentes escenarios epidémicos: a) En Yucatán, México, en condiciones asintomáticas (As) y con presencia de *T. citricida* (*Tc*), vector asociado a aislamientos de tipo severo; y en Tamaulipas en condiciones As y sin *Tc*. b) En Brasil, en condiciones As y sintomáticas (s), en regiones con y sin muerte súbita de los cítricos (MSC), síndrome atribuible a una nueva variante severa del CTV. Se estudiaron las secuencias génicas p25 y p27 de la capa proteica viral. En México, con SSCP se demostró una estructura poblacional compleja en Tamaulipas, con 7 patrones electroforéticos (*pes*) de hasta 3 *hps*. Las frecuencias de *pes* demostraron la existencia de uno prevalente distintivo por región. En Yucatán, los *pes* se mantuvieron en 2003, 2004 y 2006 en árboles inicialmente positivos (autoinfección) pero con cambios en los nuevos árboles infectados (aloinfección). La mayor variabilidad de las poblaciones del virus fue dentro (69%) que entre regiones (31%). La incidencia de tristeza del 2003-06 en Yucatán fue de 4.41 a 39.33%. La dispersión evidenció un comportamiento agregado (I. Lloyd: 1.54 a 2.39). En Brasil, con SSCP el número *pes* fue de 12 de hasta 5 y 7 *hsp* de CTV en regiones con y sin MSC. La mayor variabilidad fue dentro de la población del virus de una misma localidad (98%) que entre localidades (2%), independiente de MSC. No se determinó la asociación de aislamientos de CTV de tipo severo con la MSC. La estructura poblacional del CTV en autoinfección fue mayormente compleja en Brasil, posiblemente por el carácter endémico. Se evidencia por primera vez cambios estructurales en procesos de aloinfección pero sin una implicación aparente de *Tc* en el periodo estudiado.

**Palabras clave:** SSCP, Muerte súbita de los cítricos, estructura poblacional.

Patricia Rivas Valencia, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2008

#### ABSTRACT

The tristeza disease is caused by a viral complex constituted by diverse haplotypes (*hps*) of the Citrus tristeza virus (CTV). The aim was to perform an analysis of the population structure in different epidemics ways: a) In Yucatan, Mexico, with asymptomatic conditions (As) and in presence of *Toxoptera citricida* (*Tc*), vector associated with isolates of severe type; and in Tamaulipas under conditions As without *Tc*; b) In Brazil, in symptomatic (s) conditions and As, in two regions with and without citrus sudden death (CSD), syndrome attributable to a new severe variant of the CTV. Genes p25 and p27 of the viral capsid were studied. In Mexico, with SSCP a complex population structure was found in Tamaulipas, with 7 electrophoretic patterns (*eps*) of up to 3 *hps*. The frequencies of *eps* demonstrated the existence of one prevalent pattern for region. In Yucatan, *eps* were kept in 2003, 2004 and 2006 in initially positive trees (autoinfection) at it only changed in the new infected trees (aloinfection). The major variability of the populations of the virus was inside (69%) rather than within regions (31%). The incidence of the tristeza from 2003-06 in Yucatan was from 4.41 to 39.33%. The dispersion demonstrated a behavior aggregated (Lloyd's index: 1.54 to 2.39). The autocorrelation analysis was not conclusive, due the spatial combination of different fruit trees. In Brazil, with SSCP the number *eps* was of 12 of up to 5 and 7 *hsp* of CTV in regions with and without CSD. The major variability was inside the population of the virus of the same locality (98%) and not within localities (2%), independently from CSD presence. Therefore, no definite association was found of severe isolations with MSC. The population structure of the CTV in autoinfection was of major complexity in Brazil than in Mexico, possibly due to endemic character. Changes are demonstrated by the first time in the population structure in processes of aloinfection without the apparent implication of *Tc* in the studied period.

**Key words:** SSCP, citrus sudden death, population structure.

**PARA ÁNGEL, LEONARDO E IVETTE**

**"EL UNIVERSO SOLO TIENE SENTIDO CUANDO TENEMOS CON  
QUOTEN COMPARTIR NUESTRAS EMOCIONES"**

**P. COELHO**

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue parcialmente financiado por:

- Colegio de Postgraduados.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
- Proyecto CONACYT G35488-b "Generación de plantas transgénicas de cítricos que expresen genes que podrían conferir resistencia al virus de la tristeza de los cítricos".
- Campaña contra el Virus de la Tristeza de los Cítricos en Tamaulipas y Yucatán (DGSV).
- Comité de Fomento e Investigación Citrícola del estado de Tamaulipas (CFICET) Campo Experimental Francisco Villa.
- Unión Agrícola Regional de Citricultores de Tamaulipas (UARCT).
- Fundación Produce Tamaulipas.
- FUNDECITRUS A.C.

A mi Consejo Particular: Dr. Gustavo Mora Aguilera, Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa, Dr. Vicente Febres, Dr. Antonio Mora Aguilera y Dr. Pedro Moreno Gómez.

A mis amigos Adriana Cano Salgado, Emiliano Loeza Kuk, Elvia Rosas Romero, Carlos Cecilio Góngora Cañúl y Noé Ruiz García.

A los profesores del Programa de Fitopatología.

## CONTENIDO

Pág.	
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	7
III. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE AISLAMIENTOS DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS Y SU ASOCIACIÓN CON LA MUERTE SÚBITA DE LOS CÍTRICOS EN BRASIL	44
a. RESUMEN	44
b. ABSTRACT	46
c. INTRODUCCIÓN	47
d. MATERIALES Y MÉTODOS	48
e. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
f. CONCLUSIONES	63
g. LITERATURA CITADA	64
IV. CARACTERRIZACIÓN MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL DE AISLAMIENTOS DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS EN YUCATÁN Y TAMAULIPAS, MÉXICO	67
a. RESUMEN	67
b. ABSTRACT	68
c. INTRODUCCIÓN	69
d. MATERIALES Y MÉTODOS	71
e. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
f. CONCLUSIONES	91
g. LITERATURA CITADA	92

**V. ESTUDIO ESPACIO-TEMPORAL DE AISLAMIENTOS DEL  
CITRUS TRISTEZA VIRUS EN YUCATÁN Y TAMAULIPAS,  
MÉXICO**

	<b>99</b>
a. RESUMEN	<b>99</b>
b. ABSTRACT	100
c. INTRODUCCIÓN	101
d. MATERIALES Y MÉTODOS	103
e. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106
f. CONCLUSIONES	120
g. LITERATURA CITADA	122

**VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES**

127

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Pág.

Figura 1 Mapa del genoma del *Citrus tristeza virus* (CTV) 8

### CAPÍTULO III

Figura 1 Dendrograma obtenido de 96 muestras de CTV con y sin presencia de MSC que se hibridaron con sondas específicas para la diferenciación de aislamientos de CTV de Brasil. 60

Figura 2 Patrones electroforéticos obtenidos de muestras de CTV por SSCP amplificadas de una porción de la capa proteica (p25) de cinco localidades de Brasil. 61

### CAPÍTULO IV

Figura 1 Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos del CTV originarios de Yucatán, México. 79

Figura 2 Frecuencia de patrones electroforéticos obtenidos por análisis SSCP de aislamientos de CTV colectados en campo y conservados en invernadero originarios de Yucatán, México. 81

Figura 3 Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos del CTV originarios de Tamaulipas, México. 84

Figura 4 Frecuencia de patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de aislamientos de CTV colectados en Tamaulipas, México. 85

Figura 5 Dendrograma obtenido de 77 perfiles electroforéticos de aislamientos de CTV

originarios de Yucatán, México.

87

Figura 6 Dendrograma obtenido de 43 perfiles electroforéticos de aislamientos de CTV originarios de Tamaulipas, México y conservados en plantas de cítricos en invernadero en plantas de naranja Valencia/carrizo y Valencia/cleopatra.

88

Figura 7 Dendrograma obtenido de 121 perfiles electroforéticos de aislamientos de CTV originarios de tres huertas comerciales de Tamaulipas y Yucatán, México.

90

## CAPÍTULO V

Figura 1 A) Mapa de dispersión espacio-temporal de árboles positivos a CTV B) Mapa de contorno e isolíneas mostrando la orientación y tamaño de los agregados de árboles positivos a CTV en una huerta comercial de Yucatán, México (2003-2006).  
108  
Figura 2 Autocorrelogramas de la tristeza de los cítricos en una huerta comercial de Yucatán, México.  
111

Figura 3 Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV originarios de Yucatán, México.  
113  
Figura 4 Distribución de frecuencias de patrones electroforéticos presentes en los árboles durante tres años en una huerta comercial citrícola de Yucatán, México (2003-2006).  
115

Figura 5 Mapa de dispersión de aislamientos de CTV en una huerta comercial de Yucatán, México (2003-2006).  
116  
Figura 6 Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica

(p25) de aislamientos de CTV originarios de Tamaulipas, México.

117

Distribución de frecuencias de los patrones electroforéticos presentes en una huerta comercial citrícola de Tamaulipas, México (2004).

118

Mapa de dispersión de aislamientos de CTV en una huerta comercial de Tamaulipas, México (2004).

119

Figura 7

Figura 8

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO II

Pág.

Cuadro 1 Marcos de lectura abiertos (ORF), producto y función del Citrus tristeza virus, producto y función. **9**

Cuadro 2 Técnicas moleculares empleadas en la caracterización de aislamientos de CTV. **14**

### CAPÍTULO III

Cuadro 1 Características agronómicas de las huertas muestreadas con respecto al CTV y MSC en las localidades citrícolas de São Paulo (SP) y Minas Gerais (MG). **49**

Cuadro 2 Sondas específicas para la diferenciación de aislamientos de CTV. **52**

Cuadro 3 Muestras amplificadas con los iniciadores HCP1/HCP2 (672 pb) para la capa proteica del CTV e hibridación con sondas específicas en la diferenciación de aislamientos de CTV presentes en regiones con y sin MSC en Brasil. **57**

Cuadro 4 Análisis de varianza molecular (AMOVA) de presencia y ausencia de señal de hibridación de muestras amplificadas con parte del gen p25 de la capa proteica de aislamientos de CTV de cinco regiones geográficas de Brasil. **59**

Cuadro 5 Análisis de varianza molecular (AMOVA) de patrón electroforético SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV de cinco regiones de Brasil. **62**

## CAPÍTULO IV

Cuadro 1	Número de árboles de naranjo ( <i>Citrus sinensis</i> ) positivos a CTV en huertas comerciales de Yucatán y Tamaulipas, México.	72
Cuadro 2	Número de aislamientos de CTV obtenidos mediante injerto de yemas positivas al virus, provenientes de Yucatán y Tamaulipas, México.	77
Cuadro 3	Ánálisis de varianza molecular (AMOVA) de patrón electroforético de SSCP de muestras amplificadas de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV de Yucatán y Tamaulipas, México.	89

## CAPÍTULO V

Cuadro 1	Características agronómicas de huertas comerciales de cítricos de naranja valencia/agrio muestreadas para detección de CTV en Yucatán y Tamaulipas, México. Incidencia, tipo de patrón de acuerdo a los índices de Morisita y Lloyd (previa determinación del tamaño óptimo de cuadrante) y dependencia espacial mediante autocorrelación espacial de árboles positivos a CTV en Yucatán, México (2003-2006).	104
Cuadro 2		

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de los cítricos representa una importante fuente de ingresos para México. Nuestro país ocupa el cuarto lugar en importancia como productor de cítricos en el mundo, con una superficie de 544,517 ha y una producción de 6.74 millones de ton de fruta (SIAP, 2006). El volumen de producción sólo es superado por Brasil (18.8%), Estados Unidos (13.7) y China (11.9 millones de ton) (FAO, 2006). A nivel nacional, las especies cítricas de mayor importancia son naranjo (*Citrus sinensis*) 63.6%, limón mexicano (*Citrus aurantium*), limón persa (*Citrus latifolia*) 26.5%, mandarino (*Citrus reticulata*) 5.5% y toronjo (*Citrus paradisi*) 5.5% (SIAP, 2006). Actualmente, la tristeza de los cítricos, enfermedad ocasionada por el *Citrus tristeza virus* (CTV), representa una amenaza latente para todas las regiones cítricas del país, en especial para el sureste mexicano, por la introducción en el año 2000 (Michaud y Álvarez-Ramos, 2000), del áfido vector *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), con una mayor capacidad de transmitir aislamientos del CTV que otros áfidos (Yokomi et al., 1994).

El *Citrus tristeza virus* está compuesto de una cadena sencilla de ARN de sentido positivo, de aproximadamente 20 kb, organizado en 12 marcos abiertos de lectura (open reading frame, ORF), que codifican al menos 19 proteínas y dos regiones terminales no traducibles (untranslated terminal

regions, UTR) en los extremos 5' y 3' (Dolja et al., 2006; Setandreu et al., 2006; Karasev, 2000). Es un virus altamente variable y se han descrito numerosos aislamientos que difieren en características patogénicas y en su transmisión por áfidos vectores (Weng et al., 2007; Rubio et al., 2001). Los daños que causa el Citrus tristeza virus dependen en gran medida de las propiedades biológicas de los aislamientos predominantes en cada zona o región citrícola, y por tanto, para el control de los mismos se requieren métodos adecuados de caracterización.

En este trabajo se caracterizó molecularmente un grupo de aislamientos de Citrus tristeza virus brasileños y mexicanos. Se exploró la diversidad de este virus en zonas citrícolas con características distintas. En Brasil (São Paulo y Minas Gerais) se realizó un estudio de poblaciones a nivel molecular de aislamientos del Citrus tristeza virus, para determinar si existe una posible relación de aislamientos de tipo severo con la muerte súbita de los cítricos (MSC). En México (Yucatán y Tamaulipas), se caracterizó molecularmente la estructura poblacional de los aislamientos presentes del virus y en el caso de Yucatán, se realizó un estudio espacio-temporal de los aislamientos virales, examinando posibles cambios de la estructura poblacional de Citrus tristeza virus en campo. En ambos países se utilizaron técnicas serológicas y moleculares: ELISA, Inmunoimpresión ELISA directa, retrotranscripción y

reacción en cadena de la polimerasa, hibridación con distintas sondas marcadas de CADN y análisis de la conformación polimórfica de la cadena sencilla de ADN (single-strand conformation polymorphism, SSCP).

La hipótesis general de este trabajo fue que el análisis de la estructura poblacional de aislamientos del Citrus tristeza virus, permitirá explicar en Brasil la asociación de aislamientos de tipo severo con la muerte súbita de los cítricos, derivado de la interacción del virus con los áfidos vectores, hospedantes, clima y manejo, y en México, evidenciar cambios de prevalencia de aislamientos debido a la presencia de *Toxoptera citricida*, con lo cual se establecerá el riesgo de cambios en la intensidad de epidemias de tristeza.

En el caso de Brasil, la muerte súbita de los cítricos y la prevalencia de aislamientos de *Citrus tristeza* virus de tipo severo en algunas de las principales regiones cítricas, tienen naturaleza endémica, lo cual justificó el siguiente objetivo de este estudio: i) Efectuar un estudio comparativo molecular de la estructura poblacional del Citrus tristeza virus, en regiones con aislamientos de tipo severo, con presencia y ausencia de muerte súbita de los cítricos para identificar su posible asociación y auxiliar el entendimiento etiológico y epidémico de la muerte súbita de los cítricos.

El objetivo planteado en México fue: i) Caracterizar la estructura poblacional de aislamientos del Citrus tristeza virus, detectar cambios en la estructura poblacional del virus derivado de la presencia de *T. citricida* y caracterizar el comportamiento epidémico (espacial y temporal) a partir de la estructura poblacional de haplotipos de Citrus tristeza virus.

Con el estudio de estos objetivos se pretendió enriquecer y sustentar la aplicación de métodos de predicción, prevención y control de la tristeza de los cítricos en las condiciones particulares de las regiones citrícolas estudiadas en Brasil y México.

## LITERATURA CITADA

- Dolja V.V., J.F. Kreuze and J.P.T. Vallonen. 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117:38-51.
- FAO (Food Agriculture and Organization of United Nations). 2006. FAOSTATS. Consultado el 8 de noviembre. URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Karasev A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38:293-324.
- Michaud J.P. and R. Alvarez-Ramos. R. 2000. First collection of Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphidiidae) in Quintana Roo, Mexico, Florida Entomologist 83:357-358.
- Rubio L., M.A. Ayllón, P. Kong, A. Fernández, M.L. Polek, J. Guerrí, P. Moreno and B.W. Falk. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology* 75:8054-8062.
- Sentandreu V. J.A. Castro, M.A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerrí, F. Gonzalez-Candelas, P. Moreno and A. Moya. 2006. Evolutionary analysis of genetic variation observed in citrus tristeza virus (CTV) alter host passage. *Archives of Virology* 151:875-894.
- SIAP (Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2006. Anuario Estadístico Agropecuario.

SAGARPA. Consultado el 8 de noviembre de 2007. URL:  
<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar/comuniar.html>

---

- Weng Z. R. Barthelson, S. Gowda, M.E. Hillf, W.O. Dawson, D. W. Galbraith and Z. Xiong. 2007. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of RNA virus within a single host generate extensive diversity. PLoS ONE 2 (9) : e917.doi:10.1371/journals.pone.0000917.
- Yokomi R.K., R. Lastra, M.B. Stoetzel, V.D. Damsteegt, R.F. Lee, S.M. Garnsey, T.R. Gottwald, M. Rocha-Peña and C.L. Nibblet. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. J. Econ. Entomol. 87:1078–1085.

## III. REVISIÓN DE LITERATURA

### Importancia de los cítricos en México

México ocupa el cuarto lugar en importancia como productor de cítricos en el mundo (FAO, 2006). Los cítricos constituyen uno de los principales Sistema-Producto que activan la economía de estados como Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Colima, Oaxaca, Tabasco, Yucatán y Sonora, entre otros (ASERCA, 2006). Por tanto, constituyen un producto agrícola básico en México, siendo fuente de empleo y de ingresos en zonas rurales. Se estima que de la actividad citrícola dependen más de 90,000 familias mexicanas quienes desarrollan su actividad en 505 mil hectáreas aproximadamente. La producción de cítricos en México, se desarrolla en 28 estados con climas tropicales y subtropicales, con un volumen de producción de 6.74 millones de ton (ASERCA, 2006). Los estados de mayor importancia en producción son: Veracruz con el 42%, San Luis Potosí y Tamaulipas que concentran más del 53% de la superficie sembrada y cosechada.

Del total de la producción nacional, el 88% se dirige al consumo interno y para exportación el 12%, de los cuales se conforma como jugos el 1.4% y como fruta fresca el 0.44% (Cámara de Diputados, 2007).

Las restricciones fitosanitarias, y en especial el estudio de la tristeza de los cítricos y su principal áfido vector *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), con presencia en el sureste del país desde el 2000 (Michaud y Álvarez-Ramos, 2000), representan una importante necesidad de documentación para prevenir epidemias intensas que amenacen la citricultura nacional.

### El *Citrus tristeza virus* (CTV)

El CTV tiene numerosos aislamientos que difieren biológica, serológica y molecularmente (Loeza-Kuk et al., 2005; Loeza-Kuk, 2003; Herrera-Isidrón, 2004; Mendoza et al., 2003; Rubio et al., 2001; Moreno et al., 1993). Su genoma está compuesto de una cadena sencilla de ARN de sentido positivo de aproximadamente 20 kb, con 12 marcos de lectura abiertos (open reading frame, ORF) (Figura 1), que codifican al menos 19 proteínas y dos regiones terminales no traducibles (untranslated terminal regions, UTR) en los extremos 5' y 3' (Cuadro 1).

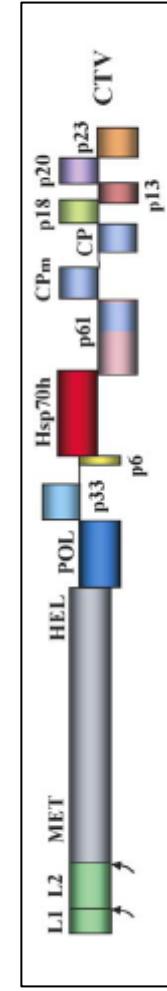


Figura 1. Mapa genómico del *Citrus tristeza virus* (CTV). (Tomado de Dolja et al., 2006).

La tristeza de los cítricos, ocasionada por el CTV, es considerada la enfermedad de mayor importancia económica, ya que ha causado la eliminación de más de 116 millones de árboles a nivel mundial (Sánchez-Anguiano, 2003). Esta enfermedad provoca diferentes grados de afectación, que depende de la combinación injerto/portainjerto que se presente (Garnsey et al., 1987). La gamma de síntomas pueden ser: declinamiento de árboles que ocasiona la muerte, picado de tallo (formación de hileras longitudinales en las ramas y tronco del árbol), amarillamiento de las plántulas, característico de inoculaciones efectuadas en invernadero, aclaración de nervaduras y enanismo (Garnsey et al., 1987).

Cuadro 1. Marcos de lectura abiertos (ORF) del Citrus tristeza virus, producto y función (Febres et al., 2007; Dolja et al., 2006; Sentandreu et al., 2006; Karasev, 2000).

ORF/gene	Producto	Función
<b>1a. (próximo al extremo 5')</b>	Codifica para una Replicación.	
	poliproteína de 349 kDa, con cuatro dominios, dos de ellos de proteasas tipo papaina (L-PRO), uno de MET y otro de (HEL).	
<b>1b. (hacia el extremo 3' del ORF 1a)</b>	Se traslapa con ORF 1a y contiene los motivos típicos de la ARN polimerasa dependiente de ARN (POL)	Replicación.
<b>2. p33</b>	Proteína de 33 kDa	Desconocida.
<b>3. p6</b>	Proteína hidrofóbica de 6 kDa (MP)	Proteína de transporte, se asocia a la membrana del retículo endoplásmico.
<b>4. p65</b>	Proteína de choque térmico, hidrofóbica de 65 kDa (Hsp70)	Actúa en el ensamblaje del virión, en el movimiento celular.

célula  
(transmembranal),  
guiando los viriones  
cuando se realiza el  
movimiento a través  
del plasmodesmo.

5. <b>p61</b>	Proteína hidrofóbica	Involucrada en el ensamblaje de los complejos multisubunidades o viriones o en el desarme de la respuesta de defensa del hospedante.
6. <b>p27</b>	Proteína de la cápside menor (CPm)	Ensamblaje del virión, protección del genoma.
7. <b>p25</b>	Proteína de la cápside (CP)	Encapsida al ARN viral, lo protege de la degradación y actúa como supresor del silenciamiento.
8. <b>p18</b>	Proteína de 18 kDa	Desconocida.
9. <b>p13</b>	Proteína de 13 kDa	Desconocida.
10. <b>p20</b>	Cuerpos de inclusión amorfos en plantas infectadas	Interfiere con la dispersión sistémica del silenciamiento. Transporte sistémico.
11. <b>p23</b>	Proteína de 23 kDa	Actúa como enlace del ribosoma, regula la acumulación de cadenas positivas de ARN, determinante patogénico y supresor de silenciamiento.

En México no se han presentado síntomas evidentes de tristeza, aún cuando se han encontrado aisamientos aparentemente de tipo severo en baja prevalencia (Loeza-Kulk et al., 2005; Herrera-Isidrón, 2004; Loeza-Kuk, 2003; Mendoza et al., 2003). Estudios serológicos han permitido demostrar la presencia de CTV en condiciones asintomáticas (Aguilar-Ríos, 2004; Góngora-Canúl, 2004b; Herrera-Isidrón, 2004; Loeza-Kuk, 2003; Mendoza et al., 2003).

## **Características de la estructura poblacional viral**

Desde la invención de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), los estudios moleculares relacionados con virus se han convertido en rutina y han aportado herramientas básicas para el estudio de aspectos finos en la biología de los virus. Cabe mencionar que los primeros estudios de secuenciación viral fueron con el virus con genoma ADN: Cauliflower mosaic virus (CaMV), reportado en 1980 (Franck *et al.*, 1980) y con el virus con genoma ARN el Tobacco mosaic virus (TMV) (Goelet *et al.*, 1982). A partir de estos estudios, los virus con genoma ARN han sido ampliamente estudiados. Se ha determinado que tienen una tasa elevada de mutación, del orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  sustituciones por nucleótido copiado (Drake y Holland, 1999); en consecuencia las poblaciones virales poseen una gran diversidad, y por tanto, la estructura poblacional está definida como una colección ordenada y estable de variantes génicas o haplotipos dominadas por una secuencia principal (quasiespecies) (Domingo, 2002; García-Arenal *et al.*, 2001), con múltiples eventos de mutación y recombinación (Weng *et al.*, 2007; Bull *et al.*, 2005; Froissart *et al.*, 2005; Worobey y Colmes, 1999), que de acuerdo con la genética de poblaciones se trata de un proceso de evolución (cuálquier cambio en las propiedades genéticas de la población) (Moya *et al.*, 2000).

Además, el tamaño de la población es importante, porque su alteración tiene un efecto decisivo en la evolución o capacidad parasítica de las quasiespecies, y por tanto, de la población (Lázaro *et al.*, 2003). Por ende, el estudio de la estructura poblacional y sus cambios es un aspecto importante a estudiar dentro de la fitopatología y de alta relevancia para el desarrollo de estrategias de control y manejo de enfermedades.

