



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

**TRANSMISIBILIDAD DE AISLAMIENTOS DEL *CITRUS TRISTEZA*
VIRUS (CTV) POR ÁFIDOS Y EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA EN
CÍTRICOS TRANSFORMADOS CON GENES DEL CTV**

EMILIANO LOEZA KUK

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2008

La presente tesis titulada: **Transmisibilidad de aislamientos del *Citrus Tristeza Virus* (CTV) por áfidos y evaluación de la resistencia en cítricos transformados con genes del CTV**, realizada por el alumno: **Emiliano Loeza Kuk**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR:


DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR:


DRA. M. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR:


DR. ANGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR:


DR. EUGENIO PÉREZ MOLPHE-BALCH

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

TRANSMISIBILIDAD DE AISLAMIENTOS DEL *CITRUS TRISTEZA VIRUS* (CTV)
POR ÁFIDOS Y EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA EN CÍTRICOS
TRANSFORMADOS GENÉTICAMENTE CON GENES DEL CTV

Emiliano Loeza Kuk, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2008

La sintomatología en árboles infectados por el *Citrus Tristeza Virus* (CTV) es influenciada por factores como la población de variantes de secuencia presentes. Esta población es modificada en la transmisión por áfidos y la evidencia sugiere que la interacción del CTV con *Toxoptera citricida*, incrementa la frecuencia de los aislamientos severos. Se estudió una huerta en Yucatán con una incidencia inicial de 11 árboles positivos a CTV y con tres haplotipos de aislamientos no severos, se caracterizaron los aislamientos presentes en los nuevos árboles positivos y de manera simultánea los presentes en el vector predominante (*T. citricida*). Después de tres años, la incidencia aumentó a 75 árboles positivos, los nuevos positivos generalmente fueron del haplotipo uno, sin evidencia del surgimiento de aislamientos severos al caracterizar mediante métodos moleculares.

Para el manejo de la tristeza de los cítricos se han recurrido a patrones tolerantes que no poseen la misma plasticidad que *C. aurantium* o protección cruzada que puede ser rebasada por el surgimiento de variantes más severas. La generación de plantas transgénicas que integran una porción del genoma del virus parece ser una alternativa para el control de algunos virus. Se evaluó la resistencia obtenida en plantas de pomelo y limón mexicano modificadas vía *Agrobacterium* con el gen p25 del CTV, inoculadas por injerto y *Aphis gossypii* en las cuales se midió la concentración de copias de RNA mediante PCR en tiempo real. Los resultados en invernadero como en condiciones *in vitro*, indican que las plantas modificadas tuvieron un menor número de copias de RNA que sus contrapartes sin modificar. La transmisión por áfidos no fue eficiente y no permitió evaluar grupo de plantas, aún cuando en los áfidos se detectaron moléculas de RNA del virus, principalmente en los alimentados en plantas con el aislamiento severo.

Palabras clave: Transmisión por áfidos, SSCP, muerte súbita de los cítricos, plantas transgénicas, inoculación, PCR tiempo-real.

APHID TRANSMISIBILITY OF *CITRUS TRISTEZA VIRUS* ISOLATES AND EVALUATION OF RESISTANCE IN GENETICALLY MODIFIED CITRUS WITH CTV GENES

Emiliano Loeza Kuk, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2008

Symptomatology in CTV infected trees is influenced by factors like haplotype populations or sequence variants present. In nature, this population is modified principally by aphid transmission. Up to date evidence shows that in CTV-brown citrus aphid (*T. citricida*) interaction, severe isolates are more prevalent. In this work, a citrus tree orchard in Yucatán, with an inicial incidence of 11 CTV positive trees was characterized. No severe isolates were detected and only three haplotypes were found, simultaneously haplotypes present in the main vector (*T. citricida*) were analyzed. In three years, incidence increased to 75 positive trees, new positives ones, generally contained haplotype one and no severe isolates were detected by molecular detection. These results were similar in greenhouse controlled transmission by *Aphis gossypii*.

Citrus tristeza disease management has been performed by using tolerant rootstocks or cross protection with mild isolates. However, CTV tolerant rootstocks do not have the *C. aurantium* plasticity and cross protection has been overpassed by more severe isolates. A successful alternative used against some viral diseases are genetically modified plants which integrate a portion of virus genome. We evaluated conferred resistance in Mexican lime and grapefruit modified with CTV p25 gene, inoculated by graft and *A. gossypii*. In these plants, genome RNA copies were recorded trough real time PCR. Results obtained in greenhouse and *in vitro* conditions were similar, genetically modified plants present a minor number of RNA copies than the wild type. Aphid transmission was not efficient, so this group was not evaluated even when viral RNA was detected in aphids, especially in those established in plants infected with severe isolates.

Keywords: Aphid transmission, SSCP, citrus sudden death, transgenic plants, Challenging, real-time PCR.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue parcialmente financiado por:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
- Colegio de Postgraduados
- 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 los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de Tamaulipas y Yucatán.
- Fondo de Defensa da Citricultura (FUNDECITRUS A.C.).

A mi Consejo Particular: Daniel L. Ochoa Martínez, M. Alejandra Gutiérrez Espinosa, Gustavo Mora Aguilera, Ángel Villegas Monter y Eugenio Pérez Molphe-Balch por la orientación proporcionada durante mi formación.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares del Instituto Politécnico Nacional, por su apoyo en la fase de evaluación de la resistencia en transgénicas.

Al Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, por la capacitación en el uso del PCR en Tiempo Real en especial a Ivan Córdoba.

Al Centro APTA Citros "Silvio Moreira" por su colaboración y aporte en mi conocimiento de la muerte súbita de los cítricos y otras enfermedades de importancia en la citricultura.

A los investigadores Pedro Moreno del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas y Vicente Febres de la Universidad de Florida, por sus valiosas sugerencias y comentarios en diversas fases de mi postgrado.

A mis compañeros, profesores y amigos

A todos ustedes, Gracias.

PARA ALMA Y EMILIA:

POR SU CONFIANZA Y PACIENCIA

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
III. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y MOLECULARES DE AISLAMIENTOS DEL <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> DE VERACRUZ, TAMAULIPAS Y YUCATÁN	42
3.1. INTRODUCCIÓN	43
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.4. CONCLUSIONES	61
3.5. LITERATURA CITADA	61
IV. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN POMELO Y LIMÓN MEXICANO TRANSFORMADOS CON EL GEN P25 DEL CTV	67
4.1. INTRODUCCIÓN	68
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
4.4. CONCLUSIONES	80
4.5. LITERATURA CITADA.....	81
V. ADQUISICIÓN DE <i>CITRUS SUDDEN DEATH ASSOCIATED VIRUS</i> Y HAPLOTIPOS DE <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> POR <i>TOXOPTERA CITRICIDA</i> Y <i>APHIS SPIRAECOLA</i> Y SU RELACIÓN CON MUERTE SÚBITA	85
5.1. INTRODUCCIÓN	87
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
5.4. CONCLUSIONES.....	98
5.5. LITERATURA CITADA	99
VI. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	102

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CAPÍTULO II	
Cuadro 1	Reacción inducida en plantas indicadoras de cítricos para la caracterización biológica de aislamientos de CTV. 15
Cuadro 2	Transmisibilidad de aislamientos de CTV obtenidos con <i>T. citricida</i> y <i>A. gossypii</i> como vectores. 18
Cuadro 3	Transformación genética realizada en cítricos. 26
CAPÍTULO III	
Cuadro 1	Sitios, fechas de muestreo y métodos serológicos empleados. 46
Cuadro 2	Iniciadores utilizados en RT y RT-PCR para la caracterización de aislamientos de CTV. 51
CAPÍTULO IV	
Cuadro 1	Tratamientos para evaluar resistencia al <i>Citrus Tristeza Virus</i> en plantas transgénicas de dos líneas de pomelo y una de limón mexicano inoculados por injerto y áfidos. 71
Cuadro 2	Carga viral en plantas transgénicas de pomelo y limón mexicano inoculadas con <i>Citrus Tristeza Virus</i> y analizadas por PCR en tiempo real con SYBR-green para el gen p18. 78
CAPÍTULO V	
Cuadro 1	Localidades y huertas muestreados para la colecta de áfidos en Brasil. Octubre de 2005. 89
Cuadro 2	Iniciadores específicos para detectar y discriminar variantes de <i>Citrus Tristeza Virus</i> y <i>Citrus Sudden Death associated Virus</i> en <i>T. citricida</i> y <i>A. spiraecola</i> . 91

Cuadro 3	Detección de <i>Citrus Tristeza Virus</i> y <i>Citrus Sudden Death associated Virus</i> en muestras de <i>T. citricida</i> y <i>A. spiraecola</i> colectados en regiones con muerte súbita de los cítricos (CSD) de Minas Gerais y sin CSD de Sao Paulo (Capela do Alto, Capao Bonito y Botucatú), Brasil, 2005.	92
Cuadro 4	Variantes de secuencia de <i>Citrus Tristeza Virus</i> y presencia de <i>Citrus Sudden Death associated Virus</i> en <i>T. citricida</i> colectado en huertas con síntomas de muerte súbita en Minas Gerais, Brazil, 2005.	94
Cuadro 5	Variantes de secuencia de <i>Citrus Tristeza Virus</i> y presencia de <i>Citrus Sudden Death associated Virus</i> en <i>A. spiraecola</i> colectado en huertas con síntomas de muerte súbita en Minas Gerais, Brazil, 2005.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II		Página
Figura 1	Situación citrícola mundial. A) Principales países productores. B) Producción histórica de diferentes especies comerciales de cítricos.	5
Figura 2	La citricultura mexicana. A) Distribución de la superficie citrícola por especie. B) Productividad de la industria citrícola mexicana comparada con otros países.	6
Figura 3.	Organización genómica del <i>Citrus Tristeza Virus</i> .	8
CAPÍTULO III		
Figura 1	Cambios en la distribución y dispersión de árboles positivos al <i>Citrus Tristeza Virus</i> (CTV) en huertas de Tamaulipas y Yucatán.	52
Figura 2	Detección por IC/RT-PCR/PCR anidado de CTV con iniciadores CPK, en muestras de Yucatán.	56
Figura 3	Adquisición de variantes de secuencia por <i>T. citricida</i> detectado por SSCP de p25 en muestras de campo de Yucatán.	57
Figura 4	Dispersión de variantes de secuencia en la huerta de Yucatán (YH1) por <i>T. citricida</i> el período 2003-2006, detectada por SSCP a p25.	58
Figura 5	Adquisición y transmisión de variantes de secuencia de CTV por <i>Aphis gossypii</i> en condiciones de invernadero, detectada por SSCP a CPK.	60
CAPÍTULO IV		
Figura 1	Evaluación <i>in vitro</i> de la resistencia a la transmisión de CTV por medio de la detección del gen p18.	75

Figura 2	Curva de estandarización externa elaborada con productos de PCR para el fragmento de 423 pb del gen p18 del <i>Citrus Tristeza Virus</i> .	76
Figura 3	Número de moléculas de cadenas (media geométrica) virales del <i>Citrus Tristeza Virus</i> en líneas de <i>pomelo</i> (CpP1) y <i>limón mexicano</i> transgénicas (CpL) y no transgénicas inoculadas por injerto <i>in vitro</i> .	77

CAPÍTULO V

Figura 1	Perfi les de SSCP para una porción del gen p25 de <i>Citrus Tristeza Virus</i> (CPK) presentes en áfidos. Carriles 1 a 7 son <i>T. citricida</i> ; 8 a 13 son <i>Aphis spiraecola</i> de huertas con CSD. 14 y 15 son <i>Aphis spiraecola</i> , 16 a 22 son <i>T. citricida</i> provenientes de huertas sin CSD.	96
Figura 2	Síntomas de CSD en hojas (a), corteza (b) y árbol (c); árbol sin CSD (d); árbol con síntomas del nivel dos de CSD (e), huerta en Minas Gerais (f), Botucatu (g), Capao Bonito (h) y Capela do alto (i).	97

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El *Citrus Tristeza Virus* (CTV), un patógeno confinado al floema de las plantas (Febres *et al.*, 1996) es transmitido semipersistentemente por los áfidos *Aphis gossypii* (Glover), *A. spiraecola* (Van der Goot), *A. craccivora* (Koch), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) y *T. citricida* (Kirkaldy), este último considerado como el más eficiente (Raccah, 1980; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; Gottwald *et al.*, 1997). Actualmente *T. citricida* está presente en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Chiapas, Veracruz, así como en algunos municipios de los estados de Oaxaca y Puebla (SENASICA, 2008; <http://mail2.senasica.gob.mx/default.asp?id=1010>).