En este sentido, con este nuevo conocimiento, aunado al avance tecnológico molecular y al desarrollo de programas computacionales, aplicados a la bioinformática, se ha propiciado que especialidades como la epidemiología agrícola incorpore procedimientos moleculares aplicados a poblaciones, tratando de combinar las metodologías convencionales numéricas, con el análisis de datos moleculares para obtener nueva información epidemiológica de gran precisión a nivel de población.

### **Estudios moleculares en la caracterización de aislamientos de CTV**

Los estudios moleculares se han enfocado en estudiar la biología del CTV, en un inicio se desarrollaron las técnicas para su detección, posteriormente se secuenciaron varios tipos de aislamientos del virus, con lo cual se fue estableciendo la conformación, organización y funcionamiento del genoma viral, por ejemplo, T36 y T30 de Florida

(Albiach-Martí *et al.*, 2000a; Karasev *et al.*, 1995; Pappu *et al.*, 1994), VT de Israel (Mavasssi *et al.*, 1996), T385 de España (Vives *et al.*, 1999) SY568 de California (Yang *et al.*, 1999), NUAGA de Japón (Suastika *et al.*, 2001), T318A de España (Ruíz-Ruiz *et al.*, 2006) y en México (IPN, 2006). Lo anterior permitió establecer que el CTV es un complejo viral, ya que se compone de diversos haplotipos que le confieren sus propiedades biológicas y moleculares, ya que se han asociado a síntomas de tipo severo o moderado y han constituido la base de los actuales estudios, donde la tendencia es estudiar la diversidad de este complejo viral en diferentes regiones citrícolas, así como las implicaciones de los áfidos vectores y hospedantes que permita sentar las bases del control y manejo de la enfermedad (Cuadro 2).

En general, los estudios moleculares de CTV reportados han utilizado el análisis de doble cadena de ARN, RT-PCR, RFLP's, SSCP, hibridación y secuenciación para caracterizar uno o varios genes o regiones no traducibles del extremo 5' y 3' de aislamientos del virus mantenidos en invernadero, tratando de asociarlos con los atributos biológicos de cada aislamiento (Cuadro 2), sin considerar aspectos espaciales y temporales de la enfermedad. Estos aspectos han sido poco estudiados, ya que la complejidad de cada aislamiento natural de CTV, poseedor de una colección de variantes genéticas o haplotipos, le dan una estructura poblacional

particular (Weng *et al.*, 2007) y como se mencionó anteriormente, determinada por factores del entorno.

Cuadro 2. Técnicas moleculares empleadas en la caracterización de aislamientos de CTV.

Técnica Molecular	No. aislamientos	Región Genómica	Aplicación	Cita
	4 aislamientos en 7 plantas de <i>Citrus</i> sp.	ARN genómico	Cantidad y complejidad de los patrones de doble cadena de RNA de CTV.	Dodds <i>et al.</i> , 1987.
Análisis de la doble cadena de RNA	2 aislamientos T505 y SY560	ARN genómico	Determinar el efecto del cambio de hospedante en los patrones de doble cadena de RNA de CTV.	Jarupat <i>et al.</i> , 1988
	Varios aislamientos	ARN genómico	Detección de aislamientos de CTV.	Habili N. 1992.
	15 aislamientos	ARN genómico	Cambio en los patrones de doble cadena de RNA por transmisión de áfidos.	Albiach-Martí <i>et al.</i> , 2000b.
	T385	ARN genómico	Separación de sub-aislados de CTV	Moreno <i>et al.</i> , 2003.
CFLP	Varios aislamientos (panel)	CP	Identificación, diferenciación y caracterización de aislamientos	Marques <i>et al.</i> , 2006
Hibridación con sondas marcadas con digoxigenina	Varios aislamientos	CP	Diferenciación de aislamientos Detección	Narváez <i>et al.</i> , 2000.
RFLP	2 aislamientos	ORF 6 y UTR 3'	Diferenciación de aislamientos y evaluación de protección cruzada de aislamientos moderados.	Barbarossa y Sabino 2006. Kano <i>et al.</i> , 2006.

RT-PCR bidireccional RFLP Secuenciación	8 aislamientos	P23 y p25	Caracterización de aislamientos.	Zhen et al., 2006.
RFLP Secuenciación	61 aislamientos	CP	Variación genética.	Barzegar et al. 2005.
RT-PCR	4 aislamientos	CP	Diferenciación de aislamientos.	Huang et al., 2004
	372 aislamientos	3 regiones no contiguas	Variación genética y parentesco.	Hilf et al., 2005
	30 aislamientos	A, F, C y P	Estructura poblacional y variabilidad genética.	Rubio et al., 2001.
Clonación SSCP secuenciación	24 áfidos Y tejido de 2 árboles colectados en campo	CP	Cambios en la estructura poblacional de aislamientos de CTV derivados de la transmisión por áfidos vectores.	Nolasco et al., 2007
	11 aislamientos obtenidos de campo	P23, p25 y p27	Variabilidad genética en presencia de <i>T. citricida</i> .	Iglesias et al., 2007.
	3 aislamientos	CP	Caracterización y variabilidad genética.	Amin et al., 2006
RT-PCR bidireccional SSCP Hibridación	2 aislamientos T32 y T318	p18 y p20	Estructura poblacional con expresión de síntomas.	Sambade et al., 2007
Secuenciación	7 aislamientos	p18 (274 secuencias) y p20 (451 secuencias)	Variabilidad genética.	Sentandreu et al., 2006
SSCP	242 aislamientos	CP	Caracterización de la estructura poblacional de los aislamientos.	JianKun et al., 2006a.
		p27	Variabilidad.	Gago-Zachert et al., 1999

SSCP	19 aislamientos	p18, p13, p23	p20 y Caracterización de aislamientos de diferente origen geográfico y patogenicidad.	Sambade et al., 2002.
	254 aislamientos	P20 y A (ORF1a)	Variación genética en poblaciones naturales de CTV.	D'Urso et al., 2000.

SSCP Secuenciación	5 aislamientos	A, F, CP y p20	Variabilidad genética Estructura poblacional.	Kong et al., 2000.
	3 aislamientos	CP	Caracterización molecular.	Jiankun et al., 2006b.
	6 aislamientos	P18 y p20	Variación genética.	Ayllón et al., 2006

### **La tristeza de los cítricos y su probable relación con la muerte súbita en Brasil**

En Brasil el CTV es endémico y puede ser encontrado en todas las especies y variedades de cítricos (Souza et al., 2002; Müller et al., 2000). Por ello se asoció al CTV, con la aparición de la muerte súbita de los cítricos (MSC) en 1999, en naranja dulce (*Citrus sinensis* L.), cultivares Hamlin, Natal, Valencia, Westin, Pera y Rubí, todas ellas injertadas sobre limón Cravo o Rangpur lime (*Citrus limonia*) (Gimenes-Fernandes y Bassanezi, 2001). Los síntomas de árboles afectados por MSC son inicialmente una decoloración foliar, defoliación parcial y limitado crecimiento vegetativo, así como ausencia de tallos internos. Estos síntomas se intensifican con el rápido progreso de la

enfermedad, culminando con el colapso y muerte del árbol, incluso con los frutos producidos adheridos a las ramas del árbol (Bassanezi et al., 2003). La muerte de la planta después de la expresión de los síntomas puede ocurrir en un periodo de 1-12 meses dependiendo del manejo, cultivar y época del año (Bassanezi et al., 2002). Anatómicamente se observa amarillamiento en el floema del portainjerto. La apariencia y el progreso de la enfermedad tiene semejanza con el declinamiento rápido "quick decline" de los cítricos, causado por el CTV aún y cuando las combinaciones afectadas son tolerantes al virus (Bassanezi et al., 2003; Müller et al., 2002). Actualmente se estudia intensivamente la etiología de esta enfermedad que está ocasionando pérdidas importantes en las regiones productoras de Brasil (Jesús-Junior y Bassanezi, 2004) y que pone en riesgo a la citricultura mundial.

**Antecedentes del estudio de la tristeza de los cítricos en México**

El estudio de la tristeza de los cítricos en México se ha desarrollado en diferentes líneas de investigación, enfocadas a cada uno de los componentes epidemiológicos del patosistema. A continuación se presentan los trabajos más recientes, con énfasis en los resultados obtenidos por el Grupo Interdisciplinario de Investigación de los Cítricos del Colegio de Postgraduados.

## 1) El vector

Se ha estudiado la composición poblacional de áfidos vectores en regiones productoras de cítricos. En estas poblaciones se ha identificado a *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. craccivora*, *Toxoptera aurantii*, *Myzus persicae* y *T. citricida* (Peña-Martínez et al., 2004; López-Arroyo et al., 2003; Silva-Vara et al., 2001; Peña-Martínez, 2001; Gaona-García, 2000; Villegas-Jiménez, 2000; Michaud y Álvarez-Ramos 2000).

Se han propuesto modelos de tipo lineal y cuadrático para cada una de las especies (*A. gossypii*, *A. spiraecola* y *T. aurantii*) en una región cítrcola de Veracruz, derivados del conocimiento de la dinámica poblacional de áfidos vectores y relacionando el número de áfidos y brotes infestados (Cisneros-Hernández, 2003). La utilidad de estos resultados se enfoca en el muestreo y eventual aplicación de medidas de control biológico y químico, permitiendo identificar umbrales de aplicación.

Así mismo, para este fin se han identificado depredadores naturales de los áfidos asociados a los cítricos (López-Arroyo et al., 2003; López-Arroyo, 2001) y hongos entomopatógenos para el control de *T. citricida* (Hernández-Torres et al., 2007).

## 2) El hospedante

La identificación de probables características morfológicas y moleculares de germoplasma de *Citrus* spp. para su uso en programas de mejoramiento, protección y control del CTV es importante. Con este propósito se estudio *in situ* la población de árboles perteneciente al Campo Experimental "Francisco Villa", en Tamaulipas (Tapia-Campos et al., 2005).

La evaluación de portainjertos tolerantes a tristeza se ha llevado a cabo desde inicios de 1980 (Medina-Urrutia et al., 2007), así como su adaptación a condiciones edáficas diversas (Rodríguez-Cuevas et al., 2007; Padrón et al., 2006). Este tipo de estudios ha aportado información relevante para el Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Citricultura que apoya la Dirección General de Sanidad Vegetal.

Se han generado plantas genéticamente modificadas (GM) de pomelo, con el gen que codifica a la capa proteica del CTV del aislamiento T36 (severo). Estas plantas GM resultaron parcialmente transformadas (Palacios-Torres, 2001), razón por la cual no mostraron resistencia a la enfermedad, lo que abrió diversas posibilidades de evaluar el uso de otro tipo de aislamiento de CTV, otro gen, cepas de mayor capacidad infecciosa de *A. tumefasciens*, métodos de inoculación, etc. Con lo anterior se generaron plantas GM de *Citrus aurantium* con las secuencias CPm-CP, CP y 3'END del

CTV. Este fue el primer reporte a nivel mundial de obtención de plantas transformadas simultáneamente con los genes de la cápside mayor y menor del CTV en antisentido (Palacios-Torres, 2007; Palacios-Torres et al., 2003). Sin lugar a dudas, esta es una herramienta sumamente poderosa que debe continuar explorándose para el control y manejo de la tristeza de los cítricos.

Adicionalmente, se han obtenido plantas GM con las secuencias que codifican para la proteína oryzacistatina que aparentemente interfieren en el procesamiento viral del CTV (Román, 2003), sin embargo aún no se tienen resultados concluyentes.

La producción de plantas GM, con aparente resistencia a patógenos para su evaluación, se han sometido a procesos de infección "challenging", Loeza-Kuk y colaboradores (No publicado), evaluaron la resistencia conferida en dos líneas de pomelo Star Ruby y una selección de limón mexicano, esta evaluación se realizó utilizando transmisión por injerto y áfidos (*A. gossypii*), usando PCR en tiempo real, para cuantificar la concentración viral en el tejido y en los áfidos. Las plantas GM de pomelo se comportaron como resistentes. La evaluación realizada con transmisión por áfidos no tuvo éxito debido a la reducida carga viral que tuvo, 27 a 64 copias, lo que dejó abierta la posibilidad para continuar con estudios en este sentido; por ejemplo, usando una mayor cantidad de áfidos para la transmisión de

CTV, probar con otras especies de áfidos incluyendo *T. citricida*, otros aislamientos de CTV, condiciones de temperatura diferentes en invernadero, etc.

### Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos de CTV

Estudios de epidemiología formales se iniciaron en México en huertas comerciales de cítricos en Tamaulipas, Loeza-Kuk (2003) ha generado aportaciones importantes, relacionadas con el comportamiento de las epidemias de la tristeza de los cítricos. Se identificó el patrón de dispersión espacial del CTV en ausencia de *T. citricida*, mismo que correspondió a una forma agregada, con una dependencia espacial de 168 m en el sentido de la hilera y de 24 m entre hileras, estudios posteriores realizados por Ruiz-García Y colaboradores (2005), así como por Góngora-Canúl Y colaboradores (2004a) encontraron resultados similares de agregación, con una dependencia espacial en el sentido de la hilera de primer orden y discontinua hasta el orden 86 y entre hileras, continua de orden cuatro y discontinua hasta el orden 50.

En Nuevo León, Silva-Vara y colaboradores (2001) realizaron un muestreo en tres huertas comerciales en 1995, detectando 47 árboles positivos a CTV distribuidos al azar, que fueron erradicados en 1996, de un total de 18950 árboles evaluados (0.25% de incidencia). En los tres años

posteriores, se encontraron cinco árboles positivos adicionales. De los 52 árboles positivos al virus 35 se identificaron como severos por su reacción positiva al anticuerpo MCA13.

Loeza-Kuk (2003) estudió aislamientos originarios de Veracruz y Tamaulipas para conocer su estructura y complejidad, a través de patrones electroforéticos obtenidos por SSCP, es decir, determinar si se componían de diferentes variantes, así como su asociación a determinada sintomatología (severa o moderada) por PCR selectiva, lo que finalmente concluyó en que existe homogeneidad entre los aislamientos, a excepción de dos de ellos originarios de Tamaulipas y caracterizados como de tipo severo.

Aguilar-Ríos (2004), realizó la caracterización molecular de aislamientos de CTV, colectados en el periodo de 1983 a 2002, de huertas comerciales de doce estados (mantenidos en invernadero en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, ubicado en el Distrito Federal), y clasificó los aislamientos en cinco grupos, con base en la variación detectada en los genes p13, p20 y p23, por SSCP. Detectó aislamientos de tipo severo en Tamaulipas y Mexicali.

Herrera-Isidrón (2004), caracterizó a nivel biológico y molecular, ocho aislamientos del CTV colectados en México en el periodo de 1983 a 2000. Estableció a través de la sintomatología observada en plantas indicadoras inoculadas,

una clasificación de grupos de aislamientos débiles, moderados y severos. Caracterizó ocho regiones genómicas y clasificó 44 aislamientos del virus en tres grupos: suaves, severos comunes y severos divergentes.

Mendoza y colaboradores (2003) desarrollaron un método para diferenciar aislamientos de CTV a través de polimorfismos con enzimas de restricción (RFLP'S) en la capa proteica (p25), utilizando aislamientos originarios de Veracruz, Nuevo León y Tamaulipas, encontrando aislamientos de tipo severo en las tres entidades mencionadas.

También se ha examinado la distribución de las variantes génicas de la población viral de aislamientos de CTV dentro del árbol. Los resultados obtenidos revelan que existe segregación de los aislamientos, lo que evidencia implicaciones de áfidos o injertos en la transmisión (Velázquez-Monreal, 2001).

### **Muestreo y erradicación**

Con estudios realizados en Tamaulipas, se ha propuesto, en términos de la NOM-031-FITO-2000, la aplicación de un muestreo restrictivo de 9 hileras por 49 árboles, en torno a focos de infección (árboles positivos a CTV). Esta propuesta resulta en una disminución importante de los costos destinados por la Campaña a esta actividad de aproximadamente 99.2% (Loeza-Kuk, 2003). La NOM-031,

establece un muestreo sistemático del 10% de árboles por hectárea.

Ruiz-García y colaboradores (no publicado), en estudios espaciales evaluaron estadísticamente el muestreo restrictivo propuesto por Loeza-Kuk (2003), en siete huertas comerciales de Tamaulipas, encontrándose una dependencia espacial continua dentro del rango propuesto y en algunos casos a mayores distancias de las ya observadas. Esto hace suponer que la heterogeneidad de algunas de las condiciones en la región citrícola de Tamaulipas, tales como el clima, manejo, dinámica poblacional de áfidos vectores y vientos dominantes, deben considerarse para optimizar el tipo de muestreo con características específicas.

Góngora-Canúl 2004a, basado en análisis de autocorrelación, propuso que el muestreo restrictivo en estudios regionales en Tamaulipas puede ser de hasta 25 hileras por 90 árboles, dependiendo de las condiciones de la huerta.

Adicionalmente, se han evaluado estadísticamente la estabilidad de diferentes esquemas de muestreo sistemático: cuadrante simétrico, en hilera, entre hileras y árbol individual, simulando 10000 remuestreos comparando la precisión del error cuadrado y la exactitud en dos huertas comerciales de Tamaulipas con incidencias iniciales de tristeza de los cítricos de 5.72% y 3.47%. Para la huerta con la incidencia de 5.47% y una dependencia espacial

continua de 24 árboles por 9 hileras, el muestreo por cuadrante de 2x4 árboles en dirección de las hileras fue el más estable y preciso. Para la huerta con una incidencia inicial de 3.47% y una dependencia espacial continua fue de 9 hileras por 18 árboles, el muestreo de árboles individuales del 10% de la población fue más preciso y exacto. Los resultados anteriores sugieren la aplicación de un muestreo sistemático dependiente de la intensidad de agregación (Ruiz-García no publicado).

Simultáneamente, se estudió el efecto de la erradicación en el comportamiento de la dispersión del CTV en cuatro huertas comerciales de Tamaulipas, resultando que ésta es efectiva solo en huertas donde la incidencia inicial ha sido menor al 1%, mientras que en huertas con mayor incidencia inicial no lo ha sido, observándose un aumento hasta de un 3.4% después de realizada la erradicación (Ruiz-García no publicado).

#### **Evaluación de métodos de detección (DAS-ELISA vs Inmunoimpresión-directa)**

Existen diversas causas por lo que el programa oficial de erradicación no ha tenido el éxito esperado, una de ellas ha sido la falta de un método de detección altamente sensible y práctico, es decir, que permita el procesamiento de cientos de muestras en un periodo de tiempo corto, clásicamente se ha utilizado DAS-ELISA, sin embargo la

inmunoimpresión ELISA-directo, es una alternativa con potencial en sensibilidad, eficiencia y economía de costos (Loredo-Salazar et al., 2007; Rivas-Valencia et al., 2004), esto se fundamentó estadísticamente en estudios extensivos, determinando el número de impresiones (4 impresiones por árbol) para el diagnóstico del virus con 97% de confianza y 33.3% de ahorro (Ruiz-García et al., 2005).

#### **Manejo regional de la tristeza de los cítricos:**

##### **Caracterización de zonas de riesgo**

Atendiendo a la necesidad de establecer estrategias de manejo de la tristeza de los cítricos se planteó un enfoque regional en Tamaulipas, utilizando herramientas estadísticas multivariadas y sistemas de información geográfica (SIG) en estudios espaciales y temporales de 20 huertas comerciales con presencia de CTV (referenciando geográficamente 258 focos de infeccción) y 20 huertas comerciales sin CTV, que confirmó una dependencia espacial continua en agregados, el poco o nulo efecto de la erradicación en la dispersión del CTV y la importancia de los áfidos vectores diferentes a *T. citricida*. La intensidad de agregados de hasta 5 árboles en y entre hileras, permite sugerir tamaños de bloques de muestreo dentro de un área restrictiva.

Se establecieron tres diferentes zonas de intensidad de enfermedad, la dependencia espacial estatal de incidencia y dispersión fueron de 83.7 y 93.7 km, respectivamente

(Góngora-Canú1, 2004b), lo que nos provee de información importante para el manejo y la implementación de medidas de control de la enfermedad.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar-Ríos J. 2004. Caracterización de aislamientos mexicanos del Citrus tristeza closterovirus mediante polimorfismos conformacionales de cadena sencilla. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo. 71 p.
- Albiach-Martí M.R., J. Guerri, A. Hermoso de Mendoza, F. Laigret, J.F. Ballester-Olmos and P. Moreno. 2000b. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of Citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* 90: 134-138.
- Albiach-Martí M.R., M. Mawassi, S. Gowda, T. Satyanarayana, M.E. Hilf, S. Shanker, E.C. Almira, M.C. Vives, C. López, J. Guerri, R. Flores, P. Moreno, S.M. Garnsey and W.O. Dawson. 2000a. Sequences of Citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology* 74:6856-6865.
- Amin H.A., F. Fonseca, S. Santos and G. Nolasco. 2006. Typing of egyptian Citrus tristeza virus (CTV) isolates base don the capsid protein gene. *Phytopathologia Mediterranea* 45:10-14.
- ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria). 2006. La producción de cítricos en México y su competitividad en el mercado internacional. Claridades Agropecuarias. SAGARPA. Noviembre 2006. 159: 36-60.

- Ayllón M.A., L. Rubio, V. Sentandreu, A. Moya, J. Guerrri and P. Moreno. 2006. Variations in two gene sequences of citrus tristeza virus alter host passage. *Virus Genes* 32 (2) :119-128.
- Barbarossa L. and V. Savino. 2006. Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of citrus tristeza virus by dot-blot hybridization. *Journal of Phytopathology* 154 (6) :329-335.
- Barzegar A., H. Sohi and H. Rahimian. 2005. Comparative sequence analysis of coat protein gene of Iranian Citrus tristeza virus isolates. *Journal of Phytopathology* 153 (8) :457-463.
- Bassanezi R.B., A. Bergamin-Filho, L. Amorim, N. Gimenes-Fernandes, T.R. Gottwald, and J.M. Bové. 2003. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology* 93:502-512.
- Bassanezi R.B., P.T. Yamamoto e N. Gimenes-Fernandes 2002. Progresso dos sintomas de "morte súbita" em pomares de laranjeiras "Valencia" e "Pera". *Summa Phytopathologica* 28:23.
- Bull J.J., L.A. Meyer and M. Lachmann. 2005. Quasispecies made simple. *PLoS Comput Biol* 1 (6) :e61.
- Câmara de Diputados. 2007 "Antecedentes", sitio web: Citricultura. Consultado el 11 de noviembre de 2007. URL: [http://www3.diputados.gob.mx/camara/001\\_diputados/008\\_com](http://www3.diputados.gob.mx/camara/001_diputados/008_com)

isiones1x/002\_especiales/007\_citricultura/001\_presentacion/008\_antecedentes.

Cisneros-Hernández J. 2003. Diversidad y fluctuación de áfidos sobre brotes de cítricos en el municipio de Cuitláhuac, Veracruz. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo. 92 p.

D'Urso F., M.A. Ayllón, L. Rubio, A. Sambade, A. Hermoso de Mendoza, J. Guerrri and P. Moreno. 2000. Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. Plant Pathology 49:288-294.

Dodds J.A., T. Jarupat, J.G. Lee and C.N. Roistacher. 1987. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of Citrus tristeza virus. Phytopathology 77:442-447.

Dolja V.V., J.F. Kreuze, and J.P.T Valkonen. 2006 Comparative and functional genomics of closteroviruses. Virus Research 117:38-51.

Domingo E. 2002. Quasispecies theory in virology. Journal of Virology. DOI: 10.1128/JVI.76.1.463-465.

Drake J.W. and J.J. Holland. 1999. Mutation rates among RNA viruses. PNAS 96(24):13910-13913.

Febres V. J., R.F. Lee and G.A. Moore. 2007. Transgenic resistance to *Citrus tristeza* virus in grapefruit. Plant Cell Rep DOI 10.1007/s00299-007-0445-1.

- FAO (Food Agriculture and Organization of United Nations) .
2006. FAOSTATS. Consultado el 8 de noviembre. URL:  
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Franck A., H. Guillet, G. Jonard, K. Richards and L. Hirth. 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. Cell 21:285-294.
- Froissart R., D. Roze, M. Uzest, L. Galibert, S. Blanc and Y. Michalakis. 2005. Recombination every day: Abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. PLoS Biol 3(3) :e89.
- Gago-Zachert S.P., N.B. Costa, L. Semirile and O. Grau. 1999. Sequence variability in p27 gene Citrus tristeza virus (CTV) revealed by SSCP analysis. Electronic Journal of Biotechnology Vol. 2 No.1 Issue of April 15, 1999.
- Gaona-García G., E. Ruiz-Cancino y R. Peña-Martínez. 2000. Los pulgones (Homóptera: Aphididae) y sus enemigos naturales en la naranja, *Citrus sinensis* (L.), en la zona centro de Tamaulipas, México. Acta Zoológica Mexicana 81:1-12.
- García-Arenal F., A. Fraile and J.M. Malpica. 2001. Variability and Genetic structure of plants virus populations. Annual Review of Phytopathology 39:157-186.
- Garnsey S.M., D.J. Gumpf, C.N. Roistacher, E.L. Civerolo, R.F. Lee, R.K. Yokomi, Bar-Joseph M. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological

properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica.* 19(2) :151-157.

Gimenes-Fernandes N. e R.B Bassanezi 2001. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. *Summa Phytopathologica* 27:93.

Goelet P., G.P. Lomonossoff, P.J.G. Butler, M.E. Akam, M.J. Gait and J. Karn. 1982. Nucleotide sequence of Tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 79:5818-5822.