En la naturaleza, el CTV existe como mezclas de variantes de secuencia genómica, especialmente en árboles expuestos a la infestación y alimentación por áfidos durante varios años (Grant y Higgins, 1956; Powell, *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1993). Frecuentemente, los árboles con estas mezclas se muestran asintomáticos, sin embargo, en ocasiones al separar los aislamientos a través de injerto o áfidos, se pueden obtener y expresar sub-aislamientos que inducen síntomas severos en plantas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) (Ballester-Olmos *et al.*, 1993).

En México, el CTV se reportó desde 1986 (Cepeda-Nieto and Barrera-Saldana, 1997) a la fecha se han detectado y erradicado o eliminado cerca de 8,000 árboles positivos en los 21 estados productores de cítricos. El programa de reconversión citrícola propone el cambio a portainjertos tolerantes al virus, aunque varios de ellos son susceptibles a enfermedades como exocortis, cachexia, pudrición por *Phytophthora* sp. y a condiciones edáficas adversas. La diseminación a zonas libres de la enfermedad, se intentó prevenir por medidas legales que restringían el movimiento de material infectado (NOM-FITO-031-2000; SENASICA, 2008; <http://mail2.senasica.gob.mx/default.asp?id=1010>), Aunque sin éxito debido a su amplia distribución actual.

Algunos trabajos realizados en México se han enfocado a cuestiones epidemiológicas y de caracterización del CTV (Silva-Vara *et al.*, 2001; Nava-Coronel *et al.*, 1999, Góngora *et al.*, 2004, Ruiz-García *et al.*, 2004; Loeza *et al.*, 2003). Sin embargo, aún falta por generar información con fundamentos epidemiológicos cuantitativos y técnicas moleculares aplicados a mayor número de aislamientos provenientes de diferentes regiones productoras de cítricos.

Para enfrentar el problema de la tristeza de los cítricos existen alternativas como: la protección cruzada que en ciertas regiones ha permitido continuar con la producción citrícola comercial. Sin embargo, existen casos donde esta protección ha sido rebasada (Müller *et al.*, 1999).

Otra opción es el desarrollo y empleo de plantas genéticamente modificadas, la cual representa una alternativa a largo plazo y puede superar varios problemas del mejoramiento convencional (Domínguez *et al.*, 2002). Las plantas generadas por esta vía, pueden expresar resistencia por un mecanismo conocido como resistencia derivada del patógeno (PDR, por sus siglas en inglés, pathogen-derived resistance). En este caso, la planta es transformada con una porción del genoma viral, cuya presencia ubicuita en las células puede interferir con los ciclos normales de replicación viral (Sanford y Johnston, 1985). Estos individuos pueden expresar la información genética por la transcripción del fragmento e inducir el silenciamiento de genes virales (Waterhouse *et al.*, 2001).

En México, se han generado plantas transgénicas de cítricos con el gen p25 de aislamientos provenientes de Florida y recientemente con una doble construcción de los genes p25 y p27 de aislamientos provenientes de Veracruz (Palacios-Torres *et al.*, 2001; Palacios-Torres *et al.*, 2003). En estos casos la transgenia ha sido comprobada por métodos histoquímicos, moleculares y crecimiento en medios de selección. Para comprobar la resistencia obtenida es necesario inocularlas con el virus para determinar su capacidad para impedir su replicación o tolerar la infección. Las hipótesis para este trabajo fueron que la aparición de variantes severas de CTV en regiones con presencia de *T. citricida* solo es posible si en la población inicial existen aislamientos de este tipo y que las plantas transgénicas para fragmentos de CTV tendrán una menor replicación viral

al inocularse con el virus como un reflejo de la expresión de la resistencia derivada del patógeno. Para comprobar dichas hipótesis, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la transmisibilidad por áfidos de los aislamientos de CTV de algunas regiones productoras de cítricos de Tamaulipas, Veracruz y Yucatán.
- Evaluar la resistencia a la infección con el CTV en plantas transformadas genéticamente con el gen p25 (capa proteica) en dos líneas de pomelo cv. Star Ruby y una selección de limón mexicano con espinas.
- Determinar la transmisibilidad por áfidos de los aislamientos de CTV de regiones citrícolas de Brasil y su relación con muerte súbita.

LITERATURA CITADA

- 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.
- Cepeda-Nieto, A.C., and H. A. Barrera-Saldana. 1997. Cloning and sequencing of the coat protein gene of a new isolate of citrus tristeza virus from Mexico. *Plant Disease* 81:693.
- Domínguez, A., A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri, M. Cambra, L. Navarro, P. Moreno, and L. Peña. 2002. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10:1-10.
- Góngora-Canul, C., P. Rivas-Valencia, N. Ruiz-García, E. Loeza-Kuk, G. Mora-Aguilera, D. Ochoa-Martínez, M. A. Gutiérrez-E. and R. Álvarez-Ramos. 2004. Spatial pattern of citrus tristeza in Tamaulipas, México. *Phytopathology* 94:S35.
- Loeza-Kuk, E., 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del citrus tristeza virus. Tesis de Maestría en Ciencias 84 p. Colegio de Postgraduados.
- Müller, G. W., M. L. P. N. Targón, and M. A. Machado. 1999. Trinta anos do uso do clone pré-imunizado 'Pera IAC' na citricultura paulista. *Laranja* 20: 385-398.

- Nava-Coronel, M., S. Silva-Vara, A. Morales-Loredo, V. J. Febres, C. L. Niblett, R. F. Lee, and M. A. Rocha-Peña. 1999. Caracterización serológica y molecular de algunos aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos de Nuevo León, México. Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, México. Resumen No. 284.
- Palacios-Torres, E. C., Gutiérrez Espinosa, M. A. and Moore, G. A. 2001. Agrobacterium mediated transformation of 'Marsh' and 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) and 'Valencia' sweet orange [*C. sinensis* (L.)Osbeck] with the coat protein gene of Citrus Tristeza Closterovirus. In: Ledesma, N., and Campbell, R. J. eds. Proc. of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. 44:107-110.
- Palacios-Torres, E. C., M. A. Gutiérrez-E, V. J. Febres, D. L. Ochoa-Martínez, and G. A. Moore. 2003. Transformación genética de *Citrus aurantium* L. con una doble construcción del citrus tristeza closterovirus. p. 119. In: Resúmenes de la Conferencia Panamericana de Fitopatología. Abril 5-10. South Padre Island. USA.
- Ruiz-García, N., G. Mora-Aguilera, G. Ramírez-Valverde, D. Ochoa-Martínez, E. Loeza-Kuk, and R. Alvarez-Ramos. 2004. Consideraciones espaciales en el muestreo sistemático: El caso del virus tristeza. Fitopatología Brasileira 29:S220.
- Sanford, J. C., and S. A. Johnston. 1985. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite own genome. Journal of Theroretical Biology 113:395-405.
- Silva Vara, S., M. A. Peña del Río, R. Peña-Martínez, N. Villegas-Jiménez, K. F. Byerly-Murphy, and M. A. Rocha-Peña. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. Agrocencia 35:441-450.
- Waterhouse, P. M., W. Ming-Bo, and T. Lough. 2001. Gene silencing as an adaptative defense against viruses. Nature 411:834-842.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

IMPORTANCIA DE LA CITRICULTURA

La citricultura representa una industria de importancia relevante en varios países, especialmente en aquellos ubicados en regiones tropicales y subtropicales. La producción global de estas especies supera los 107 millones de toneladas, en donde destacan cinco países: Brasil, Estados Unidos, China, México y España (Figura 1a). El registro histórico de la producción indica la producción creciente en países como Brasil y China, mientras que en otros países ésta se ha mantenido estable. Las principales especies cítricas cultivadas son: naranja dulce, toronjas y/o pomelos, mandarinas y limas ácidas (Figura 1b).

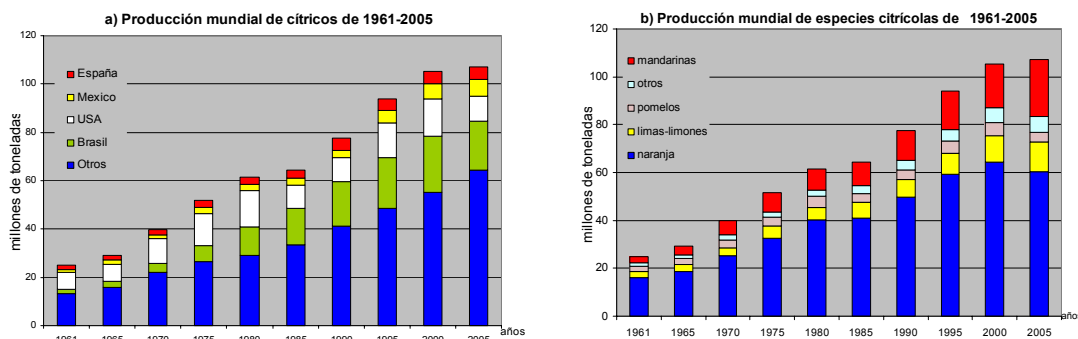


Figura 1. Situación cítrica mundial. a) Principales países productores. b) Producción histórica de diferentes especies comerciales de cítricos (fuente: FAOSTAT, 2007, <http://faostat.fao.org>).

Es interesante observar que en Brasil, la producción alcanzó un ritmo de crecimiento elevado en la década de 1970, justo en los años cuando la protección cruzada contra la tristeza de los cítricos había demostrado su efectividad y su uso era generalizada (Müller y Costa, 1977).

Por su parte, México posee más de medio millón de hectáreas establecidas en condiciones climáticas diversas y emplea al naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) como portainjerto predominante. La superficie está mayoritariamente ocupada con naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), seguido por limas (particularmente *C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) y limones, mandarinas (*C. reticulata*) y pomelos (*C. paradisi* Macf.) (Figura 2a). En términos generales la productividad es ligeramente mayor a la media

mundial, pero comparado con los principales países productores, México aun tiene deficiencias en este rubro.

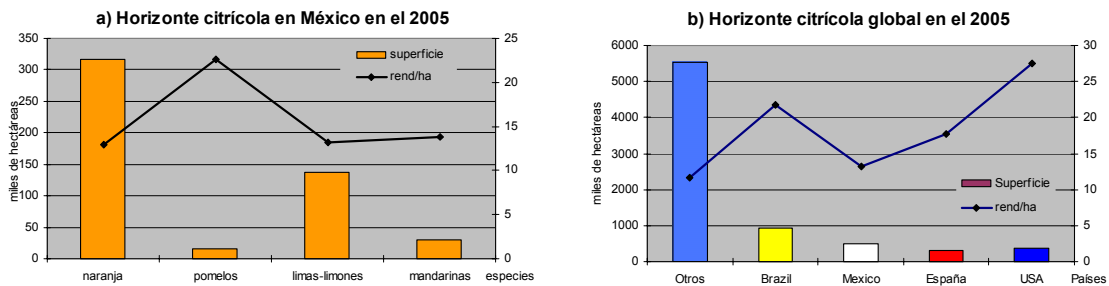


Figura 2. La citricultura mexicana. a) Distribución de la superficie cítrica por especie. b) Productividad de la industria cítrica mexicana comparada con otros países (fuente: FAOSTAT, 2007, <http://faostat.fao.org>).

Diversos factores han generado un comportamiento dinámico en la citricultura, entre los que se pueden mencionar las exigencias del mercado consumidor, como en el caso de los pomelos en donde las variedades antiguas y/o blancas son reemplazadas por otras con pulpa y albedo más pigmentados y con menor número de semillas (Moore, 2001; Gmitter, 1995).

Otros factores pueden estar relacionados a variables agronómicas, como sensibilidad a condiciones edáficas adversas, sequía, intolerancia al frío y finalmente a agentes bióticos que en conjunto han provocado el reemplazo de materiales usados como portainjertos o incluso el abandono de las áreas cítricas.