Góngora-Canúl C., P. Rivas-Valencia, N. Ruiz-García, E. Loenza-Kulk, G. Mora-Aguilera, D. Ochoa-Martínez, M.A. Gutiérrez-Espinosa and R. Álvarez-Ramos. 2004a. Spatial Pattern of Citrus Tristeza in Tamaulipas, México. American Phytopathological Society, Annual Meeting. Anaheim, California, Agosto, 2004. *Phytopathology* 94: Publication no. P-2004-0234-AMA.

Góngora-Canúl C. 2004b. Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del citrus tristeza closterovirus en Tamaulipas, México. Tesis de Maestría. Instituto de Fitossanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillos. 145 p.

Habili N. 1992. Detection of australian field isolates of citrus tristeza virus by double stranded RNA analysis. *Journal of Phytopathology* 138: 307-316.

Hernández-Torres I., J. I. López-Arroyo Y J. Loera-Gallardo. 2007. Control del pulgón café de los cítricos *Toxoptera*

citricida Kirkaldy (Homoptera: aphididae) con hongos entomopatógenos. In: Memorias de la 2<sup>a</sup>. Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal 19-21 de septiembre Guadalajara, Jal.

Herrera-Isidrón L. 2004. Caracterización biológica y molecular de aislados del virus tristeza de los cítricos (CTV) en México. Tesis doctoral. CINVESTAV-Irapuato. 185 p.

Hill M.E., V.A. Mavrodieva and S.M. Garnsey. 2005. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. Phytopathology 95(8):909-917.

Huang Z., P.A. Rundell, X. Guang and C. A. Powell. 2004. Detection and isolate differentiation of Citrus tristeza virus in Infected fields trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease 88:625-629.

Iglesias N.G., S.P. Gago-Zachert, G. Robledo, N. Costa, M.I. Plata, O. Vera, O. Grau and L.C. Semorile. 2007. Population structure of Citrus tristeza virus from field argentinean isolates. Virus Genes DOI 10.1007/s11262-007-0169-x.

IPN (Instituto Politécnico Nacional). 2006. Aislamiento politécnicos genoma del virus causante de graves daños y pérdidas en cítricos. Comunicado de prensa. Coordinación

General de Comunicación Social y Divulgación, Instituto Politécnico Nacional 20 de julio.

Jarupat T., J.A. Dodds and C.N. Roistacher. 1988. Effect of host passage on dsRNAs of two strains of citrus tristeza virus. In: 10<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists 39-45.

Jesus-Junior W.C., and R.B. Bassanezi. 2004. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. Fitopatologia Brasileira 29:399-405.

JianKun Z., H. Ni and W. GuoPing. 2006b. Analysis of mixed infection of Citrus tristeza virus in China by SSCP. Journal of Fruit Science 23(3) :346-349.

JianKun Z., H. Ni and W. GuoPing. 2006a. Analysis of sequence variability in CP gene of Citrus tristeza virus. Journal of Agricultural Biotechnology 14 (2) :259-264.

Kano T., T. Natsuaki, M. Isaka, G. Suastika, S. Okuda and H. Ieki. 2006. Restriction fragment length polymorphism analysis of Citrus tristeza virus isolates in Japan and its application to cross-protection experiments. Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science 5:63-70.

Karasev A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. Annual Review of Phytopathology 38:293-324.

Karasev A.V., V.P. Boyko, S. Gowda, O.V. Nikolaeva, M.E. Hilf, E.V. Koonin, C.L. Nibblet, K. Cline, D.J. Gumpf, R.F. Lee, S.M. Garnsey, D.J. Lewandowsky and W.O. Dawson.

1995. Complete sequence of the Citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208:511-520.
- Kong P., L. Rubio, M. Polek and B. Falk. 2000. Population structure and genetic diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes* 21(3):139-145.
- Lázaro E., C. Escarmis, J. Pérez-Mercader, S. C. Manrubia and E. Domingo. 2003. Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: Study of decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *PNAS* 100(19):10830-10835.
- Loeza-Kuk E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del Citrus Tristeza Closterovirus. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo. 85 p.
- Loeza-Kuk E., E.C. Palacios-Torres, D.L. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, M.A. Gutiérrez-Espinosa, V.J. Febres, G.A. Moore and R. Álvarez-Ramos. 2005. Molecular characterization of citrus tristeza virus isolates from Veracruz and Tamaulipas status, Mexico. Proceedings of the 16<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists 407-411.
- López-Arroyo J. I., J. Loera Gallardo, M. A. Reyes Rosas y M. A. Rocha Peña 2003. Estado actual de las plagas potenciales de los cítricos en México ¿Es la oportunidad para el uso de depredadores?, pp. 249-263. In: Memorias del XIV Curso Nacional de Control Biológico. Sociedad

Mexicana de Control Biológico. Noviembre 3-5 2003.  
Guadalajara, Jalisco, Méx.

López-Arroyo J.I. 2001. Depredadores de áfidos asociados a los cítricos en Nuevo León, México. Memorias del XXXVII Congreso Nacional de Entomología. Querétaro, México 15-18 de julio. E153.

Loredo-Salazar X.R., S.A Curti-Díaz y M. A. Peña del Río. 2007. Experiencias regionales sobre el diagnóstico del VTC con la técnica serológica ELISA-Immunoimpresión. In: Memorias 1<sup>a</sup>. Semana Internacional de la Citricultura, Martínez de la Torre, Veracruz 26 de noviembre al 1 de diciembre.

Marques N.T., A.M. Bayley, C.L. Nibblet and G. Nolasco. 2006. Differentiation of *Citrus tristeza* virus (CTV) isolates by cleavage fragment length polymorphism (CFLP) analysis of the major coat protein gene. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (2) : 99-109.

Mawassi M., E. Mietkiewska, R. Gofman, G. Yang and J.M. Bar-Joseph. 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza* virus. *Journal of Genetic Virology* 77:2359-2364.

Medina-Urrutia V.M., M.M. Robles-González, J. Velazquez-Monreal y R. Ortega-Arreola. 2007. Mejoramiento genético de los cítricos: panorama mundial In: Memorias de la 2<sup>a</sup>. Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal 19-21 de septiembre Guadalajara, Jal.

Mendoza A., C. Salazar, O. Alvarado, M.A. Cruz, y H. Barrera. 2003. Diferenciación molecular de razas severas y débiles de aislamientos del virus tristeza de los cítricos en México. Revista Fitotecnia Mexicana 26:223-230.

Michaud J. P. and R. Alvarez-Ramos. R. 2000. First collection of Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae) in Quintana Roo, Mexico, Florida Entomologist 83:357-358.

Moreno P., J. Guerrí, J.F. Ballester-Olmos, R. Albiach-Martí and M.E. Martínez. 1993. Separation and interference of strains from citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. Plant Pathology 42:35-41.

Moya A., S.F. Elena, A. Bracho, R. Miralles and E. Barrio. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. PNAS 97(13):6967-6963.

Müller G.W., M.L. Targon and M.A. Machado. 2000. Thirty Years of Preimunized Pera Sweet Orange in the Citricultura in São Paulo State, Brazil. In: Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 400-403.

Narváez G., B.S. Skander, M.A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerrí and P. Moreno. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridization with

digoxigenin-labelled cDNA probes. J. Virol. Methods 85:83-92.

Nolasco G. F. Fonseca and G. Silva. 2007. Occurrence of genetic bottlenecks during citrus tristeza virus acquisition by *Toxoptera citricida* under field conditions. Archives of Virology DOI 10.1007/s00705-007-1089-8.

Padrón-Chávez J.E., M.J. Martínez y S. De la Fuente. 2006. Adaptación de patrones tolerantes al virus tristeza de los cítricos en Nuevo León. In: Memorias 1<sup>a</sup>. Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal 4-8 septiembre, Mérida, Yucatán p. 131.

Palacios-Torres E. C. 2001. Transformación genética de pomelo cvs. "Marsh" y "Star Ruby" (*Citrus paradisi*) Y naranjo dulce cv. "Valencia" (*C. sinensis*) con el gen de la capa proteica del Citrus tristeza closterovirus. Colegio de Postgraduados. 92 p.

Palacios-Torres E. C., Gutiérrez-E. M. A., Febres V., Ochoa-Martínez D. L., Moore G. A. 2003. Genetic transformation of *Citrus aurantium* L. with a double construct from Citrus Tristeza Closterovirus. Pan American Plant Disease Conference, South Padre Island, Texas USA. 6-10 April.

Palacios-Torres E.C. 2007. Clonación y secuenciación de genes del Citrus tristeza closterovirus y su uso en la

- transformación genética de cítricos. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 253 p.
- Pappu H.R., A.V. Karasev, E.J. Anderson, S.S. Pappu, M.E. Hilf, V.J. Febres, M.R.G. Eckloff, M. McCaffery, V. Boyko, S. Godwa, V.V. Dolja, E.V. Koonin, D.J. Gumpf, R.C. Cline, S.M. Garnsey, W.O. Dawson, R.F. Lee and C.L. Nibblet. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open frames of the *citrus tristeza closterovirus* genome. *Virology* 199: 35-46.
- Peña-Martínez R. 2001. Avances en el conocimiento de los áfidos en México. In: Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Entomología. Querétaro, México 15-18 de julio. E3-10.
- Peña-Martínez R., N. Villegas-Jiménez, J.R. Lomelí-Flores, A.G. Trejo-Loyo. 2004. Monitoring citrus aphids in Mexico. In: Aphids in a new millennium. Proceedings of the Six International Symposium on Aphids 355-357.
- Rivas-Valencia P., C.C. Góngora-Canúl, N. Ruiz-García, G. Mora-Aguilera, R. Álvarez-Ramos, D.L. Ochoa-Martínez y M.A. Gutiérrez-Espinoza. 2004. Análisis comparativo de dos técnicas serológicas en la detección de CTV: Inmunoinpresión ELISA-Directo vs DAS-ELISA. In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología/VI Congreso Internacional de Fitopatología. Veracruz, Ver. 25-28 Julio. L-62.

Rodríguez-Cuevas M., P. Ruiz-Beltrán, C.F. Ortiz-García y S.A. Curtí-Díaz. 2007. Producción de limón persa en patrones tolerantes al CTV en suelos ácidos de Tabasco, México. In: Memorias del Congreso Latinoamericano y del Caribe de Fitopatología. Cancún, Quintana Roo 20-24 de mayo. C221.

Román R.C., E.A. Gutiérrez, B.E. Pérez-Molphe, C.R. Gutiérrez y L.M. Gómez. 2003. Producción de plantas transgénicas de cítricos que pudiesen expresar resistencia a patógenos. Pan American Plant Disease Conference, South Padre Island, Texas USA. 6-10 April.

Rubio L., M.A. Aylón, P. Kong, A. Fernández, M. Polek, J. Guerra, P. Moreno and B. W. Falk. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. Journal of Virology 75(17):8054-8062.

Ruiz-García G. Mora-Aguilera P. Rivas-Valencia D. Ochoa-Martínez C. Góngora-Canúl C., Loeza-Kuk E., Gutiérrez-Espinosa A., Ramírez-Valverde G. and Álvarez-Ramos R. 2005. Probability model of CTV detection on the tree canopy, and confiability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 196-203 pp.

Ruiz-Ruiz S. P. Moreno, J. Guerra and S. Ambrós. 2006. The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting

isolate of *Citrus tristeza* virus from Spain: Comparison with isolates from different origins. Archives of Virology 151 (2) : 387–398.

Sambade A., L. Rubio, S.M. Garnsey, N. Costa, G.W. Müller, M. Peyriu, J. Guerri and P. Moreno. 2002. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza* virus: application to monitoring cross-protection. Plant Pathology 51:257–265.

Sambade A., S. Ambrós, C. López, S. Ruiz-Ruiz, A. Hermoso de Mendoza, R. Flores, J. Guerri and P. Moreno. 2007. Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza* virus in plants co-inoculated with mild and severe variants. Archives of Virology DOI 10.1007/s00705-006-932-7.

Sánchez-Anguiano, H. M. 2003. Avances del programa nacional de reconversión productiva de la cadena citrícola en México, pp. 150–151. In: Memorias del primer Simposio Internacional de Citricultura Oaxaca 2003. COECIO A.C., SAGARPA, INIFAP, SEDAF, FPOaxaca. Puerto Escondido, Oax., Septiembre 10–12 de 2003.

Sentandreu V., J.A. Castro, M.A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerri, F. González-Candela, P. Moreno and A. Moya. 2006. Evolutionary analysis of genetic variation observed in citrus tristeza virus (CTV) alter host passage. Archives of Virology 151:875–894.

- Silva-Vara S., M.A. Peña del Río, R. Peña-Martínez, N. Villegas-Jiménez, K. Byerly-Murphy y M. Rocha-Peña. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. Agrociencia 35:441-450.
- Souza A.A., G.W. Müller, M.L. Targon, M.A. Takita and M. Machado. 2002. Stability of the Mild Protective "PIAC" Isolate of Citrus Tristeza Virus. In: Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 131-135.
- Suastika G., T. Natsuaki, H. Terui, T. Kano, H. Ieki and S. Okuda. 2001. Nucleotide sequence of Citrus tristeza virus seedling yellows isolate. J. Gen. Plant. Pathol. 67:73-77.
- Tapia-Campos E., M. A. Gutiérrez-Espinosa, M. L. Warburton, A. Santacruz-Varela and A. Villegas-Monter. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Interciencia 30 (11) :687-693 pp.
- Velázquez-Monreal J.J. 2001. Segregation of citrus tristeza virus strains within individual trees. In: Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología y VI Congreso Internacional de Fitopatología. Veracruz, Ver. 25-28 de julio. C-54.
- Villegas-Jiménez. N. 2000. Afidofauna alada (Homoptera: Aphididae) de la región citrícola del municipio de

- General Terán. 1996-1997. Tesis Profesional. Instituto Politécnico Nacional. 120 p.
- Vives M.C., L. Rubio, C. López, J. Navas-Castillo, M.R. Albiach-Martí, W.O. Dawson, J. Guerri, R. Flores and P. Moreno. 1999. The complete genome sequence of the major component of a mild Citrus tristeza virus isolate. Journal Genetic Virology 80:811-816.
- Weng Z., R. Barthelson, S. Gowda, M.E. Hillf, W.O. Dawson, D.W. Galbraith and Z. Xiong. 2007. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. PLoS ONE 2 (9) : e917. doi:10.1371/journal.pone.0000917.
- Worobey M and E.C. Holmes. 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. Journal of General Virology 80:2535-2543.
- Yang Z.N., D.M. Mathews, J.A. Dodds and T.E. Mirkov. 1999. Molecular characterization of an isolate of Citrus tristeza virus that causes severe symptoms in sweet orange. Virus Genes 19:131-142.
- Zhen S., Z. ChangYong, Z. Yan, W. XueFeng and T. Kezhi. 2006. Molecular identification of Citrus tristeza virus isolates from pummelos. Chinese Journal of Virology 22 (4) :314-319.

**III. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE AISLAMIENTOS DEL CITRUS  
TRISTEZA VIRUS Y SU ASOCIACION CON LA MUERTE SÚBITA DE LOS  
CÍTRICOS EN BRASIL**

**POPULATION STRUCTURE OF CITRUS TRISTEZA VIRUS ISOLATES AND  
ASSOCIACION WITH CITRUS SUDDEN DEATH IN BRAZIL**

Patricia Rivas-Valencia<sup>1</sup>, Emiliano Loeza-Kuk<sup>1</sup>, Gustavo Mora-Aguilera<sup>1\*</sup>, Vicente Febres<sup>2</sup>, Daniel Ochoa-Martínez<sup>1</sup>, Ma. Alejandra Gutiérrez-Espinosa<sup>3</sup>, Waldir Cintra de Jesus-Junior<sup>4</sup>, Celia Correia-Malvas<sup>5</sup> y Nelson Arno-Wulff<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Fitopatología y <sup>3</sup>Fruticultura. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México, C.P. 56230 . (morag@colpos.mx). <sup>2</sup>University of Florida, Gainesville, FL, USA. <sup>4</sup>UFES, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil. <sup>5</sup>FUNDECITRUS A.C. CEP 14807-040, Araracuara, SP, Brasil.

**RESUMEN**

La etiología de la enfermedad muerte súbita de los cítricos (MSC) y su relación con una variante severa del virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) es desconocida. Para estudiar esta posible relación se estudiaron cinco poblaciones de 100 árboles cada una, en regiones con y sin presencia de MSC, en huertas comerciales de los estados de São Paulo y Minas Gerais, Brasil. En las

huertas con MSC se observó una decoloración foliar, defoliación, reducido crecimiento vegetativo y eventualmente muerte del árbol. El objetivo de este estudio fue caracterizar la estructura poblacional de aislamientos de CTV presentes en ambas regiones con el fin de conocer si existe una relación con la MSC. Únicamente 96/500 muestras amplificaron para el gen de la capa proteica (CP) del CTV, mismas que fueron sometidas a hibridación con sondas específicas y a un análisis de conformación polimórfica de cadena simple de ADN (single-strand conformation polymorphism, SSCP). Los porcentajes de hibridación con sondas específicas para aislamientos severos de CTV fueron de 79.60% y 84.67% en la región con y sin MSC, respectivamente, por lo que no se encontró una asociación de aislamientos severos con MSC. El análisis SSCP determinó la presencia de hasta cinco haplotipos en un solo árbol en regiones con MSC y hasta siete en regiones sin MSC. No se encontró algún patrón dominante. El análisis de varianza molecular (AMOVA) estimó una mayor variación dentro de poblaciones que entre regiones, lo que indica una estructura poblacional heterogénea con origen local. Con los datos obtenidos no se determinó una relación directa entre aislamientos severos de CTV y la MSC, aunque no se descarta algún tipo de relación del CTV con la MSC.

**Palabras clave:** Citrus tristeza virus, hibridación, sondas específicas, SSCP.

## ABSTRACT

The etiology of citrus sudden death (CSD) and its relationship with a severe variant of the citrus tristeza virus (*Citrus tristeza virus*, CTV) is unknown. To discover a possible relationship, a study was made of five populations of 100 trees each one, in regions with and without CSD presence, in commercial orchards of the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. In the orchards with CSD, foliar discoloration was observed, along with defoliation, reduced vegetative growth and eventually tree death. The objective of the present study was to characterize the population structure of CTV isolates present in both regions with the purpose of etiologically associating CTV with CSD. Only 96/500 amplified for the gene of the coat protein (CP) of the CTV, which were subjected to hybridization with specific probes and to an analysis of single-strand conformation polymorphism (SSCP). The percentages of hybridization with specific probes for severe CTV isolations were 79.60% and 84.67% in the region with and without CSD. Therefore, no definite association was found of severe isolations with MSC. The SSCP analysis determined the presence of up to five haplotypes in a single tree in regions with CSD, and as many as seven in regions without MSC. A dominant pattern was not found. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed a greater variation within populations than among regions, which indicates a heterogeneous population structure with

local origin. With the data obtained, no direct relationship was determined between severe CTV isolates and CSD, but the possible involvement of CTV in the new syndrome was not discarded.

**Key words:** Hybridization, specific probes, SSSCP.

## INTRODUCCIÓN

La tristeza de los cítricos, ocasionada por el Citrus tristeza virus (CTV), es producto de una población constituida por distintos aislamientos biológicamente dinámicos (Weng *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2004). El virus, detectado en Brasil en 1934, ha causado la muerte de más de 100 millones de árboles en América del Sur, Estados Unidos de Norteamérica, Israel y España (Müller *et al.*, 2000; Cambra *et al.*, 2000). El CTV puede encontrarse en todas las especies y variedades de cítricos en Brasil como resultado de su carácter endémico y por los programas intensivos de protección cruzada (Souza *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2000). En 1999, se reportó un síndrome denominado muerte súbita de los cítricos (MSC) en 500 árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) injertados en limón cravo (*C. limonia*), una de las combinaciones más exitosas para el control genético del CTV (Bassanezi *et al.*, 2003). Actualmente, la MSC ha afectado más de 2 millones de árboles. Los síntomas y el progreso epidemiológico de la MSC es análogo al declinamiento de los cítricos, causado por aislamientos

severos del CTV (Jesus-Junior y Bassanezi, 2004; Bassanezi et al., 2003). En consecuencia, una hipótesis propuesta es que el agente causal de la MSC es una variante nueva del CTV (Bassanezi et al., 2003).

En México no existe la MSC ni aislamientos severos del CTV en alta prevalencia; sin embargo, el riesgo de epidemias de alta intensidad ante la introducción de *Toxoptera citricida*, considerado el vector más eficiente del CTV, obliga a estudiar los mecanismos intrínsecos del patógeno para adaptarse e inducir nuevas epidemias y eventualmente mitigarlas mediante los principios de exclusión y erradicación. Con este fin se realizó el presente trabajo en las condiciones de Brasil, con el objetivo de efectuar un estudio comparativo a nivel molecular de la estructura poblacional del CTV, en regiones con aislamientos de tipo severo, y con presencia y ausencia de MSC para auxiliar al entendimiento etiológico y epidémico de este síndrome.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del área de estudio

El estudio se llevó a cabo de septiembre a noviembre de 2005. Se realizaron muestreos con ayuda de personal de campo de FUNDECITRUS A.C.<sup>1</sup> en cinco huertas comerciales ubicadas en los estados de São Paulo (SP) y Minas Gerais (MG). En la

<sup>1</sup> Fundo de Defensa da Citicultura, A.C. Av. Adhemar Pereira de Barros, 201 CEP 14807-40 Aracauara, São Paulo, Brasil.

región de SP los árboles mostraban algunos síntomas de tristeza, como picado de tallo así como la presencia de aislamientos severos y moderados de CTV, detectados previamente por personal de FUNDECITRUS A.C. En las huertas de MG se observó la presencia de árboles con síntomas de MSC (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características agronómicas de las huertas muestradas con respecto al CTV y MSC en las localidades citrícolas de São Paulo (SP) y Minas Gerais (MG), Brasil.

<b>Localidad y Nombre de</b>	<b>Huerta</b>	<b>Sanidad<sup>†</sup></b>	<b>portainjerto</b>	<b>Manejo<sup>‡</sup></b>
<b>Injecto/</b>				
<b>Estado</b>				
Capela do Alto, SP	CA	- MSC/Picado tallo <sup>§</sup>	Pera/Cravo	++
Capão Bonito, SP	CB	- MSC / CTV severo	Pera/Cravo	++
Botucatu, SP	BT	- MSC / CTV moderado	Pera/Cravo	++
Comendador Gomes MG	NM	+ MSC / CTV moderado	Hamlin/cravo	+++
Uberlândia, MG	SV	+ MSC / CTV moderado	Pera/Cravo	+++

<sup>†</sup>MSC= muerte súbita de los cítricos; CTV= Citrus tristeza virus;

<sup>§</sup>picado de tallo = síntoma severo de tristeza.

<sup>‡</sup> Manejo: ++ tecnificado, +++ Altamente tecnificado.

El muestreo fue dirigido a árboles con algún grado de intensidad de síntomas de declinamiento, según escala de severidad propuesta por Bassanezzi et al. (2003). De los 500 árboles muestreados se recolectaron hojas jóvenes (última brotación) en los cuatro puntos cardinales a una altura

promedio de 1.50 m, para su procesamiento molecular en las instalaciones de FUNDECITRUS A.C.

### **Extracción de RNA y RT-PCR de un paso para la amplificación parcial y total de la capa proteica (CP)**

Se utilizó Trizol® Reagent (Invitrogen™) para la extracción de RNA total de cada muestra a partir de 100 mg de hoja fresca, según protocolo del fabricante. Se amplificó la CP total por RT-PCR de un paso utilizando 5 µL de ARN total precalentado por 5 min a 65°C, mezclado en un volumen final de 50 µL usando 10x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de DTT, 200 µM de dNTP's, 0.5 µL (100 ng·µL<sup>-1</sup>) de los iniciadores HCP1 5' ATGGACGACGAAACAAACAA3' y HCP2 5' TCAACGTGTGTTGAATTTC 3' (Huang *et al.*, 2004), 20 unidades de RNaseout (Invitrogen™), 50 unidades de M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen™) y 1.25 unidades de Taq DNA Polymerase (Promega™). La RT-PCR se llevó a cabo con un ciclo de 60 min a 42°C, 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C y un periodo de extensión final de 10 min a 72°C. El producto de la amplificación (672 pb) se analizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. También se amplificó una parte del gen p25 que codifica a la CP en el extremo 3' (273 pb) con 0.5 µL (100 ng·µL<sup>-1</sup>) de los iniciadores específicos CPKF 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA3' y CPKR 5' TCAACGTGTGTTGAATTTC 3' (Kong *et al.*, 2000).

El producto de la amplificación se analizó en gel de agarosa al 1%, 50 min a 100 V y teñido con bromuro de etidio.

### **Análisis de la conformación polimórfica de la cadena sencilla de ADN (single-strand conformation polymorphism, SSCP)**

El SSCP detecta mutaciones y cambios puntuales de bases en fragmentos de ADN del mismo tamaño (polimorfismo) (Kong et al., 2000). La identificación de los patrones de SSCP se realizó a partir del producto de PCR de parte del gen p25 de la CP (273 pb). Se tomaron 5 µL del producto de amplificación y se desnaturalizó por 10 min a 99°C en un volumen de solución desnaturalizante (95% formamida, 20 mM EDTA, bromofenol azul y xilen-cianol). Los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en una cámara BIORAD Protean II (16x20cm x 1mm) con amortiguador TBE 1x a 200 v por 2 h 30 min a temperatura ambiente (TA); el gel fue teñido con plata según el protocolo de Beidler et al. (1982).