HISTORIA DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

En 1910, en Sudáfrica se reportó la muerte de cítricos establecidos sobre naranjo agrio, el cual sin haberse asociado directamente con un virus, se considera como el primer reporte de daños por la enfermedad tristeza de los cítricos (Weber, 1943). Posteriormente en Sudamérica, Argentina en 1931 (Fernández-Valiela, 1961) y Brasil en 1937, se encontró una enfermedad que ocasionaba el declinamiento de los cítricos, la muerte y pudrición de las raíces absorbentes. Los estudios etiológicos indicaron que el agente causal era un virus (Wallace y Fawcett, 1947).

ANTECEDENTES DEL CTV

El virus causante de la tristeza de los cítricos pertenece al género *Closterovirus* que junto con los géneros *Ampelovirus* y *Crinivirus* conforman a la familia Closteroviridae. El género *Closterovirus* alberga individuos que se caracterizan por tener viriones mayores a 1000 nm, con genomas que oscilan entre 15 a 20 kb y con cápside conformada por dos subunidades. Este género tiene tres tipos de genoma representados por el *beet yellow virus*, *citrus tristeza virus* y *beet yellow stunting virus* (BYV, CTV y BYSV respectivamente), cuya organización genómica parece indicar diferentes estados evolutivos dentro del género (Martelli *et al.*, 2002).

Información genómica

En una planta infectada por el CTV es común encontrar moléculas grandes de RNA que corresponden a la forma replicativa del virus, pero también es posible detectar moléculas pequeñas que corresponden a alguno de los nueve RNA's subgenómicos (sgRNA) que son expresados a partir de los marcos abiertos de lectura (ORF) del extremo 3' y cuya información será expresada posteriormente por traducción. Cada uno de los RNAs existe como cadena sencilla, pero también puede poseer una contraparte de doble cadena (dsRNA) que llegan a acumularse en altas concentraciones (Hilf *et al.*, 1995; Mawassi *et al.*, 1995b). Estos sgRNAs tienen una función muy importante en la generación de RNAs defectivos (D-RNA) y en los eventos de recombinación (Mawassi *et al.*, 1995a y b).

Los estudios encaminados a conocer la función de cada sgRNA, son limitados por las características propias del virus entre las que destacan: un genoma grande que restringe las metodologías que involucran procesos de clonación y obtención de cDNA del genoma completo. En 1999, Satyanarayana y colaboradores desarrollaron una metodología que permitió obtener un clon de cDNA del genoma completo a partir de dsRNA, capaz de infectar y replicarse en protoplastos de tabaco sin la expresión de todos los ORFs. Con el avance actual se conoce la función de varios ORFs. Para facilitar su identificación se han denominado de acuerdo al peso de la proteína generada después de su traducción, el orden de los ORFs es de acuerdo a su posición en la dirección al extremo 3' (Figura 3).

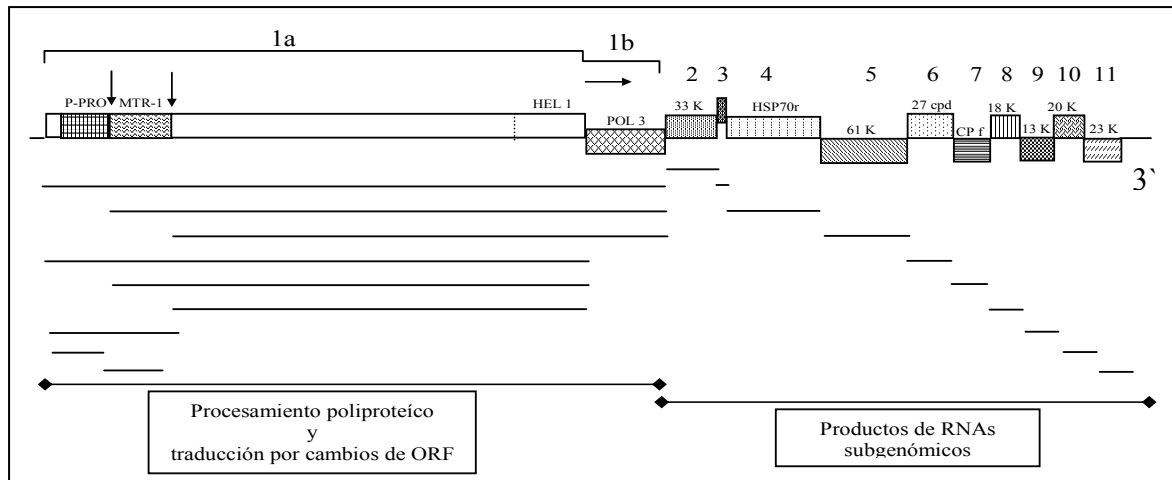


Figura 3. Organización genómica del *Citrus Tristeza Virus*. Tomado de Karasev *et al.*, 1995.

Las proteínas codificadas en el genoma del CTV son las siguientes: P33 de función desconocida, p6 proteína hidrofóbica involucrada en actividades transmembranales, p65 es homóloga a la proteína de choque térmico HSP70 y junto con p61 esta involucrada en la correcta formación de la capa proteica de los viriones, también parecen indicar el límite exacto en el nucleótido 630 del extremo 3' para detener la cobertura de p27 durante la formación del virión (Satyanarayana *et al.*, 2000 y 2004). El producto de p27 inicia el proceso de encapsidación del RNA y cubre una porción terminal pequeña del virión formando la capa proteica y parece ser una copia divergente de p25 (Febres *et al.*, 1994 y 1996; Satyanarayana *et al.*, 2004). Por su parte p25, la capa proteica mayor, cubre el 95 % de la extensión del virión (Karasev *et al.*, 1995). La función de P18 y p13 continúa siendo desconocida. P20 es una proteína involucrada en la formación de inclusiones virales amorfas (Gowda *et al.*, 2000). P23 es una proteína con alta afinidad a moléculas de RNA y regula la acumulación de cadenas de RNA (López *et al.*, 2000; Satyanarayana *et al.*, 2002). Al parecer p20, p23 y p25 están involucradas en la supresión de silenciamiento en las plantas; p20 y p25 son capaces de suprimir la translocación del silenciamiento, mientras que p20 y p23 inhiben el silenciamiento intracelular (Xieng and Guo, 2006).