### **Síntesis y marcaje de sondas**

Para evaluar la estructura poblacional con la finalidad de detectar la prevalencia de aislamientos que pudieran ser responsables en la etiología de la MSC, se sintetizaron seis oligonucleótidos que se utilizaron como sondas y que fueron diseñadas a partir de diferencias de bases en la capa

proteíca de los aislamientos originarios de diferentes regiones geográficas (Cevick et al., 1996) (Cuadro 2). El marcaje de las sondas se realizó con digoxigenina (DIG) utilizando el 'DIG DNA Labeling Kit', (Roche™), siguiendo el protocolo del fabricante. Estas sondas no habían sido utilizadas en Brasil para este tipo de estudio.

Cuadro 2. Sondas específicas para la diferenciación de aislamientos de CTV.

<b>Sonda</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tipo de aislamiento de CTV que detecta</b>
I	GGATGGATGTGAA	Universal
II	GAAATCCGCACACAAGT	T-36 y otros (declinamiento rápido)
III	TGACGCCACGTCACTCAT	B-53 y otros (picado de tallo)
V	CCACTTCGACGCCCT	B-185, B-165, B-7 (declinamiento y picado de tallo)
VII	ACACCCGGTTATCATCGT	B-128, B-249 (picado de tallo)
	CCGCTAAATCGGTATA	T-30 y otros (aislamientos moderados de Florida)

#### **Dot blotting, hibridación y revelado**

El producto obtenido de PCR con los iniciadores HCP1 y HCP2 se diluyó con 10X de citrato de sodio salino (SSC) para obtener un volumen final de 50 µL. Las muestras se colocaron en una membrana de nylon (Hybond N+) con un aparato para dot blot (Gibco™). Subsecuentemente se desnaturalizó al ADN

incubando la membrana en 0.4 M NaOH por 10 min a TA con agitación suave (AS). Posteriormente se incubó la membrana en 0.2 M Tris-Cl pH 8.0, 0.1% SDS y 1X SSC a TA por 10 min. Después se fijó el ADN de la membrana con rayos ultravioleta a 50 mJ por 3 min. Se prepararon 4 membranas de 9x12 cm con 6 repeticiones y se almacenaron a 4°C. La prehibridación de las membranas se realizó a 37°C por una hora con AS en tubos de vidrio para hibridación (Hybaid™) en 20 ml de solución de prehibridación (5x SSC, 0.02% SDS, 1% reactivo bloqueante de Roche™). Se descartó la solución de prehibridación y se agregaron 20 ml de solución de hibridación precalentada conteniendo 9 pmol de sonda marcada. Las membranas se mantuvieron en esta solución toda la noche a 37°C con AS en una estufa de hibridación Hybaid™. Al siguiente día, las membranas fueron lavadas con 6X SSC a TA por 5 min en AS y dos veces con 4X SSC conteniendo 0.1% SDS a 45°C por 10 min (sondas I, II, III, VI) y a 55°C por 10 min (sonda V). Adicionalmente se hicieron dos lavados con solución de maleato 1M pH 7.5 y 0.3% Tween 20 por 15 min y uno con solución de maleato por 5 min. Para el revelado de las membranas, se agregó una solución con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche™) (dilución: 1/10000) y se incubaron por 30 min a TA, se lavaron dos veces por 15 min con solución de maleato y 0.3% Tween 20; y finalmente con 20 ml de Tris-NaCl pH 9.5 por 5 min. La detección quimioluminiscente se realizó con disodio

fenilfosfato (CSPD, Roche™) siguiendo el protocolo del fabricante. Las membranas se expusieron a películas de rayos X por 12 horas. Para el revelado de las películas se usaron revelador y fijador Kodak®.

### Análisis de datos

Para comparar los aislamientos de las diferentes regiones geográficas, se construyeron dos matrices a partir del coeficiente de Nei y Li (1979), con vectores de presencia (1) y ausencia (0) de señal de hibridación y de bandas de SSCP. Con cada una de las matrices se generaron dendrogramas por el método de promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA), usando el programa NTSYSpc ver. 2.10L. Para cada caso se calculó un análisis de varianza molecular (ANOVA) a través del programa GenAlEx6 (Peakall y Smouse, 2006).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Brasil todos los árboles son preimunizados con un aislamiento moderado de CTV, por lo que se esperaba que la totalidad de las muestras (500) sometidas a RT-PCR amplificaran el fragmento correspondiente al tamaño de la CP (672 pb) (Huang et al. 2004). Sin embargo, sólo 96 muestras amplificaron (Cuadro 3). Esto pudo deberse a que la época de toma de muestras no fue la adecuada (septiembre), ya que no se recomienda realizar el muestreo en épocas muy cálidas ya

que se limita la replicación del virus (Cambra *et al.* 2000), o debido a que el ARN tuviera contaminantes que inhibieron la reacción de PCR, como polisacáridos o fenoles (P. Moreno<sup>2</sup>, comunicación personal). Por otro lado, en las huertas ubicadas en Capela do Alto, Capão Bonito y Botucatu, la calidad del material vegetal recolectado no fue óptimo, debido a que presentaban un estrés hídrico evidente, consecuencia de un manejo menos tecnificado, comparado con las huertas de MG y que corresponden con el menor número de muestras amplificadas con HCPI/HCP2 (Cuadro 3). Por la gran heterogeneidad de aislamientos presentes en Brasil (Müller *et al.*, 2000), es posible que los iniciadores utilizados pudieran seleccionar sólo algunos haplotipos, excluyendo a otros, subestimando así la diversidad genética presente en la región. Esto se ha confirmado con aislamientos de California (Kong *et al.*, 2000).

El porcentaje de hibridación con las sondas específicas en regiones con y sin MSC fue de 79.60% y 84.67%, respectivamente (Cuadro 3).

La mayor variabilidad observada entre los aislamientos de CTV dentro de las poblaciones puede ser explicada por los cambios de las poblaciones del virus dentro del árbol como consecuencia de las frecuentes inoculaciones de áfidos vectores presentes (Weng *et al.*, 2007; Sentandreu *et al.*,

<sup>2</sup> Dr. Pedro Moreno. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada - Náquera, Km. 4,5 Moncada (Valencia), España. e-mail: pmoreno@ivia.es

2006) . Con la sonda 0 (universal), 55 / 65 muestras hibridaron; sin embargo, las 10 muestras restantes, hibridaron con alguna otra sonda. En contraste, con esta misma sonda en ausencia de MSC, hibridaron 29 / 31 muestras (Cuadro 3), lo que sugiere que aunque la sonda fue diseñada a partir de diversos aislamientos de diferentes regiones geográficas del mundo, puede no ser absolutamente universal para las condiciones específicas de Brasil, considerando en especial la presión de inóculo, la dinámica poblacional de áfidos vectores, en especial *Toxoptera citricida*, así como las condiciones climáticas (Souza et al., 2002) .

Cuadro 3. Muestras amplificadas con los iniciadores HCP1/HCP2 (672 pb) para la capa proteica del CTV e hibridación con sondas específicas en la diferenciación de aislamientos de CTV presentes en regiones con y sin MSC en Brasil.

Localidad y Estado	# muestras amplificadas con HCP1/HCP2	# muestras hibridadas por sonda huerta					
		0	I	II	III	V	VI
<b>Ausencia de muerte súbita de los cítricos</b>							
Capela do Alto, SP	5	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	0/5
Capão Bonito, SP	6	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	0/6
Botucatu, SP	20	18/20	13/20	16/20	16/20	19/20	0/20
Subtotal	31	29/31	22/31	26/31	27/31	30/31	0/31
<b>Presencia de muerte súbita de los cítricos</b>							
Comendador Gomes, MG	32	30/32	25/32	15/32	27/32	27/32	0/32
Uberlândia, MG	33	25/33	18/33	31/33	32/33	32/33	0/33
Subtotal	65	55/65	43/65	46/65	59/65	59/65	0/65
TOTAL	96	84/96	65/96	71/96	86/96	89/96	0/96

Debido a que una muestra puede exhibir poblaciones complejas de mezclas de diferentes genotipos virales de CTV, no es extraño que este resultado se deba a diversos eventos de recombinación, es decir procesos de inserción de segmentos de información genética entre las cadenas de

nucleótidos de diferentes variantes génicas durante el proceso de replicación (Weng et al., 2007; García-Arenal et al., 2001).

La asociación de sintomatología atribuible a aislamientos severos de CTV con MSC no fue determinante. Se obtuvieron menor número de muestras hibridadas para la sonda I (declinamiento rápido) y II (picado de tallo), en Comendador Gómez (25/32 y 15/32, respectivamente) y Überlândia con presencia del MSC (18/33 y 31/33, respectivamente, Cuadro 3).

La no hibridación con la sonda VI (específica para los aislamientos tipo T-30 y otros no severos de Florida) puede deberse a que este tipo de aislamiento se encuentre relacionado con otros de origen asiático como de Taiwán (B252), además de Colombia (B272) y California (B354) (Roischaster y Moreno, 1991) y no con los de Brasil. El análisis de varianza molecular (AMOVA) calculada resultó con un 91% de variabilidad dentro de poblaciones y un 9% de variación entre regiones con y sin MSC (Cuadro 4), lo cual indica una compleja heterogeneidad e interacción existente entre los aislamientos de CTV presentes en la muestra (que corresponde a una planta), lo que limita el reconocimiento de los sitios de alineamiento de las sondas.

Cuadro 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de presencia y ausencia de señal de hibridación de muestras amplificadas con parte del gen p25 de la capa proteica de aislamientos de CTV de cinco regiones geográficas de Brasil.

**Fuentes de variación**    G1<sup>†</sup>    **Estimadores**    % de **Significancia<sup>‡</sup>**

	de varianza	variación		
Entre regiones geog.	4	0.055	9.0	0.0892
Dentro de regiones geog.	92	3.562	91.0	---

<sup>†</sup>Grados de libertad.

<sup>‡</sup>Probabilidad de ocurrencia de valores de varianza de  $\varphi$  stat más extremos que los observados.

El dendrograma construido con una matriz de datos de ausencia/presencia de señal de hibridación generó 2 grupos, de los cuales uno incluye casi todas las muestras (93) (Figura 1), con un coeficiente de similaridad de 0.63; 62/65 muestras con MSC se agruparon con la condición severa o moderada. Por tanto, no hubo una asociación clara entre la sintomatología atribuida a aislamientos severos de CTV y MSC. Sin embargo, sí se puede asociar la MSC con el CTV, ya que no se excluyeron en grupos distintos (Figura 1).

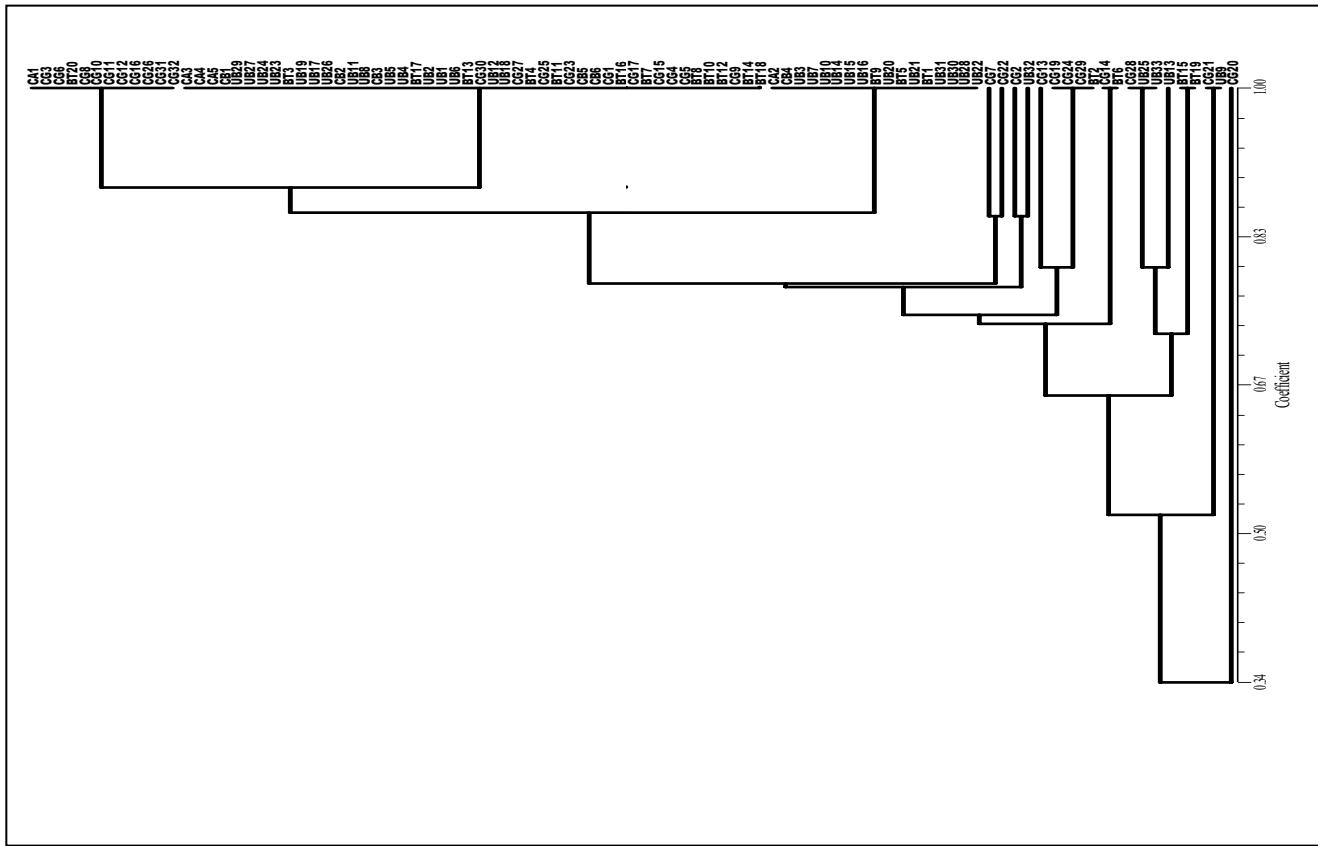


Figura 1. Dendrograma obtenido de 96 muestras de CTV con Y sin presencia de MSC que se hibridaron con sondas específicas para la diferenciación aislamientos de CTV de Brasil (Comendador Gomes: CG, Uberlândia: UB); picado de tallo (Capela do Alto: CA); presencia de aislamientos severos (Capão Bonito: CB); aislamientos moderados (Botucatu: BT).

El resultado del análisis de SSCP de una porción del gen de la CP mostró patrones complejos en las cinco localidades. El número de bandas varía de dos a catorce (Figura 2). Se considera que cada banda corresponde a una cadena del ADN dúplex, lo que indica que existe una combinación de hasta siete haplotipos en cada aislamiento. El número de haplotipos en regiones con MSC fue al menos 5 y en regiones sin MSC fue hasta 7. Esto confirma la existencia de una interacción compleja entre los aislamientos presentes y su hospedante, que pueden cambiar en el tiempo y espacio a una mezcla de aislamientos con diferentes niveles de severidad (Souza *et al.*, 2002; Corazzza-Nunez *et al.*, 2001) pero que hasta el momento no se puede implicar a aislados severos del CTV con la etiología de la MSC.

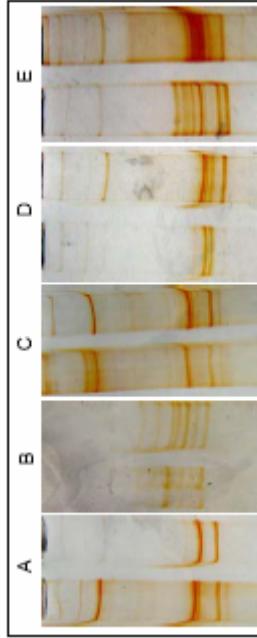


Figura 2. Patrones electroforéticos obtenidos de muestras de CTV por SSCP amplificadas de una porción de la capa proteica (p25) de cinco localidades de Brasil: A) Capela do Alto; B) Capão Bonito; C) Comendador Gomes; D) Überlândia y E) Botucatu.

El análisis de varianza molecular (ANOVA) de los patrones electroforéticos de SSCP estimó una variación de 98% dentro de poblaciones de las cinco regiones estudiadas, lo que explica que no se encontró ningún patrón predominante. La poca variabilidad entre regiones (2%) indica una estructura poblacional heterogénea local (Cuadro 5).

En el dendrograma construido con los datos de ausencia/presencia de bandas del SSCP (resultados no mostrados), se obtienen dos grupos, sin una clara diferenciación de regiones geográficas y por tanto de sintomatología, con lo cual se confirma la heterogeneidad de la estructura poblacional en las cinco regiones geográficas y la no implicación de aislados severos en la MSC (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza molecular (ANOVA) del perfil electroforético SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV de cinco regiones de Brasil.

Fuentes de variación	gr <sup>†</sup>	Estimadores	% de variación	Significancia <sup>‡</sup>
Entre regiones geog.	4	0.055	2.0	0.270
Dentro de regiones geog.	23	3.573	98.0	---

<sup>†</sup>Grados de libertad.

<sup>‡</sup>Probabilidad de ocurrencia de valores de varianza de  $\varphi$  stat más extremos que los observados.

## **CONCLUSIONES**

La hibridación con sondas específicas y el análisis de SSCP de aisamientos de CTV, detectó la existencia de mezclas de diferentes genotipos virales en las poblaciones de árboles estudiados. Aunque, la mayor variabilidad dentro de poblaciones (91 y 98%) que entre regiones es compatible con la posible aparición de un aislamiento de CTV con capacidad para inducir nuevas epidemias de alta intensidad y que puede explicar la localización de la MSC en el estado de Minas Gerais y su ausencia en otras regiones citrícolas de Brasil, no se puede implicar al CTV con la MSC, de manera concluyente.

La hibridación con sondas de tipo severo fue prácticamente igual en regiones con y sin MSC, lo que no permite asociar específicamente aisamientos severos de CTV con MSC, pero sí, la asociación general de CTV a un nivel de 63% de similaridad poblacional. No se descarta la existencia de una nueva variante distante de las secuencias de CTV presentes en Brasil, por lo que se recomienda diseñar sondas asociadas a sintomatología atribuible a CTV a partir de aisamientos endémicos de Brasil.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en México y FUNDECITRUS A.C. en Brasil por el financiamiento respectivo.

## LITERATURA CITADA

- Bassanezi R.B., A. Bergamin-Filho, L. Amorim, N. Gimenes-Fernandes, T.R. Gottwald and J.M. Bové. 2003. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology* 93:502-512.
- Beidler L.L., P.R. Hiliard, and R.L. Rill. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemical* 126:374-380.
- Cambra M., M.T. Gorris, C. Marroquín, M.P. Román, A. Olmos, M.C. Martínez, A. Hermoso de Mendoza, A. López and L. Navarro. 2000. Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the Valencian community of Spain. *Virus Research* 71:85-95.
- Cevick B., S.S. Pappu, R.F. Lee and C.L. Niblett. 1996. Detection and differentiation of citrus tristeza closterovirus using a point mutation and minor sequences differences in their coat protein genes. *Phytopathology* 86, s101.
- Corazza-Nunez M.J., M.A. Machado, G.W. Müller, D.R. Stach-Machado, A.A. de Souza and W.M. de C. Nunez. 2001. Evaluation of Citrus tristeza virus (CTV) complexes in pre-immunized Marsh seedless grapefruits. Summa *Phytopatologica* 27:11-16.

- García-Arenal F., A. Fraile and J.M. Malpica. 2001. Variability and Genetic structure of plants virus populations. Annual Review of Phytopathology 39:157-186.
- Huang Z., P.A. Rundell, X. Guan and P.A. Powell. 2004. Detection and isolate differentiation of citrus tristeza virus in infected field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease 88:625-629.
- Jesus-Junior W.C., and R.B. Bassanezi. 2004. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. Fitopatologia Brasileira 29:399-405.
- Kong P., L. Rubio, M. Polek and B.W. Falk. 2000. Population structure and genetic diversity of California citrus tristeza virus (CTV) field isolates. Virus Genes 21:139-145.
- Müller G.W., M.L. Targon and M.A. Machado. 2000. Thirty Years of Preimunized Pera Sweet Orange in the Citricultura in São Paulo State, Brazil. In: Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 400-403.
- Nei M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 5269-5273.
- Peakall R. and P.E. Smouse. 2006. GenALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288.

- Roistacher C.N. and P. Moreno. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. A review. In: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 7-19.
- Sentandreu V., J.A. Castro, M.A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerrí, F. González-Candelas, P. Moreno and A. Moya. 2006. Evolutionary analysis of genetic variation observed in citrus tristeza virus (CTV) after host passage. Archives of Virology 151:875-894.
- Souza A.A., G.W. Müller, M.L. Targon, M.A. Takita and M. Machado. 2002. Stability of the Mild Protective "PIAC" Isolate of Citrus Tristeza Virus. In: Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 131-135.
- Weng Z., R. Barthelson, S. Gowda, M.E. Hillf, W.O. Dawson, D.W. Galbraith and Z. Xiong. 2007. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. PLoS ONE 2 (9) : e917. doi:10.1371/journal.pone.0000917.

IV. CARACTERRIZACIÓN MOLECULAR DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL  
DE AISLAMIENTOS DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS EN YUCATÁN Y  
TAMAULIPAS, MÉXICO

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE POPULATION STRUCTURE OF  
CITRUS TRISTEZA VIRUS ISOLATES IN YUCATAN Y TAMAULIPAS,  
MEXICO

Patricia Rivas-Valencia<sup>1</sup>, Emiliano Loeza-Kuk<sup>1</sup>, Gustavo Mora-Aguilera\*, Noé Ruiz-García<sup>1</sup>, Carlos Góngora-Canul<sup>1</sup>, Daniel Ochoa-Martínez<sup>1</sup>, Ma. Alejandra Gutiérrez-Espinoza<sup>2</sup>, Vicente Febrés<sup>3</sup>, Antonio Mora-Aguilera<sup>1</sup> y Pedro Moreno<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Fitopatología y <sup>2</sup>Fruticultura Colegio de Postgrados. C.P. 56230. Montecillo, Estado de México. ([morag@colpos.mx](mailto:morag@colpos.mx))

<sup>3</sup>University of Florida, Gainesville, FL, USA. <sup>4</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada-Náquera, Km. 4, 5 Moncada (Valencia), España.

**RESUMEN**

Se caracterizaron molecularmente aislamientos del Citrus tristeza virus (CTV), originarios de Yucatán y Tamaulipas, para examinar la diversidad del virus presente en dos regiones citrícolas de México. Con SSCP se analizaron aislamientos del virus, observándose hasta dos haplotipos por aislamiento y tres tipos de patrones en Yucatán. En

Tamaulipas, se identificaron hasta tres haplotipos por aislamiento y siete patrones. El coeficiente de similaridad calculado para estas dos poblaciones de aislamientos fue de 0.70, asumiéndose un origen común de ambas poblaciones. El análisis de ANOVA indicó mayor variabilidad dentro de las poblaciones (69%) y entre ellas (31%), comprobando que ambas regiones citrícolas comparten variantes, mismo que puede justificar la ausencia de sintomatología atribuible a tristeza. La predominancia de aislamientos de tipo moderado en ambas regiones, sugiere la continuidad de estudios para programas de protección cruzada.

Palabras clave: Haplótipo, SSCP, coeficiente de similaridad.

#### ABSTRACT

Isolates of the Citrus tristeza virus (CTV) found in Yucatan and Tamaulipas were molecular characterized, to examine the virus diversity in two citrus regions of Mexico. SSCP, isolates of the virus were analyzed with, finding up to two haplotypes by isolate and three types of patterns in Yucatan. In Tamaulipas, seven patterns and three haplotipos by isolate were identified. The similarity coefficient calculated for these two populations was 0.70, assuming a common origin for both populations. The ANOVA analysis indicated major variability within the populations (69%) and among them (31%), verifying that both citrus regions share

variants, which can justify the absence of symptomatology attributable to tristeza. The predominance of the moderate isolates type in both regions, suggests future studies for cross-protection programs.

Key words: Haplotype, SSCP, similarity coefficient.

## INTRODUCCIÓN

El Citrus tristeza virus (CTV) es en la actualidad el problema de mayor importancia económica para la citricultura mundial. En México, el CTV está presente en las regiones citrícolas, sin embargo no se han presentado síntomas típicos de tristeza, aún cuando predomina el patrón susceptible naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) y se han detectado y caracterizado molecularmente aislamientos de tipo severo en Nuevo León, Colima, Baja California, Veracruz (Herrera-Isidrón, 2004; Mendoza et al., 2003; Silva-Vara et al., 2001) y Tamaulipas (Loeza-Kuk et al., 2005; Loeza-Kuk, 2003). Otro factor de riesgo, es la presencia del áfido vector *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), en la península de Yucatán (Michaud y Alvarez-Ramos, 2000) y norte de Veracruz, por su aparente mayor eficiencia de transmisión del virus (Yokomi et al., 1994; Bar-Joseph et al., 1989), en adición a la presencia de otras especies vectores como: *Aphis gossypii* (Glover), *A. spiraecola* (Patch), *A. fabae* (Scopoli) y *Toxoptera auranti* (Boyer de Fonscolombe) (Cisneros-Hernández, 2003; Silva-Vara et al., 2001; Gaona-García et

al. 2000; Villegas-Jiménez, 2000). Poco se conoce sobre la estructura poblacional (composición y frecuencia de los aislamientos del virus) existente en un contexto temporal, por lo que resulta indispensable su entendimiento para el diseño de estrategias de control de la enfermedad que permita determinar el riesgo de cambios en la intensidad de epidemia por el incremento en la frecuencia de aislados de tipo severo.