Los UTRs son regiones no traducibles con secuencias altamente conservadas (97 al 99.3 %) en el extremo 3' con 107 nucleótidos y variables en el extremo 5' (42 al 67%) con 207 bases de longitud. Por su variabilidad, el extremo 5' ha sido usado para

clasificar los aislamientos en tres grupos separados por severidad. El alineamiento de secuencias indica una variación no continua y distribuida en picos que es característico de las quasiespecies. La estructura secundaria de este extremo genera una estructura con dos lazos presente en prácticamente todos los aislamientos, su función *in vivo* es el reconocimiento del sitio e iniciación de la replicación (Satyanarayana *et al.*, 1999). En otros virus este extremo mejora el proceso de traducción viral (Mushegian *et al.*, 1995).

Por su parte, el extremo 3' parece contribuir a realizar la replicación eficiente *in vivo* del CTV, al iniciar la síntesis de la cadena anti-sentido o negativa de RNA, la traducción efectiva y estable de los RNAs mensajeros del virus (Satyanarayana *et al.*, 1999).

En el genoma del CTV se ha observado la presencia de una secuencia homóloga a la proteína HSP70, la cual es una proteína de choque térmico altamente conservada y que cumple la función de “chaperona” molecular en todos los organismos celulares. Estas proteínas se caracterizan por aparecer en células estresadas por choque térmico que intentan recuperarse, apoyan en el plegamiento de otras proteínas, desensamble de complejos proteicos, importación de proteínas de diferentes organelos y transporte de receptores (Lodish *et al.*, 2003).

La presencia de una secuencia homóloga a HSP70 en los closterovirus es una característica única, en donde el extremo terminal de carbono es altamente divergente. Esta proteína parece ser útil en el movimiento del virus a través del plasmodesmo al interactuar con la maquinaria celular de translocación y en el ensamble de subunidades para la replicación genómica o de cadenas subgenómicas así como en la integración de partículas virales en donde actúa con proteínas de cápside para su correcto plegamiento y contribuye a detener el ensamblaje de la capa menor en los viriones en el sitio exacto (Dolja *et al.*, 1994; Satyanarayana *et al.*, 2004).

Alteraciones histológicas inducidas por CTV

La primera y más completa caracterización de los daños inducidos por la infección de CTV fue realizada por Schneider (1973) y posteriormente por Román y *et al.*, (2004). El daño principal que ocasionan en las plantas infectadas algunas variantes de CTV, es el colapso del floema en el punto de unión del injerto-patrón.

El primer síntoma anatómico de la infección es la presencia de células cromáticas en la zona del floema. En esta área los tubos cribosos del floema funcional se colapsan y tornan necróticos lo cual induce hiperactividad en la producción de floema en el sitio de unión, sin embargo, las células del floema son menores de lo normal y funcionan temporalmente antes de necrosarse y ser empujado del cambium por otra capa de floema nuevo, en un evento cíclico.

Algo similar ocurre en el síntoma de aclaramiento de nervaduras donde el virus provoca su formación sin la capa de fibras primarias del floema y células de la vaina con espacios vacíos que son ocupados por células hipertróficas, lo que provoca que estas estructuras y tejidos adyacentes se tornen claros (Schneider, 1973).

La infección por CTV con frecuencia induce la formación de vesículas citoplásmicas que contienen moléculas de dsRNA las cuales surgen inicialmente por la proliferación del retículo endoplásmico (Martelli *et al.*, 2003). También llamados cuerpos de inclusión, estas estructuras son agregados de estructuras macromoleculares en el interior de la célula.

Síntomas

Con esta variabilidad, el CTV puede producir una amplia gama de síntomas en sus hospedantes, los cuales pueden diferir en función del hospedante, variante y ambiente.

Por ser una enfermedad altamente dispersa y destructiva, el primer síntoma descrito fue el declinamiento rápido o marchitamiento repentino (Quick Decline en inglés) en árboles de naranja de California (Wallace y Fawcett, 1947). En este reporte también se reconoció al causante de la tristeza como un agente viral y al parecer fue el origen del material infectado de Israel. En este síntoma es posible observar que los árboles producen muchos frutos pequeños y que éstos así como las hojas permanezcan pegados al árbol después de su muerte. Además también se puede observar una banda café a la altura del punto de injerto (Rocha-Peña *et al.*, 1995). Estos síntomas también han sido descritos para la enfermedad de muerte súbita de los cítricos, recientemente detectada en Brasil, con la diferencia de que ésta está ligada principalmente al portainjerto *C. limonia* y la muerte de los árboles es más rápida (Román *et al.*, 2004).

El síntoma conocido como amarillamiento de plántulas (seedling yellow), fue descrito por primera vez en Australia por Fraser, quien también demostró su transmisión por *T. citricida* (Wallace y Drake, 1961).

Otro síntoma descrito es el picado de tallo (stem pitting), el cual se detecta al remover la corteza de los árboles de pomelo y naranjo dulce infectados por aislamientos severos. La severidad de los aislamientos que lo origina se denota cuando incluso los portainjertos reconocidos como tolerantes muestran esta sintomatología (Olson, 1956 y 1958; Rocha-Peña *et al.*, 1995).

Los síntomas de reducción de crecimiento, aclaración de nervaduras y deposición de corcho en mismas fueron mencionados desde 1956 por Olson al inocular plantas de limón mexicano con aislamientos severos.

Términos y niveles taxonómicos en virus

En el caso de los virus, las definiciones para niveles taxonómicos sub-específicos no son del todo claras. Incluso en el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés), no se tiene una regla para los niveles sub-específicos (Fauquet *et al.*, 2005; García-Arenal *et al.*, 2001). A continuación se mencionarán los niveles subespecíficos que pueden aplicarse para los virus.

El término empleado para el nivel de especie en virus es quasispecie. Este se refiere a la secuencia nucleotídica dominante en la distribución genómica, con una gama de mutantes genómicos (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000). Este nombre se deriva de la tasa de error que se presenta durante el ensamblaje y cada quasispecie es en sí una unidad de selección. Las secuencias están en equilibrio hasta que éste es roto por factores ambientales. También es definida como la distribución dinámica de las miríadas de mutantes que constituye la población viral. La secuencia maestra puede ser el promedio de la secuencia o la secuencia consenso de la población (Domingo *et al.*, 1996).