En este trabajo la hipótesis que se planteó fue que en Yucatán, la estructura poblacional del CTV, estaría dominada por aislamientos de tipo severo, ocasionada por la presencia de *T. citricida* y en Tamaulipas la estructura poblacional del CTV, estaría asociada a aislamientos de tipo moderado en ausencia de *T. citricida* y en presencia de otros áfidos vectores; en consecuencia, el objetivo de esta investigación fue realizar un estudio poblacional de aislamientos de CTV con técnicas moleculares, para identificar la prevalencia diferencial de los aislamientos y detectar algún cambio en la estructura poblacional de este virus, derivado de la presencia de *T. citricida*, que sustente la base de la aplicación de métodos de predicción, prevención y control de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del área de estudio

Se realizaron muestreos y colectas de material propagativo de árboles detectados como positivos a CTV, en huertas comerciales ubicadas en las principales regiones citrícolas del estado de Yucatán, en el municipio de Ticul durante los años 2003, 2004 y 2006; y en el estado de Tamaulipas en los municipios de Mante, Padilla, Guemez y Llera en el año 2004 (Cuadro 1). En el caso de Yucatán, las huertas fueron seleccionadas con base en la incidencia histórica de árboles infectados por CTV, aún y cuando éstos fueron erradicados como lo marca la NOM-031-FITO 2001 y por la presencia de *T. citricida*. En Tamaulipas, se seleccionó la huerta con mayor número de árboles positivos en pie. La detección de árboles positivos a CTV se realizó con DAS-ELISA, utilizando los reactivos y protocolo de Agdia Inc. y con el kit de inmunoimpresión ELISA-directo (Plant Print Diagnostics SL.), que utilizan los anticuerpos 3DF1 y 3CA5, de acuerdo al procedimiento de Ruiz-García y colaboradores (2005) y considerando la sensibilidad de cada una de las técnicas (Rivas-Valencia et al., 2004). El material vegetal que se colectó consistió de varetas, brotes y hojas jóvenes de los cuatro puntos cardinales del dosel del árbol, a una altura promedio de 1.50 m para estudios biológicos y moleculares.

## Conservación de material propagativo

Las varetas colectadas de los árboles positivos a CTV se sumergieron en Cupavit al 2.5% para su desinfección, se envolvieron en papel periódico, se colocaron dentro de bolsas de plástico y almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso como fuente donadora de yemas.

Cuadro 1. Número de árboles de naranjo (*Citrus sinensis*) positivos a CTV en huertas comerciales de Yucatán y Tamaulipas, México.

Nombre de Huertas	Municipio	Árboles +CTV			
		2003	2004	2006	2003-2006
Presencia de <i>Toxoptera citricida</i>					
C2		12	46	49	106
C3	Ticul	5	-	-	5
U2		1	-	-	1
<b>TOTAL</b>					112
Tamaulipas					
Ausencia de <i>Toxoptera citricida</i>					
E1	Mante	-	95**	-	-
L2	Padilla	-	2**	-	-
L3	Guemez	-	2**	-	-
L4	Guemez	-	6**	-	-
F5	Llera	-	9**	-	-
<b>TOTAL</b>					114

\*Huertas mixtas (otros frutales: chicozapote (*Manilkara zapota*), mamey (*Pouteria sapota*), aguacate (*Persea americana*), papayo (*Carica papaya*), plátano (*Musa sp.*) y coco (*Coco nucifera*), con arreglo topológico irregular.  
\*\*Árboles erradicados en 2004 y 2005.

### **Transmisión de CTV por injerto**

Para la conservación, registro de sintomatología y caracterización molecular de los aislamientos de CTV, en las huertas de Yucatán y Tamaulipas, se realizó la transmisión por injerto, tomando cuatro yemas de cada una de las varetas positivas a CTV identificadas por árbol, en plantas sanas de cítricos. Para el caso de Yucatán, las plantas injertadas en 2003 fueron en total 54 (18 grupos de tres plantas de Campbell, Marsh y agrio en pie franco) y en 2004 se injertaron 42 plantas de Valencia/carrizo. La detección de CTV se realizó con inmunoimpresión ELISA-directa (seis impresiones de tres pecíolos, tomados del tercio superior de las plantas), para confirmar la transmisión vía injerto en marzo de 2004 y enero de 2005.

Las yemas colectadas de los árboles positivos a CTV de Tamaulipas en 2004, fueron injertadas el 21 de enero y 12 de marzo de ese mismo año un total de 96 plantas de cítricos de combinación Valencia/carrizo o Valencia/cleopatra. La detección serológica del CTV se realizó por inmunoimpresión ELISA-directa en enero de 2005. En todos los casos, las plantas injertadas se conservaron en condiciones controladas en un invernadero de la sección de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, a temperaturas entre los 28 y 35°C fertilizadas con la fórmula (21-7-14), calculada por la disponibilidad de fuentes, una vez al mes y riegos cada tercer día.

## **Extracción de RNA y RT-PCR de un paso para la amplificación parcial y total de la capa proteica (CP)**

La extracción de ARN, la amplificación parcial del gen que codifica a la capa proteica (p25) y electroforesis se realizó como en el Capítulo III. Se usaron los iniciadores universales CPKF 5' AACGCCCTCGAGTCTGGGTTAGGA3' y CPKR 5' TCAACGGTGTGAATTCCAAAGC 3' (Kong *et al.*, 2000). Este procedimiento tuvo como objetivo amplificar cualquier tipo de aislamiento de CTV presente para la obtención del patrón electroforético por SSCP.

## **PCR selectiva**

Las muestras también se sometieron a RT-PCR de dos pasos (síntesis de cADN y PCR) con los iniciadores RF 137 5' CCG TAR AGG GAC KAT CGG C 3' / PM 34 5' TGG TGT AAA TCC CAA CCA GAC GGT TG 3' Y RF 137 / PM 35 5' ATC GCG CAT CTG GCG CAA AC 3', que amplifican un segmento de 229 y 115 pb de la región terminal 5' no codificante (UTR), que diferencian aislamientos de tipo T-385 (moderado) y T-36 (severo), respectivamente (Ayllón *et al.*, 2001).

**Análisis de la conformación polimórfica de la cadena sencilla de ADN (single-strand conformation polymorphism, SSCP)**

El análisis de SSCP se realizó a partir del producto de PCR de parte del gen p25 de la CP (273 pb), según

metodología citada en el Capítulo III. El propósito fue detectar polimorfismos (mutaciones o cambios de bases en fragmentos de ADN del mismo tamaño) e identificación de patrones electroforéticos.

### **Análisis de datos**

Se construyeron matrices de vectores de presencia (1) y ausencia (0) de bandas de los perfiles electroforéticos obtenidos por SSCP, con el cuadrado de la distancia euclíadiana definida como  $E = \xi^2_{xy} = n((1 - 2n_{xy}) / 2n)$ , donde  $2n_{xy}$  es el número de marcadores compartidos por los individuos y  $n$  el número total de bandas polimórficas, para Yucatán, Tamaulipas y Yucatán-Tamaulipas. Con cada una de las matrices se generaron dendrogramas por el método de promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA), usando el programa NTSYSpc ver. 2.10L. Así mismo, se clasificaron los perfiles obtenidos según los patrones identificados por la región citrícola. Adicionalmente, las variaciones de los perfiles electroforéticos de aislamientos de CTV de Yucatán y Tamaulipas fueron sometidos a un análisis de varianza molecular (AMOVA) a través del programa GenAlEx6 (Peakall y Smouse, 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Conservación de aislamientos en invernadero

En Yucatán, después de realizar inmunoimpresión, 26 plantas de las 54 injertadas, resultaron asintomáticas y positivas a CTV y correspondieron a 14 aislamientos. De las 42 plantas injertadas con material colectado en 2004, cuatro de ellas fueron positivas a CTV y correspondieron a cuatro aislamientos (Cuadro 2). Todas las plantas se mantuvieron en invernadero para el registro de sintomatología por tres años, sin embargo ninguna de las plantas expresó síntomas de tristeza. Esto sugiere que los aislamientos encontrados en Yucatán y Tamaulipas son poco patogénicos. Lee y Rocha-Peña (1992), han reportado este tipo de comportamiento aún en plantas injertadas sobre naranjo agrio. Loeza-Kuk et al., (artículo en revisión), detectaron en aislamientos obtenidos de la misma huerta en Yucatán un 99% de homología con T-30 y T-385 de las regiones de los genes p25 y p27 (capa proteica mayor y menor, respectivamente), confirmando la capacidad patogénica de tipo moderado de estos aislamientos. Además, de las altas temperaturas que se presentaron en el invernadero (28-35°C), ya que el sistema de enfriamiento no fue suficiente para mantener la temperatura ideal (18-23°C) y así favorecer la replicación y expresión del virus.

El 58% de las plantas injertadas con material de Tamaulipas resultaron positivas a CTV y correspondieron a 56 aislamientos, originarias de la huerta ubicada en el

municipio de Mante (Cuadro 2), las cuales se mantuvieron en invernadero para la conservación de los aislamientos destinados a estudios moleculares.

Cuadro 2. Número de aislamientos de CTV obtenidos mediante injerto de yemas positivas al virus, provenientes de Yucatán y Tamaulipas, México.

<b>Variedad o combinación</b>	<b># de plantas injertadas</b>	<b>+ CTV<sup>s</sup></b>	<b># de aislamientos<sup>t</sup></b>
<b>Yucatán</b>			
2003			
Marsh	18	11	
Campbell	18	9	
Limón agrio	18	6	
<b>TOTAL</b>	54	26	
2004			
Valencia	42	4	
<b>TOTAL</b>	<b>96</b>	<b>30</b>	<b>18</b>
<b>Tamaulipas</b>			
2004			
Valencia/carrizo	62	39	
Valencia/cleopatra	34	17	
<b>TOTAL</b>	<b>96</b>	<b>56</b>	<b>56</b>

<sup>s</sup>Confirmación de transmisión de CTV por inmunoimpresión mediante anticuerpos 3DF1 y 3CA5.  
<sup>t</sup>El número de aislamientos estuvo definido por provenir de un árbol en particular.

### Caracterización molecular

Se caracterizaron molecularmente 14 aislamientos originarios de las huertas C2 y C3 conservados en plantas en invernadero, así como 53 de 106 aislamientos colectados de la huerta C2 en 2006 de Yucatán. Adicionalmente, se amplificaron para los segmentos del extremo 5' (PCR

selectiva). La amplificación únicamente se presentó con los iniciadores RF137 / PM34 que detectan aislamientos con una severidad moderada tipo T-385 (España). Con el SSCP, obtenido de cada una de la muestras, se identificaron tres patrones electroforéticos, uno con dos bandas y dos de ellos de hasta tres bandas pero con diferente longitud de migración (Figura 1), si consideramos que una banda corresponde a una cadena del ADN dúplex, existe entonces una combinación de hasta dos haplotipos en cada aislamiento. Una estructura simple comparada con la encontrada en aislamientos de CTV en Brasil, donde se encontraron hasta siete haplotipos interactuando en un aislamiento. Para el caso específico de la huerta C2, no se detectó ninguna diferencia en los perfiles de los aislamientos conservados en invernadero y los obtenidos del campo de 2003 a 2006.

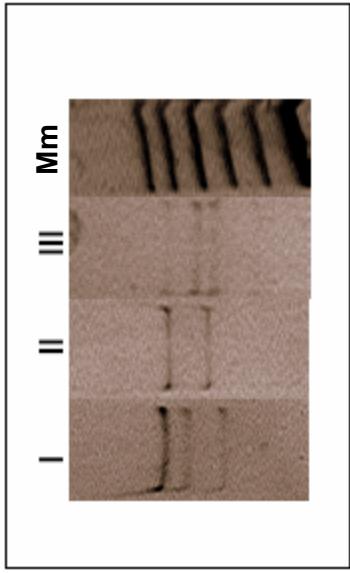


Figura 1. Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos del CTV originarios de Yucatán, México. I= Patrón con tres bandas, II= Patrón con dos bandas y III= Patrón con tres bandas con diferente migración al patrón I, Mm= Marcador de peso molecular (100 pb).

Se ha estudiado ampliamente que un aislamiento de CTV está compuesto por una colección de genotipos virales, que se agrupan en torno a uno o más genotipos predominantes (Weng *et al.*, 2007; Ayllón *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2000), así como de ARN defectivos y genomas químéricos, que posiblemente se han generado a través de eventos de recombinación (Albiach-Martí *et al.*, 2000). Estos cambios en la estructura poblacional, observada en los patrones electroforéticos de aislamientos de CTV, se deben a cambios de hospedante y/o la transmisión por áfidos (Sentandreu *et al.*, 2006). Así mismo, los cambios en la estructura poblacional de los aislamientos pueden deberse a una distribución heterogénea de las variantes génicas en las

plantas infectadas, por lo cual los áfidos vectores adquieren y transmiten solo algunas de las variantes presentes (Vives et al., 2005; Velázquez-Monreal et al., 2004; Rubio et al., 2001). Adicionalmente, en un estudio sobre la caracterización de la estructura poblacional de aislamientos de CTV que porta un áfido (*T. citricida*) en campo, se muestra cuantitativamente que los haplotipos de CTV poseen una baja diversidad nucleotídica y en consecuencia esto hace que la dispersión del CTV en una misma huerta tienda a mantener una estructura poblacional característica (Nolasco et al., 2007). Esto puede explicar la poca variabilidad detectada (tres patrones) y la mayor frecuencia del patrón I (3 bandas, Figura 2). Además, también debe considerarse que el gen caracterizado p25 (CP), que se localiza a la región 3' del genoma del CTV, la cual se considera en general una región conservada (Ayllón et al., 2001).

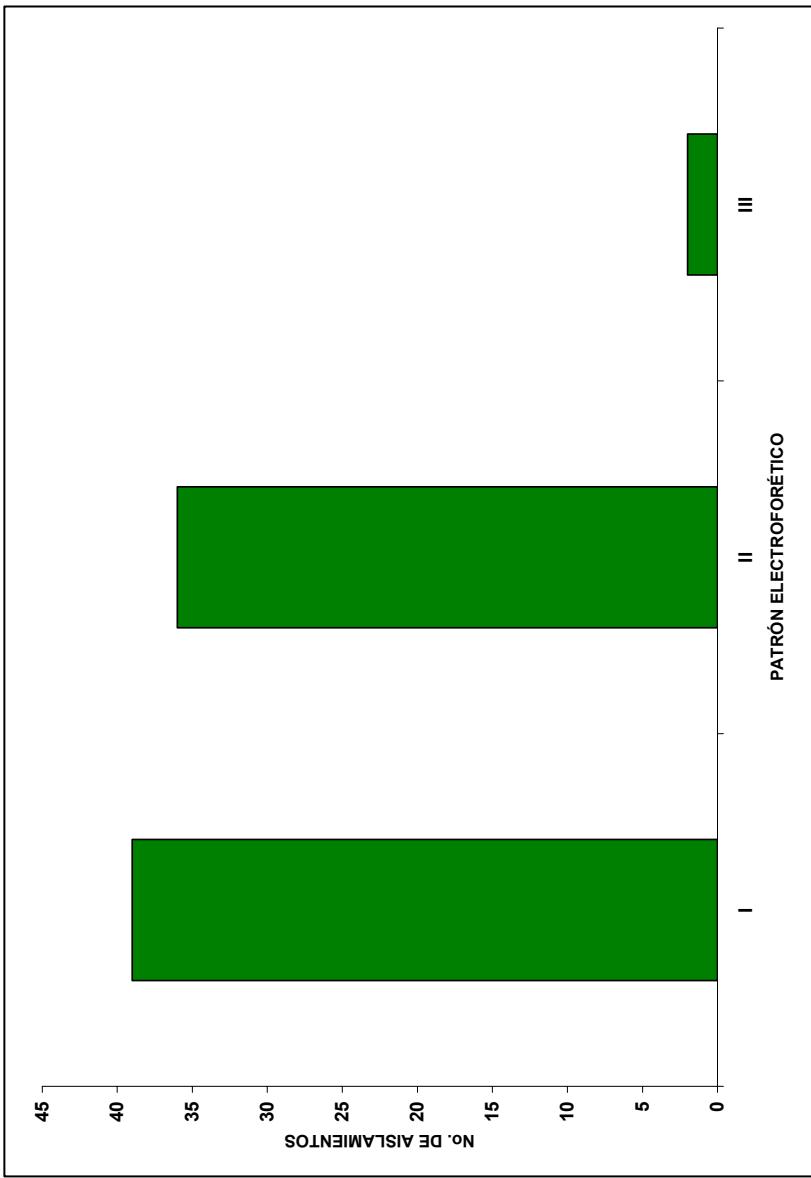


Figura 2. Frecuencia de patrones electroforéticos obtenidos por análisis SSCP de aislamientos de CTV colectados en campo y conservados en invernadero originarios de Yucatán, México. I=Patrón con tres bandas, II=Patrón con dos bandas y III=Patrón con tres bandas con diferente migración al patrón I.

La llegada de *T. citricida* a México ocurrió hace siete años, sin embargo no ha sido posible detectar cambios en la estructura poblacional atribuibles a este vector, ni tampoco se han detectado aislamientos de tipo severo y por consiguiente síntomas de declinamiento. Esta situación también se ha presentado en algunos otros países como Bélice, donde *T. citricida* llegó en 1996 y hasta octubre de

2003 no se habían detectado síntomas (Williams, 2003). Cuba es otro caso, donde hasta 2002 no se habían reportado plantas con declinamiento (Peña et al., 2002). Esto puede deberse a que los aislamientos moderados detectados probablemente están actuando como protectivos naturales, por lo cual se debe evaluar la pertinencia y continuidad de medidas de control legal como la erradicación de árboles positivos a CTV (NOM-031-FITO-2001), dependiendo de las características regionales presentes. Para ello debería ser estudiado el tipo de aislamiento que prevalece en una planta y región para la toma de decisiones. Otro aspecto importante que debe considerarse es lo que señalan Ruiz-García y colaboradores (no publicado), sobre la eficiencia de la erradicación dependiente de la incidencia inicial, donde huertas con una incidencia inicial menor a 1% se garantiza el éxito, no así en huertas con una incidencia mayor.

En los aislamientos de Tamaulipas y Yucatán, la amplificación de los segmentos del extremo 5' del genoma, sólo ocurrió con los iniciadores RF137/PM34, asociados a aislamientos de severidad moderada tipo T-385. Previamente en esta misma huerta, ubicada en el municipio de Mante, se identificó un árbol asintomático infectado con un aislamiento caracterizado molecularmente como severo (T-36) por Loenza-Kuk (2003), mismo que fue eliminado. Por lo anterior, puede sugerirse que al no detectarse la presencia de aislamientos severos, no existió una dispersión de éste

por los áfidos vectores presentes en esta región. Lo cual sin embargo, no descarta el alto riesgo que representa la inminente llegada de *T. citricida* a la región, el tiene una alta capacidad de seleccionar los aislamientos severos de CTV (Ayllón et al., 2006; Halbert et al., 2004; Lee et al., 1996; Rocha-Peña et al., 1995). En ausencia de *T. citricida* es probable que el aislamiento severo se encuentre en baja concentración en las plantas, y que con el futuro arribo de este, se pueda alterar la estructura poblacional de aislamientos del CTV y se inicie su dispersión. Se caracterizaron siete patrones electroforéticos con SSCP, obtenidos de cada una de las muestras estudiadas, algunos de estos patrones mostraron hasta cinco bandas (patrón VII), lo que corresponde a la presencia de al menos tres haplotipos (Figura 3, VII). En una gráfica de frecuencias, se muestra que el patrón IV (Figura 3), fue el prevalente en esta huerta con un 51.16% (Figura 4).

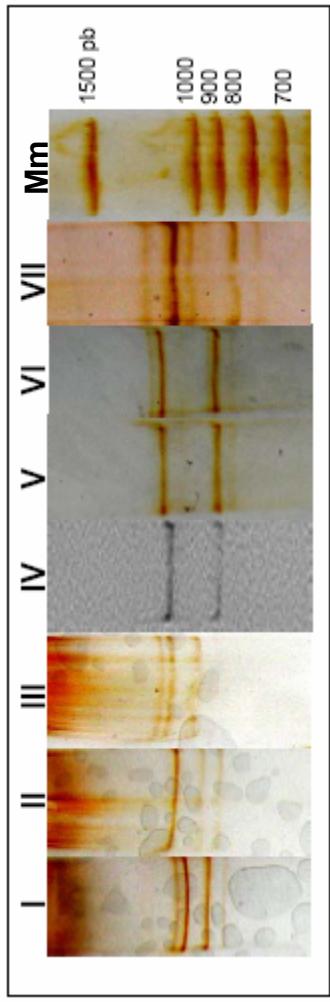


Figura 3. Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV originarios de Tamaulipas, México. I= Patrón con cuatro bandas, II= Patrón con tres bandas y III= Patrón con tres bandas, IV= Patrón con dos bandas, V= Patrón con tres bandas, VI= Patrón con cuatro bandas y VII= Patrón con cinco bandas. Mm= Marcador de peso molecular (100 pb).

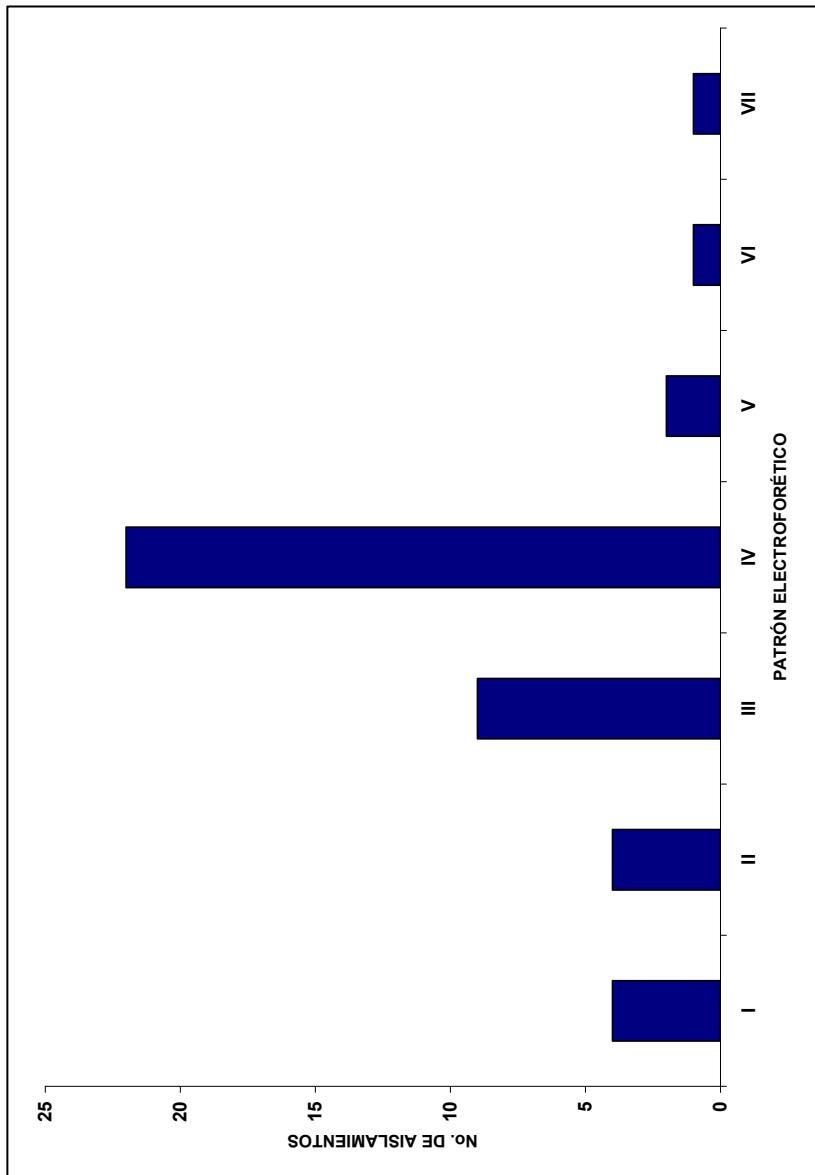


Figura 4. Frecuencia de patrones electroforóticos obtenidos por SSCP de aislamientos de CTV colectados en Tamaulipas, México. I= Patrón con cuatro bandas, II= Patrón con tres bandas y III= Patrón con tres bandas, IV= Patrón con dos bandas, V= Patrón con tres bandas, VI= Patrón con cuatro bandas y VII= Patrón con cinco bandas.

#### **Análisis de poblaciones**

Los dendrogramas construidos a partir de las matrices de ausencia y presencia de bandas, dieron como resultado para el caso de Yucatán, con un coeficiente de similaridad de 0.86, observándose dos grandes grupos que correspondieron a los aislamientos de la huerta C2 y uno pequeño de la

huerta C1 (Figura 5). Considerando que existe una mayor distancia genética entre el grupo 1 (patrón electroforético I) y el grupo 3 (patrón electroforético II), se puede considerar que el grupo 2 (patrón electroforético III) que además corresponde a la huerta C1, puede ser un patrón de transición entre ambos grupos.