A niveles taxonómicos subespecíficos se usa el término raza (*strain* en inglés), una definición no reconocida oficialmente, que se refiere a virus que pertenecen a la misma especie y que difieren en algunas características biológicas, serológicas y/o moleculares que son propias, estables y hereditarias de cada grupo (Fauquet *et al.*, 2005; García-Arenal *et al.*, 2001). La homología entre secuencias virales de este nivel

es de 90 a 91%. El término aislamiento (*isolate* en inglés) se puede definir como una muestra biológica purificada con el paso del virus a través de diferentes hospedantes. Tampoco tiene un estatus taxonómico, se refiere a una muestra viral particular identificado y asociado con un identificador (Fauquet *et al.*, 2005). La variante (*variant* en inglés) se refiere a virus que difieren ligeramente en su secuencia genómica, síntomas inducidos o formas de transmisión. La similitud entre las secuencias virales en este nivel es de 96-98%. El término haplotipo que es usado con bastante frecuencia, es una contracción de la palabra *haploid genotype*, y son variantes de secuencia genética, sin embargo dada que la replicación viral sigue el proceso de un organismo haploide (cadenas simples), la variante será una representante con un genotipo único o haplotipo (García-Arenal *et al.*, 2001).

Variabilidad en virus

A pesar de ser genomas poco complejos, la variabilidad de los genomas virales dificulta su clasificación y ha llevado a la decisión de llamar quasiespecies a un grupo de individuos que comparten cierta homología en sus genomas.

Los primeros indicios de la existencia de variabilidad e inestabilidad genética en virus se conocieron incluso antes de la técnica de secuenciación (Domingo *et al.*, 2001). Esta característica los hace candidatos poco recomendables para su caracterización, contrario a otros organismos como hongos y bacterias. La inestabilidad genética se acentúa en virus de RNA, que están sujetos a factores de mutación como depurinación, oxidación, depirimidación, deaminación y daños por radiación. Esto sumado a las conclusiones del experimento clásico de Spiegelman y colaboradores (1971) (citado por Domingo *et al.*, 2001) que sugieren que en condiciones *in vitro*, los virus de RNA y posiblemente de otros tipos, son capaces de evolucionar de manera análoga a los organismos vivos, eliminando porciones genómicas no necesarias en una evolución degenerativa.

Otra fuente de variabilidad es la recombinación, que en organismos vivos es muy importante en el intercambio de información, pero fue un fenómeno poco estudiado en organismos de RNA hasta antes de la década de 1980. En su estudio se ha recurrido a dos metodologías: una es la comparación de secuencias de variantes para detectar

diferencias altas entre porciones genómicas, que indican sucesos de recombinación entre virus divergentes. Otra forma es la inducción experimental de la recombinación en condiciones que favorezcan la acumulación de recombinantes. La recombinación puede actuar a nivel interespecífica o intraespecífica.

El proceso por el cual se da la recombinación aún es desconocida, no obstante se han propuesto varios mecanismos, el más factible es el cambio de molde durante la replicación viral en infecciones mezcladas de variantes genómicas o virus distintos, lo que puede dar como resultado que algunos genomas posean porciones catalogadas como exclusivas para variantes severas e intercaladas entre ellas secuencias de genomas virales atenuados o no severos (Vives *et al.*, 2005). Para tal efecto, las regiones ricas en adenina (A) y uracilo (U) han sido nombradas como zonas de alta recombinación homóloga. Una teoría propone que la polimerasa puede detenerse en la región con la secuencia rica de AU y que la unión débil entre el molde y la cadena en síntesis favorece la liberación de la polimerasa, seguida por una asociación de la cadena nueva con otra cadena molde. La nueva asociación es estabilizada por las regiones secuencia arriba ricas en citosina (G) y guanina (C) que forman uniones más fuertes (Nagy y Bujarski, 1998). Se ha propuesto que un mecanismo similar trabaja en la generación de los RNA defectivos (Ayllón *et al.*, 1999) y en otros miembros de la familia Closteroviridae (Rubio *et al.*, 2000).

Por la composición y organización del genoma del CTV, al igual que otros virus de genomas unipartitas, debería existir una tasa de recombinación menor. Sin embargo, parece que los sgRNAs intervienen en el proceso de recombinación para generar moléculas de D-RNAs lo que les confiere la categoría de componentes estructurales para el intercambio y reorganización de información genómica (Yang *et al.*, 1997).

La recombinación puede ser una herramienta para la corrección de genomas defectivos, mutantes o no funcionales, así como para aumentar la variabilidad y diversidad que eleve la aptitud adaptativa de los virus (Domingo *et al.*, 2001). También es útil para remediar los inconvenientes que representa depender de vectores para su transmisión y perpetuación (ver transmisión por áfidos), que es bastante frecuente en CTV, como lo sugieren resultados experimentales.

Selección y competencia entre especies de RNA

En condiciones *in vivo*, si dos o más variantes de secuencia de un virus están en una planta, ellas competirán entre sí por los recursos disponibles para su replicación. El resultado de la competencia puede ser conocido si las moléculas difieren fuertemente entre ellas. Si los recursos necesarios para la amplificación están disponibles en exceso, la dinámica de cada subpoblación molecular estará determinada por sus características propias, lo que originará que la subpoblación con mayor tasa de replicación aumente exponencialmente a expensas de aquellas con tasa menor. Este comportamiento se puede extrapolar a condiciones *in vitro* con el mismo resultado (Domingo *et al.*, 2001, Rubio *et al.*, 2000).

Diferenciación de aislamientos de CTV

Desde 1956 se detectaron mezclas de aislamientos que convivían en un mismo hospedante (Grant y Higgins, 1956). Desde entonces se han detectado numerosas variantes y aislamientos de CTV que poseen diferencias genéticas, biológicas, de transmisibilidad y velocidad de replicación, entre otras (Powell *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1993).

La razón de la alta variación en aislamientos de CTV, no está bien determinada, pero el carácter perenne del frutal puede coadyuvar por la cantidad de ciclos de replicación viral. Se han generado varios métodos para la detección y caracterización.