En el dendrograma construido a partir de 43 aislamientos obtenidos de Tamaulipas, con un coeficiente de similaridad de 0.80, se observaron siete grupos que correspondieron a los patrones electroforéticos caracterizados (Figura 6). Esto representó una diversidad genética mayor que la observada en Yucatán, la cual puede ser el resultado de diversos factores como la edad (25 a 30 años), homogeneidad de las huertas (monocultivo), manejo, diversidad de combinaciones injerto/portainjerto e intercambio de materiales propagativos para el mejoramiento frutícola en la región.

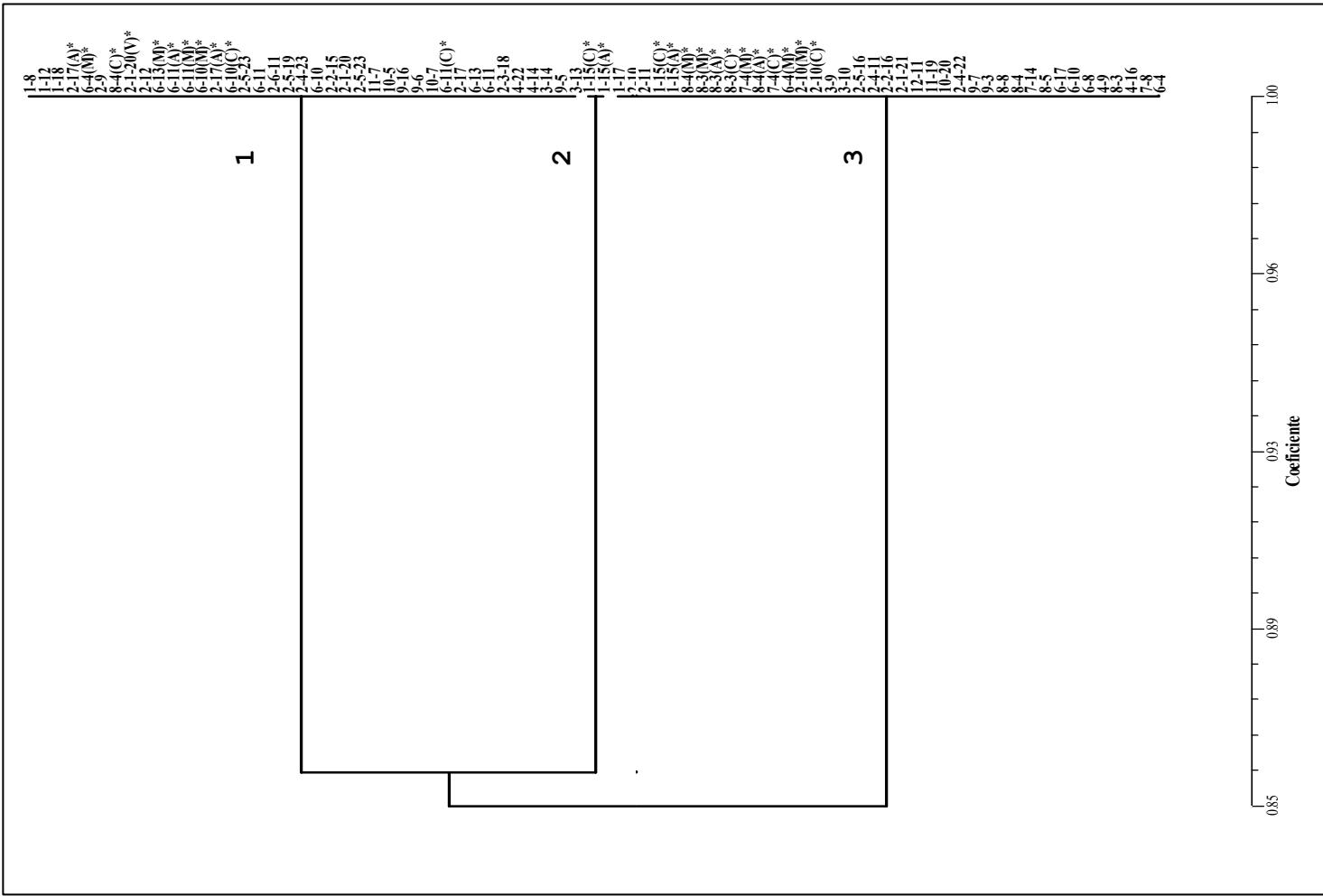


Figura 5. Dendrograma obtenido de 77 perfiles electroforéticos de aislamientos conservados en invernadero, Yucatán, México. (\*Aislamientos originarios en variedad Marsh y A= limón agrio).

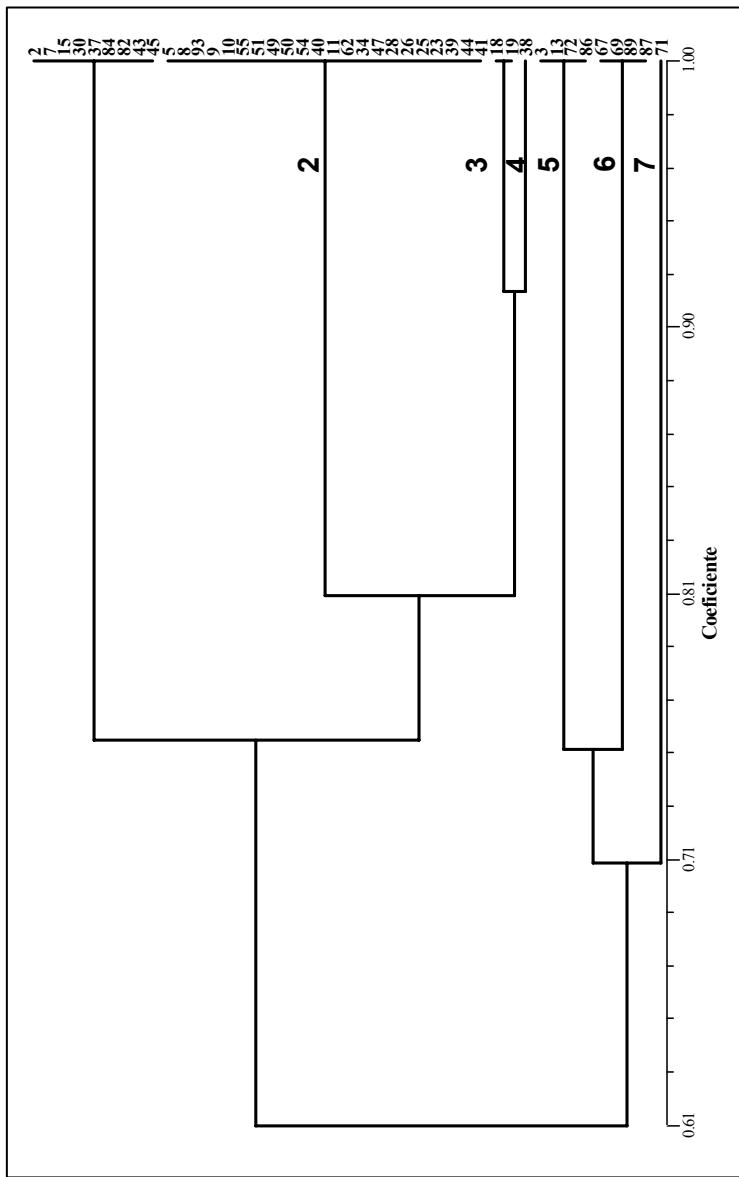


Figura 6. Dendrograma obtenido de 43 perfiles electroforéticos de aislamientos de CTV originarios de Tamaulipas, México y conservados en invernadero en plantas de naranja Valencia/carrizo y Valencia/cleopatra.

La matriz obtenida de los perfiles de aislamientos de CTV de ambas regiones citrícolas, tuvo un coeficiente de similaridad de 0.70 y agrupó el 85.4% de los aislamientos, esto puede deberse a un origen común de los aislamientos de CTV presentes en ambas regiones que se han diversificando (Figura 7). Roistacher y Moreno (1991), señalan en un análisis filogenético del aislamiento T-30, que este fue introducido a la región de Florida, por lo menos hace 200 años y que sus cambios con respecto a otros aislamientos,

son debidos principalmente al intercambio de material vegetativo a través del mundo. Esto mismo pudo haber ocurrido en Tamaulipas.

El análisis de varianza molecular (AMOVA), refuerza la idea sobre la fuente común del CTV en Yucatán y Tamaulipas, ya que se calculó un 31% de variación entre la poblaciones estudiadas, el mayor porcentaje de variación se observó dentro de las poblaciones (Cuadro 3), derivado de los factores inherentes a la población como la edad, combinación injerto/portainjerto, manejo, clima, vectores, etc.

Cuadro 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) del patrón electroforético de SSCP de muestras amplificadas de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV de Yucatán y Tamaulipas, México.

Fuentes de variación	G1 <sup>†</sup>	Estimadores de varianza	% de variación	Significancia <sup>¶</sup>
Entre poblaciones	1	0.282	31.0	0.3083
Dentro de poblaciones	119	0.633	69.0	---

<sup>†</sup> Grados de libertad.

<sup>¶</sup> Probabilidad de ocurrencia de valores de varianza de φ stat más extremos que los observados.

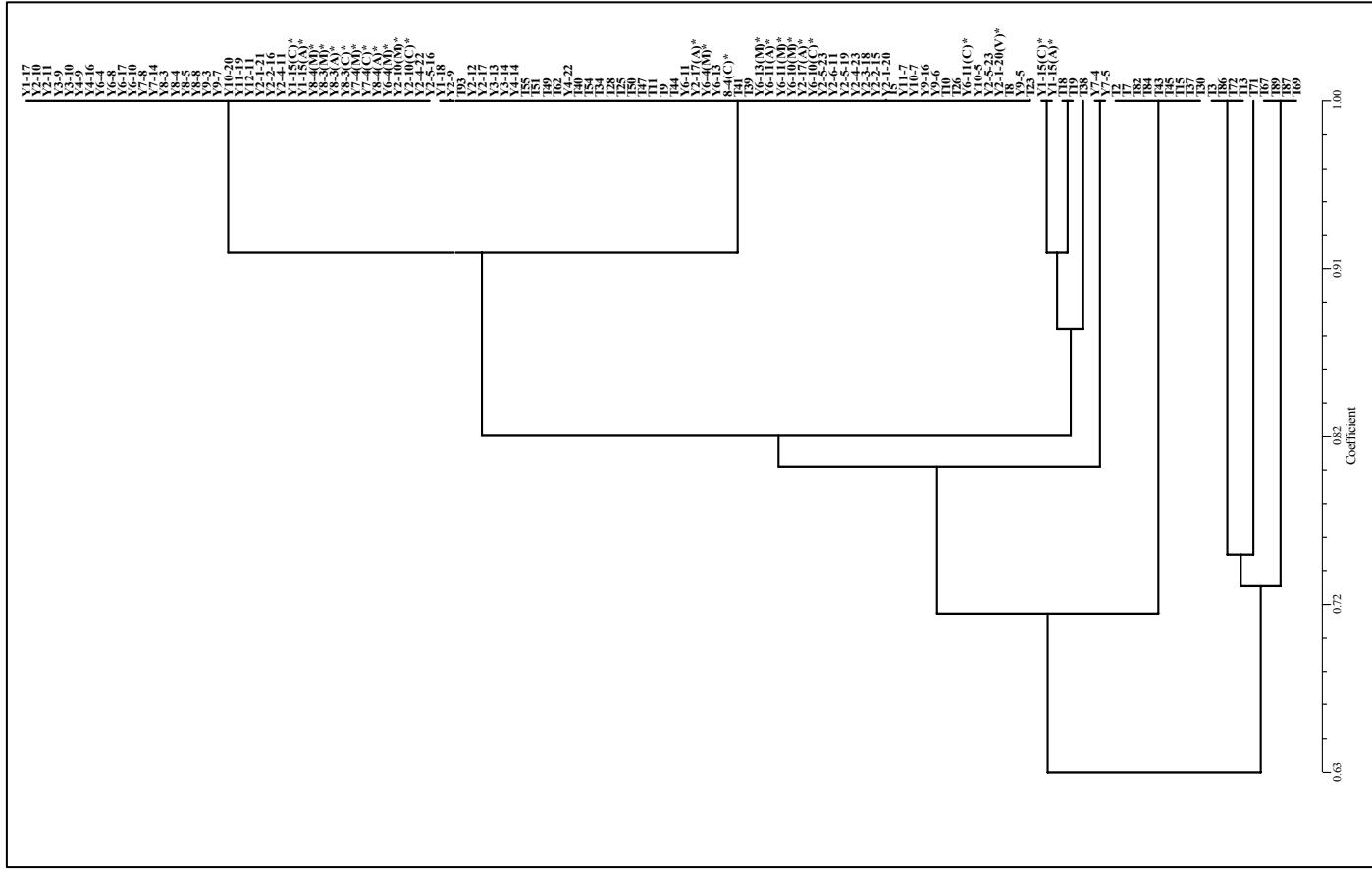


Figura 7. Dendrograma obtenido de 121 perfiles electroforéticos de aislamientos de CTV originarios de tres huertas comerciales de cítricos de Tamaulipas (1) y Yucatán (2), México.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicaron, la ausencia de aislamientos de tipo severo. En Yucatán, se encontraron hasta dos haplotipos en un mismo aislamiento (árbol) y debido a que estas variantes génicas o haplotipos pueden estar distribuidas en la planta de forma heterogénea, la presencia de *T. citricida*, no ha sido hasta el momento un factor importante en la segregación de aislamientos y por tanto en el cambio de la estructura poblacional. Por otro lado, la prevalencia de aislamientos de tipo moderado puede estar actuando como una protección natural.

En Tamaulipas, no existió dispersión del aislamiento severo previamente identificado por los áfidos presentes. Así mismo, la condición que se tiene en campo de exposición a infecciones múltiples por distintos tipos de genotipos del virus, producto en su mayor parte de la transmisión por áfidos vectores, permite un equilibrio en los niveles de diversidad o estructura poblacional, lo que se traduce en la prevalencia de aislamiento moderados y por tanto a la ausencia de síntomas típicos. Además, es importante señalar que la mayoría de las poblaciones de CTV estudiadas en ambas regiones citrícolas evidencian una importante similitud que puede ser explicada como una fuente común del genotipo viral. En el caso de Tamaulipas, la detección de un mayor número de patrones electroforéticos, puede ser el antecedente para que se de cambios en la estructura

poblacional y por lo tanto significar mayor riesgo o probabilidad de la expresión de declinamiento como respuesta a la llegada de *T. citricida*.

### Agradecimientos

A Juan Jasso Argumedo, Gerente General de Comité Estatal de Sanidad Vegetal Yucatán y Ricardo Álvarez Ramos, Coordinador de la Campaña de VTC en el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas.

### LITERATURA CITADA

- Albiach-Martí M.R., J. Guerrí, A. Hermoso de Mendoza, F. Laiqret, J.F. Ballester-Olmos and P. Moreno. 2000. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* 90:134-138.
- Ayllón M.A., C. López, J. Navas-Castillo, S.M. Garnsey, J. Guerrí, R. Flores and P. Moreno. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of Citrus tristeza virus (CVT) RNA: Incidence of three sequences types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology* 146:27-40.
- Ayllón M.A., L. Rubio, V. Sentadreu, A. Moya, J. Guerrí and P. Moreno. 2006. Variations in two gene sequences of citrus tristeza virus alter host passage. *Virus Genes* 32 (2):119-128.

Bar-Joseph M., R. Marcus and R.F. Lee. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza control. Annual Review of Phytopathology 27:291-316.

Cisneros-Hernández J. 2003. Diversidad y fluctuación de áfidos sobre brotes de cítricos en el municipio de Cuitláhuac, Veracruz. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo. 92 p.

Gaona-García G., E. Ruiz-Cancino Y R. Peña-Martínez. 2000. Los pulgones (Homóptera: Aphididae) y sus enemigos naturales en la naranja, *Citrus sinensis* (L.), en la zona centro de Tamaulipas, México. Acta Zoológica Mexicana 81:1-12.

Halbert S.E., H. Genc, B. Cevick, L.G. Brown, I.M. Rosales, K.L. Manjunath, M. Pomerinke, D.A. Davison, R.F. Lee and C.L. Nibblett. 2004. Distribution and characterization of Citrus tristeza virus in south of Florida following the establishment of *Toxoptera citricida*. Plant Disease 88:935-941.

Herrera-Isidrón L. 2004. Caracterización biológica y molecular de aislados del virus tristeza de los cítricos (CTV) en México. Tesis doctoral. CINVESTAV-IRAPUATO. 185 p.

Kong P., L. Rubio, M. Polek and B.W. Falk. 2000. Population structure and genetic diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) isolates. Virus Genes 21(3):139-145.

- Lee R.F. and M.A. Rocha-Peña. 1992. Citrus tristeza virus. In: Plant diseases in of International Importance III. Prentice Hall. New Jersey 226-249 p.
- Lee R.F., H.R. Pappu, M.A. Rocha-Peña, V.J. Febres, K.L. Manjunath, O.V. Nikolaeva, A.V. Karasev, B. Cevick, M. Akbulut, D. Benschoter, E.J. Anderson, M. Price, F. Ochoa and C.L. Nibblet. 1996. Progress on strain differentiation of Citrus tristeza virus. Revista Mexicana de Fitopatología. 14:79-87.
- Loeza-Kuk E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del Citrus tristeza Closterovirus. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo. 85 p.
- Loeza-Kuk E., E.C. Palacios-Torres, D.L. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, M.A. Gutierrez-Espinosa, V.J. Febres, G.A. Moore and R. Alvarez-Ramos. 2005. Molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from Veracruz and Tamaulipas Status, Mexico. In: Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 407-411.
- Loeza-Kuk E., E.C. Palacios-Torres, G. Mora-Aguilera, D. L. Ochoa-Martínez, M.A. Gutiérrez-Espinosa Y R. Alvarez-Ramos. Características epidemiológicas y moleculares de aislamientos del Citrus tristeza virus de Veracruz, Tamaulipas y Yucatán (Artículo en revisión Agrociencia).

- Mendoza A., C. Salazar, O. Alvarado, M.A. Cruz y H. Barrera. 2003. Diferenciación molecular de razas severas y débiles de aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos en México. Revista Fitotecnia Mexicana 26 (4) :223-230.
- Michaud J. P. and R. Alvarez-Ramos. R. 2000. First collection of brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae) in Quintana Roo, México, Florida Entomologist 83:357-358.
- Nolasco G., F. Fonseca and G. Silva. 2007. Occurrence of genetic bottlenecks during citrus tristeza virus acquisition by *Toxoptera citricida* under field conditions. Archives of Virology. DOI 10.1007/s00705-007-1089-8.
- Peakall R. and P.E. Smouse. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288.
- Peña I., L. Batista, J.C. Casín, R. Llauger, M.C. Pérez y O. Otero. 2002. Programa de Vigilancia Epifitiológica del virus de la tristeza de los cítricos en Cuba. Rev. Protección Vegetal 17 (3) :194.
- Rivas-Valencia P., C.C. Góngora-Canúl, N. Ruiz-García, G. Mora-Aguilera, R. Álvarez-Ramos, D.L. Ochoa-Martínez y M.A. Gutiérrez-Espinoza. 2004. Análisis comparativo de dos técnicas serológicas en la detección de CTV: Inmunoimpresión ELISA-Directo vs DAS-ELISA. In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología/VI Congreso

Internacional de Fitopatología. Veracruz, Ver. 25-28 Julio. L-62.

Rocha-Peña M.A., R.F. Lee, R. Lastra, C.N. Nibblet, F.M. Ochoa-Corona, S.M. Garsney and R.K. Yokomi. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector, *Toxoptera citricida*. Plant Disease 79:437-445.

Roistacher C.N. and P. Moreno. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. A review. In: Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 7-19. Rubio L., M.A. Ayllón, P. Kong, A. Fernández, M.L. Polek, J.

Guerrri, P. Moreno and B.W. Falk. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. Journal of Virology 75:8054-8062.

Ruíz-García N., G. Mora-Aguillera, P. Rivas-Valencia, C. Góngora-Canul, E. Loeza-Kuk, D. Ochoa-Martínez, G. Ramírez-Valverde, A. Gutiérrez-Espinosa y R. Álvarez-Ramos. Sensibilidad de inmunoimresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo de Citrus tristeza virus en huertos comerciales de Tamaulipas, México. (Artículo en revisión Revista Chapingo).

Ruíz-García N., G. Mora-Aguillera, Rivas-Valencia P., D. Ochoa-Martínez, C. Góngora-Canul, E. Loeza-Kuk, M.A. Gutiérrez-Espinosa, G. Ramírez-Valverde and R. Álvarez-Ramos. 2005. Probability model of Citrus tristeza virus

- detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. In: Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists 196-204.
- Sentandreu V. J.A. Castro, M.A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerri, F. González-Candelas, P. Moreno and A. Moya. 2006. Evolutionary analysis of genetic variation observed in citrus tristeza virus (CTV) alter host passage. Archives of Virology 151:875-894.
- Silva-Vávara S., M.A. Peña del Río, R. Peña-Martínez, N. Villegas-Jiménez, K. Byerly-Murphy y M. Rocha-Peña. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. Agrociencia 35:441-450.
- Velázquez-Monreal J.J., D.M. Mathews and J.A. Dodds. 2004. Segregation of citrus tristeza virus strains within individual trees. In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología/VII Congreso Internacional de Fitopatología. Veracruz, Ver. 25-28 Julio C-54.
- Villegas-Jiménez N. 2000. Afidofauna alada (Homoptera: Aphididae) de la región citrícola del municipio de General Terán. 1996-1997. Tesis Profesional. Instituto Politécnico Nacional. 120p.
- Vives M.C., L. Rubio, A. Sambade, T.E. Mirkov, P. Moreno and J. Guerri. 2005. Evidence of multiple recombination

events between two RNA sequence variants within a citrus tristeza virus isolate. *Virology* 331:232–237.

- Weng Z. R. Barthelson, S. Gowda, M.E. Hilf, W.O. Dawson, D. W. Galbraith and Z. Xiong. 2007. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLOS ONE* 2 (9) : e917.doi:10.1371/journals.pone.0000917.
- Williams S. 2003. Patrones en la industria citrícola de Belice. *Citri-News* June 16-28.
- Yokomi R.K., R. Lastra, M.B. Stoetzel, V.D. Damsteegt, R.F. Lee, S.M. Garnsey, T.R. Gottwald, M. Rocha-Peña and C.L. Nibblet. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphidiidae) in Central America and the Caribbean Basin and transmisión of citrus tristeza virus. *J. Econ. Entomol.* 87:1078–1085.

V. ESTUDIO ESPACIO-TEMPORAL DE AISLAMIENTOS DEL CITRUS

TRISTEZA VIRUS EN YUCATÁN Y TAMAULIPAS, MÉXICO

SPACIO-TEMPORAL STUDY OF CITRUS TRISTEZA VIRUS ISOLATES IN  
YUCATÁN Y TAMAULIPAS, MEXICO

Patricia Rivas-Valencia<sup>1</sup>, Gustavo Mora-Aguilera\*, Emiliano Loeza-Kuk<sup>1</sup>, Noé Ruiz-García<sup>1</sup>, Carlos Góngora-Canúl<sup>1</sup>, Daniel Ochoa-Martínez<sup>1</sup>, Ma. Alejandra Gutiérrez-Espinoza<sup>2</sup>, Antonio Mora-Aguilera<sup>1</sup>, Juan Jasso-Argumedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fitopatología y <sup>2</sup>Fruticultura Colegio de Postgraduados. C.P.

56230. Montecillo, Estado de México. ([morag@colpos.mx](mailto:morag@colpos.mx))

<sup>3</sup>Comité Estatal de Sanidad Vegetal Yucatán. Calle 19 # 443 Col. Industrial C.P. 97150 Mérida, Yucatán.

**RESUMEN**

Se realizó un estudio espacio-temporal de la dispersión de la tristeza de los cítricos, ocasionada por el Citrus tristeza virus (CTV), con la presencia de *Toxoptera citricida*, en una huerta comercial de Yucatán del 2003 al 2006. La incidencia inicial ( $X_0$ ) fue de 4.41% y la final ( $X_f$ ) de 39.33%. Los índices de agregación de Morisita y Lloyd, dependientes del tamaño óptimo de cuadrante, mostraron un patrón agregado con valores entre 1.41 y 2.39. Adicionalmente se estudió la dispersión de aislamientos de

CTV, caracterizados molecularmente en dos huertas comerciales de Yucatán y Tamaulipas. En ambas regiones se observó la prevalencia de un patrón electroforético. No fué evidente la dispersión de los patrones prevalentes entre árboles o entre hileras.

Palabras clave: Índices de agregación, autocorrelación, estructura poblacional, SSCP.

#### ABSTRACT

In a citrus commercial orchard of Yucatan from year 2003 to 2006 a space-temporary study of the dispersion of the tristeza, caused by the Citrus tristeza virus (CTV) with *Toxoptera citricida* was carried out. The initial and final incidences were 4.41% and 39.33%, respectively. The Morisita and Lloyd aggregation indices, dependent of the optimal size of the quadrant, showed an aggregated pattern, with values between 1.41 and 2.39. Additionally, the dispersion of isolates of CTV was studied, in two commercial orchards of Yucatan and Tamaulipas. In both orchards, the prevalence of an electroforetic pattern was observed. The dispersion of the prevalent patterns between trees and rows was not evident.

**Key words:** aggregation indices, autocorrelation analysis, population structure, SSCP.

## INTRODUCCIÓN

Cuando se estudia un patosistema, además de la población de plantas es necesario estudiar también las poblaciones de patógenos. Una población es un conjunto de individuos de una especie en un lugar y tiempo determinados, que tiene un comportamiento dinámico y una estructura poblacional que es alterada por procesos de mutación, migración, deriviva génica y selección. De acuerdo con la genética de poblaciones, la evaluación se considera a cualquier cambio en las propiedades genéticas de la población (Moya *et al.*, 2000). Para el caso de los virus, la estructura poblacional es la frecuencia relativa de haplotipos o variantes génicas o quasispecies dentro de la población (García-Arenal *et al.*, 2001). El CTV tiene numerosos haplotipos contrastantes por sus características biológicas, serológicas y moleculares (Nibblet *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2000; Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1991). El estudio de la variabilidad y cambios en la estructura poblacional de los virus es un aspecto importante que se debe considerar para el diseño, desarrollo y establecimiento de estrategias de control.

Hasta la fecha el problema de la caracterización de poblaciones del CTV no ha sido resuelto, porque el escenario presente en el tiempo y espacio es muy complejo, ya que un árbol puede contener una diversidad de secuencias distintas con concentraciones variables que dependen, entre otras cosas, de la variedad cultivada, época del año, clima local y manejo (Nolasco et al., 2007; Iglesias et al., 2007; Ayllón et al., 2006; Rubio et al., 2000; Ballester-Olmos et al., 1993; Moreno et al., 1991). Si se caracteriza el comportamiento epidémico de aislamientos de CTV, como prevalencia y dispersión, estos pueden ser utilizados en estudios de transformación genética, protección cruzada y predicción de epidemias. En México hasta la fecha, no se han presentado epidemias severas de tristeza. Para documentar estos aspectos, se estudiaron dos huertas comerciales de Yucatán y Tamaulipas, diferentes en cuanto a clima, presencia de *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), identificado como el vector con mayor eficiencia de transmisión de haplotipos severos (Yokomi et al., 1994; Bar-Joseph et al., 1989), manejo del cultivo, etc. La hipótesis de este estudio fue que la presencia de *T. citricida* en Yucatán determinaría una estructura poblacional compleja y heterogénea de aislamientos de CTV con prevalencia a los de tipo severo, dispuestos espacialmente en agregados, que provocarían epidemias intensas; y en el caso de Tamaulipas ante la ausencia de *T. citricida*, y la presencia de otros áfidos

vectores como p.e *Aphis gossypii* (Glover), que es el segundo áfido vector más eficiente con hábitos migratorios y que generalmente no afectan a árboles adyacentes, la estructura poblacional del CTV, estaría compuesta por aislamientos predominantemente de tipo moderado y se distribuiría espacialmente en agregados de menor intensidad, en concordancia con estudios previos realizados por Loeza-Kulk (2003) y Góngora-Canul y colaboradores (2004).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del área de estudio

Se realizaron muestreos restrictivos en torno a uno o varios árboles positivos a CTV (foco) en dos huertas comerciales de cítricos, ubicadas en las principales regiones citrícolas de Yucatán y Tamaulipas. Las huertas fueron seleccionadas con base en la incidencia a CTV y por la presencia de *T. citricida*. En el municipio de Ticul en Yucatán, el estudio se llevó a cabo en los años 2003, 2004 y 2006 en una huerta denominada C2 que abarcó aproximadamente 2 ha (18 hileras x 24 árboles). En un muestreo previo se detectaron nueve árboles positivos, mismos que fueron erradicados en 2002 (Cuadro 1). En el municipio de Mante, Tamaulipas en el año 2004, el estudio se realizó en la huerta denominada E1 (21 hileras x 100 árboles) (Cuadro 1), previamente al muestreo se identificaron 62 árboles positivos a CTV los cuales no fueron erradicados. La

detección de árboles positivos a CTV y la toma de muestra del material vegetal se realizaron como se describió en el Capítulo IV.

Cuadro 1. Características agronómicas de huertas comerciales de cítricos de naranja valencia/agrio muestradas para detección de CTV en Yucatán y Tamaulipas, México.

Huerta	Año	Árboles			Edad	Manejo <sup>y</sup>			
		+CTV	+CTV	históricos detectados muestrados					
Yucatán									
Municipio de Ticul									
<b>C2<sup>¶</sup></b>	2003	9\$	12	280					
	2004	-	46	272	28	+			
	2006	-	49	272					
Tamaulipas									
Municipio de Mante									
<b>E1</b>	2004	62	56	2018	20	++			

<sup>¶</sup>Huerta mixta (otros frutales: chicozapote (*Manilkara zapota*), mamey (*Pouteria sapota*), aguacate (*Persea americana*), papayo (*Carica papaya*), plátano (*Musa* sp.) y coco (*Coco nucifera*), con arreglo topológico irregular.

<sup>§</sup>Erradicados en 2002.

<sup>y</sup>Manejo: + tradicional, ++ tecnificado.

**Caracterización molecular de los aislamientos de CTV:**

**Extracción de RNA y RT-PCR de un paso para la amplificación parcial y total de la capa proteica (CP)**

La extracción de ARN total de cada muestra y la amplificación de parte de la CP (p25) por RT-PCR con los iniciadores específicos CPKF 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGTAGGA3' y CPKR 5' TCAACGTGTTGAATTCCAAAGC 3' (Kong *et al.*, 2000), se llevó a cabo según metodología descrita en el Capítulo IV.

**Análisis de la conformación polimórfica de la cadena sencilla de ADN (single-strand conformation polymorphism, SSCP)**

La identificación de los patrones de SSCP se realizó según metodología descrita en el Capítulo III.

**Caracterización de patrones electroforéticos y estructura poblacional**

Se analizaron los geles de poliacrilamida y se agruparon los perfiles electroforéticos por el número de bandas presentes; posteriormente, se clasificaron por la distancia de migración entre las bandas, tomando como referencia el marcador molecular de 100 pb (Promega™ Cat. G2101) y se registró la frecuencia de cada patrón identificado.

## **Epidemiología: Análisis Espacio-Temporal**

Para Yucatán, con los datos de presencia y ausencia del CTV se construyó un mapa de dispersión de la tristeza de los cítricos con el programa Surfer<sup>®</sup> 6.04. Adicionalmente, se calcularon, para cada fecha de muestreo, los índices de agregación de Morisita (Morisita, 1959) y Lloyd (Lloyd, 1967) dependientes del tamaño óptimo de cuadrante (TOC) propuesto por Greig-Smith (1952). Además, se llevó a cabo un análisis de autocorrelación espacial para determinar la intensidad y orientación de agregación usando el programa LCOR<sup>®</sup> (Gottwald *et al.*, 1992).

## **Epidemiología Molecular: Exploración Gráfica**

Para Yucatán y Tamaulipas, se construyeron mapas de dispersión de los patrones electroforéticos con el programa Surfer 6.04<sup>®,</sup> para examinar el comportamiento espacial de éstos con y sin presencia de *T. citricida*. Se determinó la frecuencia de los patrones electroforéticos caracterizados en el tiempo y se construyeron gráficas de frecuencias.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Epidemiología: Análisis espacio-temporal**

En Yucatán, la incidencia inicial fue de 4.41% y se incrementó hasta 39.33% (Cuadro 2). La exploración del mapa de dispersión de la tristeza de los cítricos de 2003 a 2006 (Figura 1) mostró agregación intensa, lo cual puede estar

asociado al hábito colonizador de *T. citricida* por un lado, y por otro a la composición de la huerta de naturaleza mixta (presencia de otros árboles frutales) que aparentemente podría tener, en general, un efecto confinador de la áfido-fauna presente, que en condiciones de monocultivo, no tiene el hábito de permanecer en los árboles de cítricos (p.e.).

*Aphis gossypii*. Existe evidencia que indica que la diversidad de hospedantes afecta la incidencia de la enfermedad en dos sentidos: 1) la abundancia de los insectos vectores puede cambiar con cambios en la diversidad de las plantas presentes, afectando la colonización, migración, reproducción o mortalidad y/o 2) la tasa de transmisión del patógeno puede cambiar como efecto del comportamiento o hábito alimenticio del vector (Powell, 1990). Powell (1991) realizó un experimento para comprobar lo antes mencionado con diferentes áfidos vectores del Barley yellow dwarf virus (BYDV), en dos cultivares de avena (*Avena sativa L.*), encontrando diferencias significativas en incidencia y severidad de la enfermedad entre las variedades de avena.

Los índices de Morisita y Lloyd dependientes del tamaño óptimo de cuadrante mostraron para el 2003, 2004 y 2003–2006 un comportamiento de tipo agregado con valores entre 1.41 – 2.03 y 1.54–2.39, respectivamente (Cuadro 2). Lo anterior confirmó de manera cuantitativa, la disposición espacial identificada en el mapa de dispersión presentado (Figura 1).

Se confirma para esta huerta lo reportado por Gottwald y

colaboradores (1998), que en presencia de *T. citricida*, la disposición espacial de la tristeza de los cítricos es en agregados.

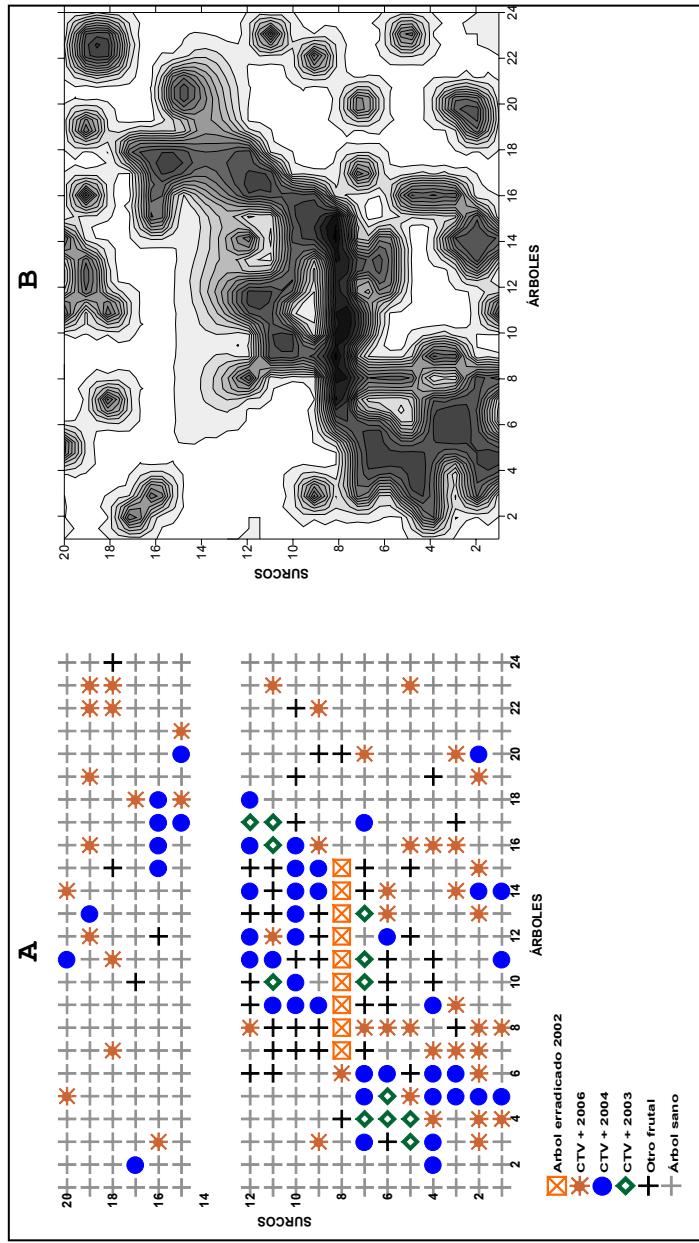


Figura 1. A) Mapa de dispersión espacio-temporal de árboles positivos a CTV B) Mapa de contorno e isolíneas mostrando orientación y tamaño de los agregados de árboles positivos a CTV en una huerta comercial de Yucatán, México (2003-2006).

Por otro lado, el patrón uniforme que se presentó en el 2006, con valores de 0.93 y 0.91 para Morisita y Lloyd, respectivamente (Cuadro 2), puede ser una consecuencia de la disponibilidad limitada de árboles sanos de cítricos. También debe considerarse la presencia de otros áfidos vectores como *Aphis gosyppi*, que después de *T. citricida* es el vector más importante (Yokomi et al., 1994) y que

evidentemente puede tener una participación importante en la dispersión del virus, además de otros áfidos presentes en la región.

Cuadro 2. Incidencia, tipo de patrón de acuerdo a los índices de Morisita Y Lloyd (previa determinación del tamaño óptimo de cuadrante) y dependencia espacial mediante autocorrelación espacial de árboles positivos a CTV en Yucatán, México (2003-2006).

Árboles + CTV	% de incidencia <sup>x</sup>	TOC <sup>s</sup>	Morisita	Lloyd	Índice de patrón <sup>¶</sup>	Tipo de patrón <sup>¶</sup>	Análisis de autocorrelación espacial <sup>f</sup>			
							Oeste-Este	Norte-Sur	N-E/S-O <sup>t</sup>	
							Este	Sur	Oeste	
<b>2003</b>										
12	4.41		1.77		1.92	Agregado	C21**	C1** D5 6*	C1** D6** Y	
<b>2004</b>										
46	16.91		2.03		2.39	Agregado	C21**	C1** D5 6*	C1** D5* Y	
									6**	
<b>32</b>										
<b>2006</b>										
49	18.01		0.93		0.91	Uniforme	C21**	C1** D6 12*	C1** D6** Y	
<b>2003-2006</b>										
106	39.33		1.41		1.54	Agregado	C21**	C1** D5 6*	C1** D5* D6** D12**	
<b>Incidencia absoluta restrictiva (18 hileras X 24 árboles)</b> con un total de 272 árboles de cítricos.										
Método Greig-Smith (1952).										
Valores mayores a 1.0=agregado, iguales a 1=aleatorio y menores a 1=uniforme.										
<sup>x</sup> C y D representan una dependencia espacial continua y discontinua, respectivamente. Los números indican el grado u orden										

de dependencia, la significancia de la autocorrelación 0.05 (\*) ó 0.01 (\*\*).

\*Direccionalidad en diagonal.

Los análisis de autocorrelación para la huerta C2 (Yucatán), mostraron dependencia espacial continua (agregación) de hasta 21 árboles (dirección oeste-este) y una dependencia discontinua de orden cinco, seis y 12 (dirección norte-sur), durante las tres evaluaciones (Cuadro 2). Sin embargo, dada la naturaleza mixta de la huerta, estos análisis no son concluyentes (Figura 2). En resultados obtenidos por Góngora-Canúl (2004) y Loeza-Kuk (2003), en Tamaulipas se distingue una mayor dispersión en el sentido de las hileras sin presencia de *T. citricida*.

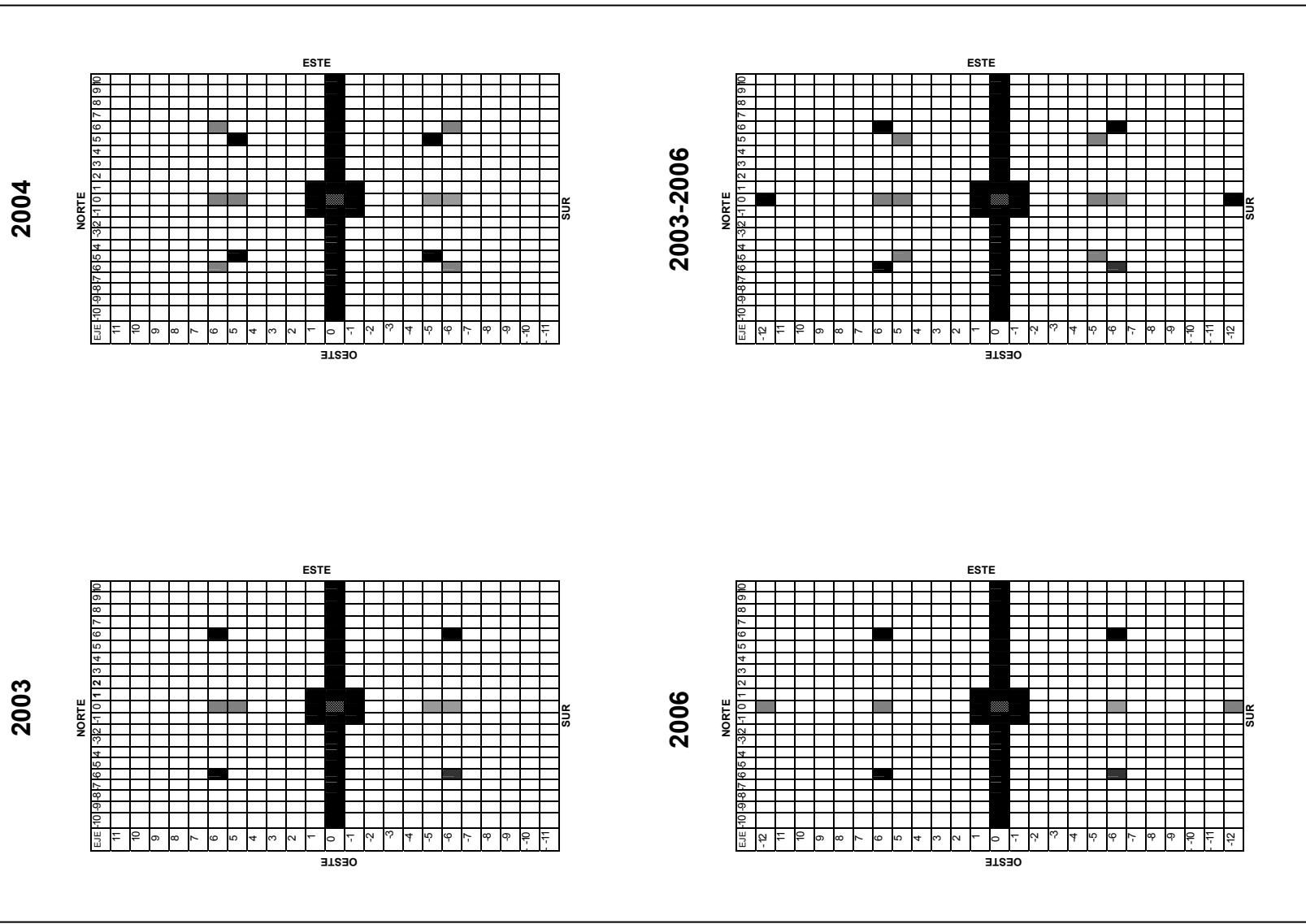


Figura 2. Autocorrelogramas de la tristeza de los cítricos en una huerta comercial de Yucatán, México. Significancia de autocorrelación (cuadro negro=  $p < 0.01$ ), (cuadro gris  $p=0.05$ ) .

Para el caso de Tamaulipas, Góngora-Canúl y colaboradores (2004) realizaron el análisis espacial respectivo en ocho huertas, incluida E1, y reportaron un comportamiento agregado de árboles positivos a CTV aún sin la presencia de *T. citricida*. Este resultado fue confirmado con la estimación de los índices de Morisita y Lloyd de entre 1.69 y 2.48. Para la huerta E1, la incidencia inicial calculada fue de 3.07% y la final de 6.64%. Adicionalmente, se estudió el efecto de la erradicación en la dispersión de la enfermedad señalando que específicamente en esta huerta (E1) se requirieron de 2 a 3 meses para el retorno a la agregación, ya que inicialmente en una fecha previa se detectaron 83 árboles positivos que fueron erradicados (octubre-diciembre de 2001). Loeza-Kulk (2003) en otro estudio, hace referencia a una fuerte tendencia a la agregación con valores de Morisita de 13.8 a 38.5 y de Lloyd de 13.9 a 38.9, lo cual demuestra la importante actividad de dispersión del virus por vectores distintos a *T. citricida*.

El análisis de autocorrelación de esta misma huerta exhibió un patrón de agregación, ya que la dependencia espacial continua en torno a un foco, en sentido de la hilera de primer orden y discontinua de hasta el orden 86. Entre hileras la dependencia espacial continua es de hasta de orden cuatro y discontinua hasta el orden 50 (Góngora-Canúl, 2004).

### Epidemiología Molecular: Exploración Gráfica

Se caracterizaron dos patrones electroforéticos originarios de la huerta C2 localizada en Yucatán. El SSCP permitió identificar dos patrones electroforéticos: de dos y tres bandas (Figura 4). Por lo tanto se considera que la estructura poblacional presente en esta huerta estará constituida de una combinación de hasta dos haplotipos en cada aislamiento (Figura 3, I), caracterizados como de tipo moderado (resultados presentados en capítulo anterior).

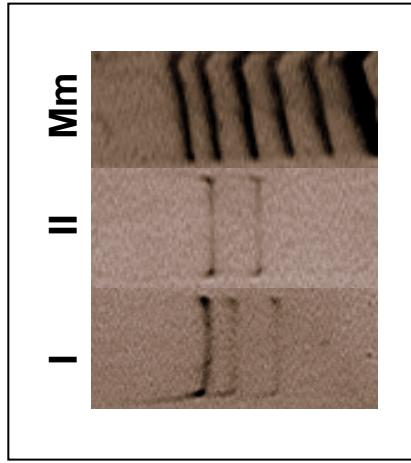


Figura 3. Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteíca (p25) de aislamientos de CTy originarios de Yucatán, México. I= Patrón con tres bandas, II=Patrón con dos bandas, Mm= Marcador molecular (100 pb).

El comportamiento temporal de estos patrones, determinado por su frecuencia en campo, se observan los siguientes eventos (Figura 4): 1) En el año de inicio del estudio (2003), se obtuvieron dos patrones electroforéticos, 2) la prevalencia del patrón I se presentó en los años 2003

y 2006, 3) el patrón 2 prevaleció en el 2004 y se mantuvo en 2006, esto es una evidencia clara de cambios en la estructura poblacional, ligados a procesos de aloinfección.

Los eventos antes descritos muestran un comportamiento dinámico de la población de los aislamientos de CTV determinados por la relación entre la planta y el vector (Nolasco et al., 2007), las propiedades biológicas y poblacionales del virus (Moya et al., 2000), además de otros factores del entorno, como son la áfido-fauna presente, en especial *T. citricida* (Siliva-Vara et al., 2001; Gaona-García et al. 2000; Villegas-Jiménez, 2000), el clima, manejo, etc. La ausencia del patrón III en esta huerta pero reportado en la región (Capítulo anterior) puede deberse a segregación, recombinación o cuellos de botella poblacional de los haplotipos presentes en la planta (Nolasco et al., 2007) o procesos de autoinfección. El decrecimiento en la frecuencia del patrón I, puede ser consecuencia de su limitada capacidad para permanecer o mantenerse en la naturaleza.

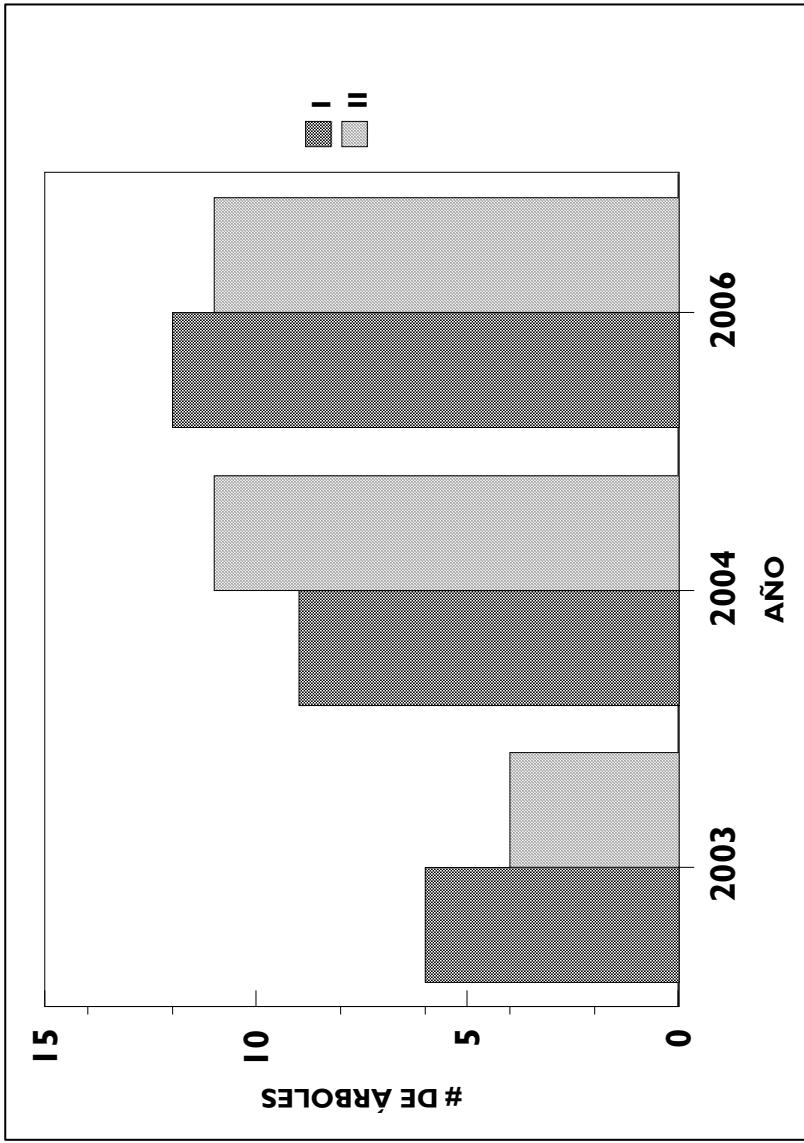


Figura 4. Distribución de frecuencias de patrones electroforéticos presentes en los árboles durante tres años en una huerta comercial citrícola de Yucatán, México. I=Patrón con tres bandas, II= Patrón con dos bandas.

El mapa de dispersión de los aislamientos de CTV en Yucatán (Figura 5), muestra que la disposición espacial del patrón electroforético I (naranja) está mayormente distribuido, sin embargo no es evidente si la dispersión de este patrón se lleva a cabo entre árboles o entre hileras. Otra situación evidente es que en torno a los árboles erradicados en 2002, solo están presentes los patrones electroforéticos I y II, el patrón electroforético III del que se hace mención en el Capítulo anterior, parece no estar

erradicado. La dispersión de los aislamientos de CTV en Yucatán (Figura 5), muestra que la disposición espacial del patrón electroforético I (naranja) está mayormente distribuido, sin embargo no es evidente si la dispersión de este patrón se lleva a cabo entre árboles o entre hileras. Otra situación evidente es que en torno a los árboles erradicados en 2002, solo están presentes los patrones electroforéticos I y II, el patrón electroforético III del que se hace mención en el Capítulo anterior, parece no estar

relacionado con los anteriores, por lo que es muy posible que pueda provenir de una fuente diferente.

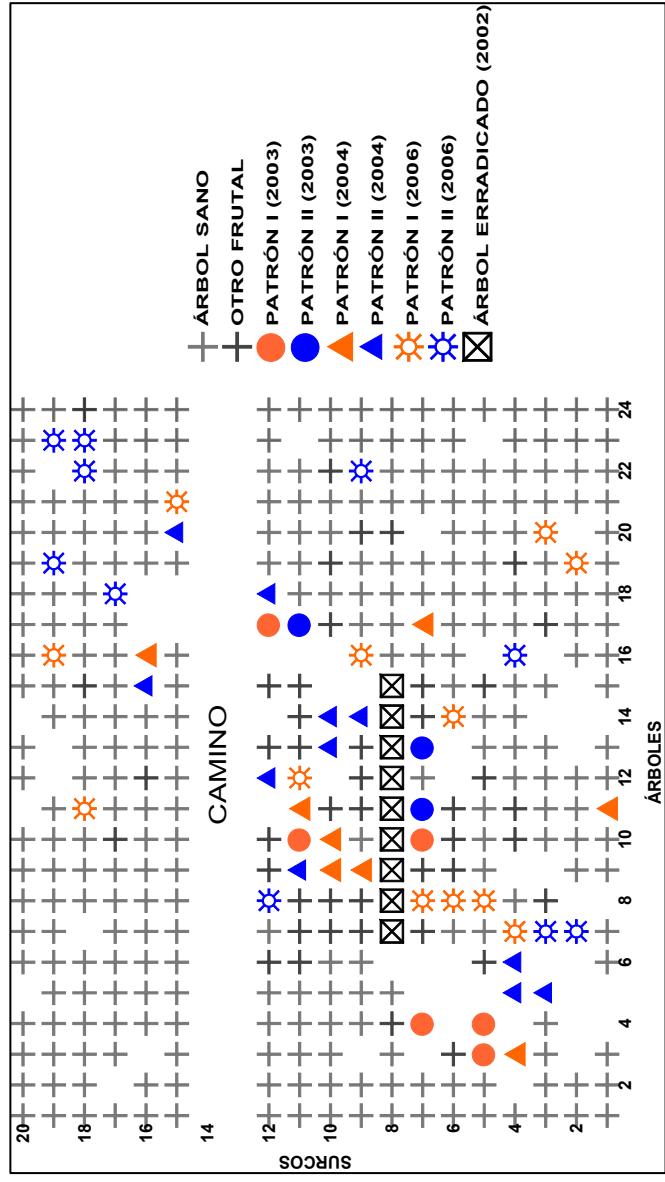


Figura 5. Mapa de dispersión de aisamientos de CTV en una huerta comercial de Yucatán, México (2003-2006). \*Los espacios en blanco, son árboles positivos a CTV cuyos aisamientos no fueron caracterizados molecularmente.

Los patrones electroforéticos obtenidos con SSCP en Tamaulipas mostraron hasta cinco bandas, encontrándose en un aislamiento al menos tres haplotipos, categorizados en siete tipos de patrones (Figura 6).

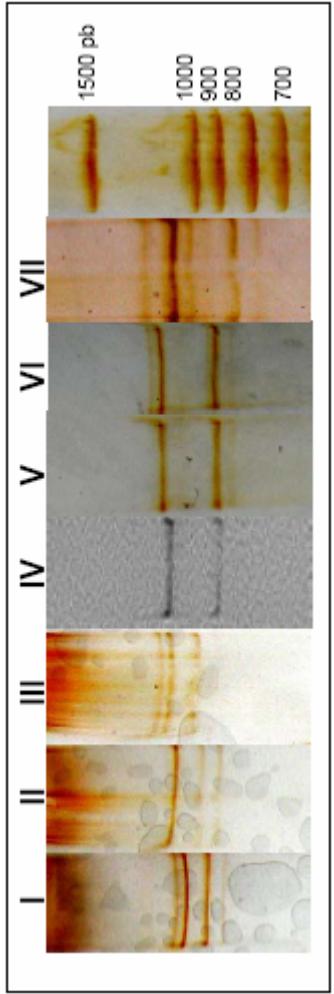


Figura 6. Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV originarios de Tamaulipas, México. I= Patrón con cuatro bandas, II= Patrón con tres bandas y III= Patrón con tres bandas, IV= Patrón con dos bandas, V= Patrón con tres bandas, VI= Patrón con cuatro bandas y VII= Patrón con cinco bandas. Mm= Marcador de peso molecular (100 pb).

Las frecuencias de los patrones promedio en campo fueron las siguientes: patrón I 4/43, II 4/43, III 9/43, IV 22/43, V 2/43, VI 1/43 y VII 1/43. La frecuencia mayor evidentemente fue del patrón IV (dos bandas, un haplotipo) (Figuras 6 y 7). Esto puede ser una evidencia de que la población se está diversificando o el haplotipo predominante tiene características particulares que lo pone en ventaja con los demás, tendiendo a mantenerse en la naturaleza.

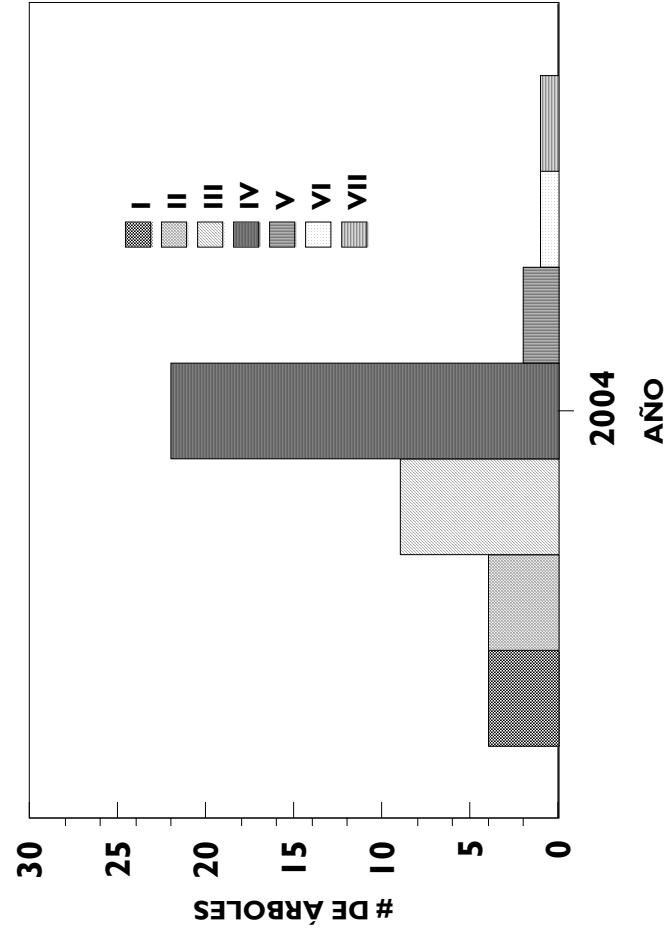


Figura 7. Distribución de frecuencias de los patrones electroforéticos presentes en una huerta comercial citrícola de Tamaulipas, México. I= Patrón con cuatro bandas, II= Patrón con tres bandas y III= Patrón con tres bandas, IV= Patrón con dos bandas, V= Patrón con tres bandas, VI= Patrón con cuatro bandas y VII= Patrón con cinco bandas.

El mapa de dispersión de aislamientos de CTV en Tamaulipas (Figura 8), muestra una agregación a partir de la hilera (árboles) 30 a 1a 50, con una aparente dispersión gradual en dirección de las hileras. El patrón prevalente (IV) se distribuye a lo largo del área de estudio y aparentemente se asocia con el patrón III.

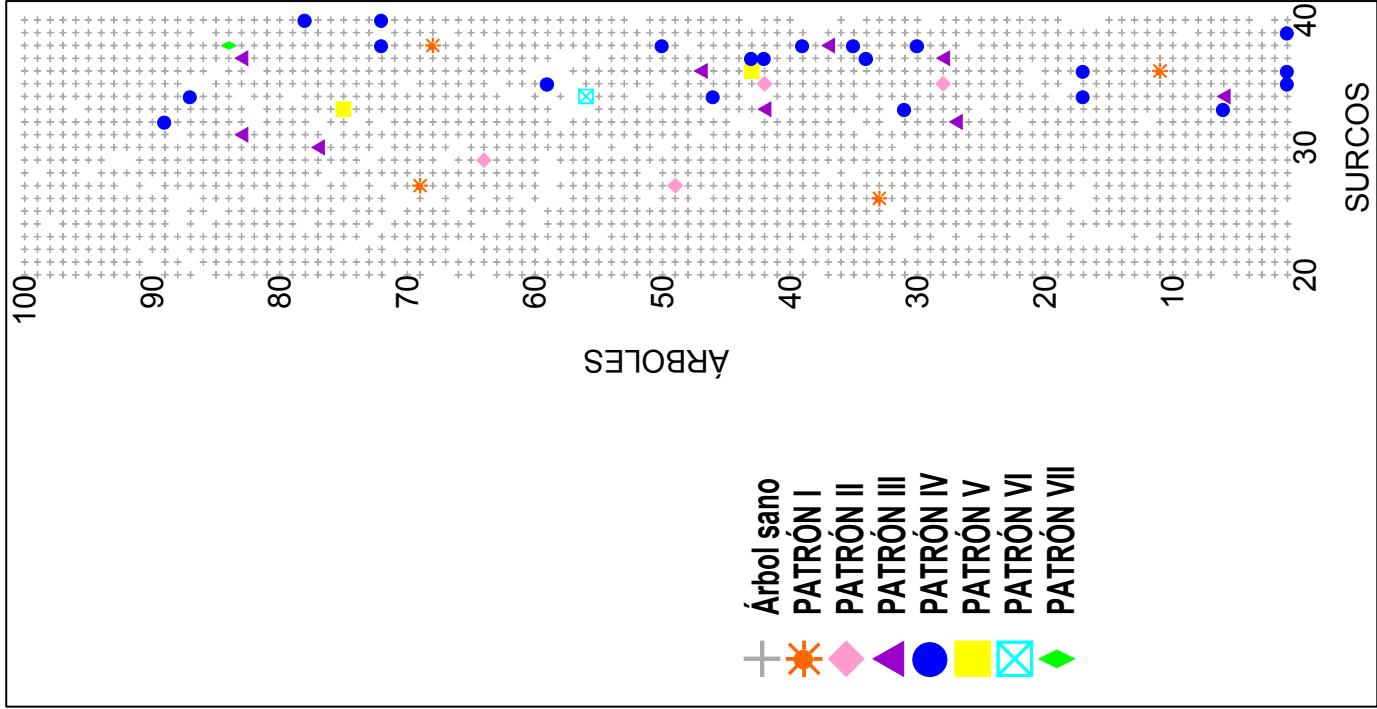


Figura 8. Mapa de dispersión de aislamientos de CTV en una huerta comercial de Tamaulipas, México (2004). \*Los espacios en blanco indican árboles positivos sin caracterización molecular del aislamiento.

Contrario a lo que se esperaba, Tamaulipas presentó mayor variabilidad de aislamientos de CTV, con respecto a los de Yucatán, esto pudo deberse a que el manejo que se aplica en esa región es más intenso, ya que este estado tiene una participación comercial importante. Debido a lo anterior, no es raro que se haya mantenido un mayor intercambio de material propagativo, que en algunas ocasiones pudo haber estado infectado, además de que se tiene un mayor número de variedades de cítricos en la región, que al ser expuestas a infecciones múltiples del CTV, provoque cambios en la estructura poblacional de virus.

Al respecto se han realizado numerosos estudios, sometidos a cambios de hospederos, áfidos vectores, condiciones climáticas y manejo, entre otras (Weng *et al.*, 2007; Sambade *et al.*, 2007; Ayllón *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES

La dispersión de la tristeza de los cítricos en Yucatán y Tamaulipas ocurrió en agregados y fue independiente de la presencia de *T. citricida* en la región. El análisis de autocorrelación no fue concluyente, considerando la naturaleza mixta de la huerta. Los aislamientos de Tamaulipas presentaron una mayor diversidad genética que los de Yucatán. En ambas regiones se observó una prevalencia de un patrón electroforético distintivo.

La diversidad en la estructura poblacional viral ha sido descrita previamente como un mecanismo que evita la respuesta de resistencia del hospedero o un reservorio que mantiene a los haplotipos con ventajas en otros ambientes y ha sido correlacionada con la habilidad de infectar numerosos hospederos. Con los resultados antes descritos, se provee de una mayor información sobre algunos de los factores que contribuyen o permiten esta diversidad génica viral, por lo que las estrategias de manejo de la enfermedad pueden ser diseñadas, considerando las características particulares de cada región que pueden prevenir el desarrollo de epidemias y/o reducir su intensidad.

Además con la caracterización de los aislamientos presentes, se pueden iniciar estudios de protección cruzada y transgenia, acorde con las características regionales y previniendo el impacto de la llegada de *T. citricida* a regiones nuevas.

### **Agradecimientos**

A Ricardo Álvarez Ramos, Coordinador de la Campaña de VTC en el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas.

## LITERATURA CITADA

Ayllón M.A., L. Rubio, V. Sentandreu, A. Moya, J. Guerrí and P. Moreno. 2006. Variations in two genes sequences of citrus tristeza virus alter host passage. *Virus Genes* 32: 119-128.

Ballester-Olmos J.F., J.A. Pina, E.A. Carbonell, P. Moreno, A. Hermoso de Mendoza, M. Cambra and L. Navarro. 1993. Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology* 42:219-229.

Bar-Joseph M., R. Marcus and R.F. Lee. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza control. *Annual Review of Phytopathology* 27:291-316.

Gaona-García G., E. Ruíz-Cancino y R. Peña-Martínez. 2000. Los pulgones (Homóptera: Aphididae) y sus enemigos naturales en la naranja, *Citrus sinensis* (L.), en la zona centro de Tamaulipas, México. *Acta Zoológica Mexicana* 81:1-12.

García-Arenal F., Fraile A. and J.M. Malpica. 2001. Variability and genetic structure of plants virus populations. *Annual Review Phytopathology* 39:157-186.

Góngora-Canul C. 2004. Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del citrus tristeza closterovirus en Tamaulipas, México. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillos. 145 p.

- Góngora-Canúl C., P. Rivas-Valencia, N. Ruiz-García, E. Loeza-Kuk, G. Mora-Aguilera, D. Ochoa-Martínez, M.A. Gutiérrez-Espinosa and R. Álvarez-Ramos. 2004. Spatial Pattern of Citrus Tristeza in Tamaulipas, México. American Phytopathological Society, Annual Meeting. Anaheim, California, Agosto, 2004. Phytopathology 94:publication no. P-2004-0234-AMA.
- Gottwald T. R., S.M. Garnsey and J. Borbón. 1998. Increase and patterns of spread of citrus tristeza virus infection in Costa Rica, and the Dominican Republic in the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. Phytopathology 88:621-636 pp.
- Gottwald T. R., S.M. Richie and C. L. Campbell. 1992. LCOR2-Spatial correlation analysis software for the personal computer. Plant Disease 76:213-215.
- Greig-Smith P. 1952. The use of random and contiguous quadrats in the study of the structures of plant communities. Ann. Bot. 16:293-316.
- Iglesias N.G., S.P. Gago-Zachert, G. Robledo, N. Costa, M.I. Plata, O. Vera, O. Grau and L.C. Semorile. 2007. Population structure of Citrus tristeza virus from field argentinean isolates. Virus Genes DOI 10.1007/s11262-007-0169-x.
- Kong P., L. Rubio, M. Polek and B.W. Falk. 2000. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. Virus Genes 21:139-145.

Lloyd M. 1967. Mean crowding. *J. Anim. Ecol.* 36:1-30

Loeza-Kuk E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del Citrus tristeza Closterovirus. Tesis Maestría en Ciencias en Fitopatología. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 85 p.

Moreno P., J. Guerri, J.F. Ballester-Olmos and M.E.

Martínez. 1991. Segregation of citrus tristeza virus strains evidence by double stranded RNA (dsRNA) analysis. Proceedings of the 11<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists 20-24.

Morisita M. 1959. Measuring the dispersion of individual and

analysis of distributional patterns. *Mem. Fac Sci. Kyushu Uni. Ser. E. (Biol.)* 2:215-235.

Moya A., S.F. Elena, A. Bracho, R. Miralles and E. Barrio. 1999. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. *PNAS* 97(13):6967-6963.

Niblett C.L., H. Genc, B. Cevick, S. Halbert, L. Brown, G. Nolasco, B. Bonacalza, K.L. Manjunath, V.J. Febres, H.R. Pappu and R.F. Lee. 2000. Progress on strain differentiation of Citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Research* 71: 97-106.

Nolasco G., F. Fonseca and G. Silva. 2007. Occurrence of genetic bottlenecks during citrus tristeza virus acquisition by *Toxoptera citricida* under filed

conditions. Archives of virology DOI 10:1007/s00705-007-1089-8.

Powell A.G. 1990. Cropping systems, insect movement, and the spread of insect-transmitted diseases in crops. In: Agroecology. Researching the ecological basis for sustainable agriculture 47-69.

Powell A.G. 1991. Virus spread and vector dynamics in genetically diverse plant populations. Ecology 72(1):232-241.

Rubio L., J. Guerri and P. Moreno. 2000. Characterization of citrus tristeza virus isolates by single strand conformation polymorphism analysis of DNA complementary to their RNA population. Proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists 12-17 pp.

Sambade A., S. Ambrós, C. López, S. Ruiz-Ruiz, A. Hermoso de Mendoza, R. Flores, J. Guerri and P. Moreno. 2007. Preferential accumulation of severe variants of Citrus Tristeza virus in plants co-inoculated with mild and severe variants. Archives of Virology DOI 10.1007/s00705-006-0932-7.

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

Villegas-Jiménez N. 2000. Afidofauna alada (Homoptera: Aphididae) de la región citrícola del municipio de General Terán. 1996-1997. Tesis Profesional. Instituto Politécnico Nacional. 120p.

Weng Z. R. Barthelson, S. Gowda, M.E. Hilf, W.O. Dawson, D. W. Galbraith and Z. Xiong. 2007. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of RNA virus within a single host generate extensive diversity. PLoS ONE 2 (9) : e917. doi:10.1371/journals.pone.0000917.

Yokomi R. A., R. Lastra, M.B. Stoetzel, V.D. Damsteet, R.F. Lee, S.M. Garnsey, T.R. Gottwald, M.A. Rocha-Peña and Niblett, C. L. 1994. Establishment of brown citrus aphid (Homoptera: Aphidiidae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. Journal Economic Entomology 87:1078-1085.

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

### Conclusiones

El análisis estructural del CTV realizado en dos regiones citrícolas de México y Brasil contrastantes con respecto a la incursión productiva, antecedentes epidémicos, presencia o ausencia de *Toxoptera citricida*, vector putativamente selectivo de variantes de tipo severo y la prevalencia de muerte súbita de los cítricos (MSC), atribuible a una nueva variante del CTV, permitió dilucidar la variabilidad estructural del CTV bajo condiciones de auto y aloinfección. Esto permite establecer las bases para estudios epidemiológicos poblacionales con criterios moleculares, que permitan el entendimiento de cambios en la intensidad de epidemias a nivel espacial y temporal. Específicamente, el estudio de la región genómica viral correspondiente a los genes p25 y p27 permitió establecer lo siguiente:

- 1) La estructura poblacional del CTV, mediante el análisis polimórfico de cadena simple (SSCP) fue menos compleja en México que la observada para las regiones estudiadas de São Pablo y Minas Gerais, Brasil. Coincidentemente, en ambos países, la variabilidad de las poblaciones, medida a través de la frecuencia de haplotipos, dentro de cada región estudiada fue mayor (69 y 91%) que la

- variabilidad existente entre las poblaciones de distintas regiones (31 y 9%). En México, el estudio temporal de la estructura de una población espacialmente definida, evidenció por primera vez cambios estructurales determinados por la frecuencia de haplotipos. Esto puede ser congruente con el antecedente de epidemias con un carácter espacialmente localizado en Brasil y Argentina y posiblemente con el atributo sistémico de la infección viral en árboles perennes con procesos predominantemente autoinfectivos y una fuerte aloinfección restringida por la prevalencia de áfidos vectores con tendencia colonizadora, incluyendo a *T. citricida*. Es decir la variabilidad y complejidad puede estar operando predominantemente a nivel de planta y por tanto local.
- 2) En México, la estructura poblacional del virus estudiada mediante el gen p25 estuvo conformada en Yucatán por al menos dos haplotipos y en Tamaulipas por al menos cuatro haplotipos. En consecuencia, Tamaulipas mostró una mayor diversidad en la población del virus encontrándose siete patrones electroforéticos, contrastantes con los tres encontrados en Yucatán. Esto se puede deber al posible carácter endémico de la enfermedad, en condiciones de baja prevalencia, para las condiciones de Tamaulipas. Sin embargo, la PCR

selectiva realizada con iniciadores que detecta variantes de tipo T-36 y T-385 de reacción severa y moderada, respectivamente, sugiere que la complejidad de haplotipos se limita a reacciones fitopatológicas de tipo moderado ya que solo hubo reacción con T-385. A nivel de campo se confirmó una condición asintomática.

En Yucatán se evidenció cambios en las frecuencias de los patrones electroforéticos en los árboles positivos nuevos (aloinfección), no así en los árboles positivos históricos (autoinfección). En general, el patrón encontrado en las nuevas infecciones no coincidió con el de mayor frecuencia en infecciones viejas.

3) Para las condiciones de Brasil, la estructura poblacional se definió con los genes p25 y p27. Se detectó en Minas Gerais la presencia de al menos cinco haplotipos y en São Pablo al menos siete haplotipos. Apparently, la mayor complejidad de haplotipos en São Pablo estuvo más asociada a la presencia de variantes severas (picado de tallo) que a la MSC ya que en este caso estuvo ausente. Sin embargo, mediante hibridación con sondas específicas para variantes de sintomatología de tipo severo, se obtuvo un similar porcentaje para ambas regiones (79.6 y 85.7%) a pesar

de que en Minas Gerais no se detectó visualmente síntomas severos, lo cual se pudo deber a la protección cruzada inducida con fines de manejo. Por lo tanto, no se descarta la relación del CTV con la aparición de la MSC.

- 4) La implicación de *T. citricida*, presente en Yucatán, fue aparentemente mayor en inducir cambios de intensidad de epidemia que en cambios estructurales de la población del virus. Así, de 2003 a 2006 la incidencia se incrementó de 4.4 a 39.3%. Espacialmente, sin embargo, se mantuvo una condición agregada (Lloyd: 1.54 y 2.39) como en Tamaulipas en ausencia de este vector. El estudio de dispersión específico de patrones electroforéticos (aloinfección) no fue posible a nivel cuantitativo con autocorrelación, un método de análisis que incluye dirección y distancia, debido al intercalado de distintas especies frutales en la huerta estudiada.

## **Recomendaciones**

En la actualidad, la normatividad mexicana (NOM-031-FITO-2001) establece la erradicación de árboles positivos a CTV. El estudio de la estructura poblacional del CTV es relevante para la toma de decisiones, considerando riesgos de cambios de frecuencias de haplotipos con predominancia de tipo severo, ya que estos han sido importantes en otros países donde las epidemias han sido de alta intensidad. En México, la aparente predominancia de aislamientos moderados y los relativamente altos niveles de incidencias de tipo asintomático en algunas huertas sugiere que la erradicación puede no ser justificable para esas condiciones. La prevalencia de aislamientos moderados podría conferir una protección cruzada natural. Es necesario por lo tanto, estudios complementarios a nivel poblacional del virus, para entender los mecanismos de variación estructural, incluyendo estudios biológicos con énfasis en la caracterización de síntomas y transmisión por vectores a nivel de patrones electroforéticos. Adicionalmente, esta información puede ser relevante para programas de protección cruzada o mejoramiento genético convencional y de transgenia.