Los métodos de caracterización biológica de aislamientos de CTV, involucran la inducción de síntomas en un conjunto de hospedantes (Cuadro 1). Este fue el primer método de caracterización para diferenciar aislamientos severos y no severos (Grant y Costa, 1950). A pesar de tantos años de uso, el método aún sigue vigente y es imprescindible en la caracterización definitiva de cualquier aislamiento. Sin embargo, es bastante laborioso y susceptible a enmascarar aislamientos mezclados.

La caracterización serológica tuvo su auge en las décadas de 1980 y 1990, sin embargo, debido a que la obtención de los anticuerpos necesarios es un proceso complicado y costoso, su uso ha declinado en los últimos años, además de con esta técnica es posible analizar únicamente el 3.5 % del genoma viral específicamente la expresada en la capa proteica (Moreno y Guerri, 1997).

Con el advenimiento de los métodos del DNA recombinante, se han diseñado nuevas técnicas de caracterización que usan la capacidad de los ácidos nucleicos para unirse a secuencias complementarias y formar puentes de hidrógeno.

Empleado para detectar ausencia y presencia de virus, el estudio de los perfiles de RNA de doble cadena (dsRNA) separados en medios sólidos y porosos fue uno de los primeros métodos moleculares usados para caracterizar aislamientos de CTV (Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990; Guerri *et al.*, 1991). Sin embargo, el análisis de dsRNA tiene desventajas como presentar variabilidad por factores ambientales y biológicos, así como la obtención de perfiles ambiguos por RNA defectivo (dRNA) entre aislamientos severos y no severos que impiden su caracterización por este método.

Cuadro 1: Reacción inducida en plantas indicadoras de cítricos para la caracterización biológica de aislamientos de CTV (tomado de Rocha-Peña *et al.*, 1995).

Categoría	<i>C. aurantifolia</i>	<i>Sinensis/aurantium</i>	<i>C. aurantium</i>	<i>C. paradisi</i> Picado de tallo	<i>C. sinensis</i> Picado de tallo
0 [¶]	- [§]	-	-	-	-
I	+ [§]	-	-	-	-
II	+	+	-	-	-
III	+	+	+	-	-
IV	+	+	+	+	-
V	+	+	+	-	+
VI	+	-	+	+	-
VII	+	-	-	+	+
VIII	+	-	-	+	-
IX	+	-	-	-	+
X	+	+	+	+	+

[¶] Categorías en orden creciente en cuanto a severidad [§] Presencia (+), ausencia (-) de síntomas.

La hibridación molecular ha sido usada para caracterizar aislamientos de CTV desde 1984 (Rosner y Bar-Joseph, 1984), quienes emplearon sondas de cDNA. Al igual que con los métodos serológicos, también son necesarias muchas sondas para poder realizar una caracterización eficiente y se requiere conocer la secuencia del genoma a analizar (Moreno y Guerri *et al.*, 1997).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) combinada con otras técnicas ha permitido la caracterización más rápida y eficiente que las técnicas mencionadas anteriormente. Entre las que siguen vigentes se encuentran aquellas que usan

iniciadores con secuencias conservadas y específicas a un tipo de aislamiento (Ayllón *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004) y aquellas que usan un conjunto de iniciadores para conformar un tipo de marcador genético en función de la amplificación positiva o negativa y que prácticamente analiza el genoma completo (Brlansky *et al.*, 2003; Hilf *et al.*, 2005). Un método de caracterización que se ha usado de manera extensa y que aún sigue siendo vigente en estudios iniciales de poblaciones, es el análisis de la conformación polimórfica de cadenas sencillas de DNA (SSCP). Este análisis usa la propiedad de desnaturalización y linearización de las cadenas de DNA en condiciones desnaturalizantes (temperatura de 90-100°C y un solvente orgánico como formamida), que evitan eficientemente su reasociación y permanecen como secuencias monocatenarias. Estas cadenas se someten a un campo eléctrico en una matriz de poliacrilamida concentrada (8 a 17%) no desnaturalizante, lo que las obliga a migrar por separado, una vez que dejan el ambiente desnaturalizante, que favorece que las cadenas tiendan a formar puentes hidrógeno entre las bases que la conforman, lo que origina estructuras secundarias y terciarias. Aún cuando las cadenas posean el mismo número de bases, la configuración de las estructuras estará en función de las secuencias de nucleótidos presentes y determinará su comportamiento durante la electroforesis (Nibblet *et al.*, 2000).

La amplificación de secuencias de DNA a partir de RNA, puede inducir sustituciones de bases en las secuencias de nucleótidos originales por artefactos de la RT-PCR con lo que se puede sobreestimar la variabilidad de las poblaciones (Bracho *et al.*, 1998). Para conocer las tasas de error de la técnica, se han realizado algunos estudios. Los resultados indican que SSCP es una herramienta poderosa y precisa pues el error observado (0.002) es bajo (Kong *et al.*, 2000).

Los estudios de variabilidad en las poblaciones de CTV por SSCP, han corroborado el valor de esta técnica pues permite detectar cambios en: subpoblaciones de variantes de secuencia durante la transmisión por áfidos (d'Urso *et al.*, 2000); en la frecuencia y abundancia de aislamientos en ensayos de protección cruzada (Sambade *et al.*, 2002); encontrar un patrón característico para aislamientos de diferente severidad con porciones del ORF p23. En amplificaciones con RNA de diferentes aislamientos en

concentraciones variables, la intensidad de las bandas correspondieron con la abundancia de la especie de DNA presente en la reacción (Rubio *et al.*, 2000).

La principal limitación de SSCP es que las diferencias entre perfiles no indica la distancia genética entre muestras y solo muestra de manera cualitativa la estructura de la población. Sin embargo, la combinación de esta técnica con otra como la secuenciación, agilizan la caracterización de la población, sin el riesgo de subestimar la variabilidad existente (d' Urso *et al.*, 2003).

TRANSMISIÓN DE CTV

Al igual que todas las especies del género Closterovirus, el CTV únicamente es transmitido en forma natural por áfidos en una forma semi-persistente y artificialmente mediante injerto. Aunque varios de los closterovirus son transmisibles por inoculación mecánica, en el caso del CTV este método da pocos resultados.

Transmisión por áfidos

Toxoptera citricida fue el primer áfido que se demostró por Meneghini en 1946, ser vector de CTV. Posteriormente en California se detectó la dispersión de CTV en ausencia de *T. citricida*, por lo que fue necesaria la búsqueda de otro vector, que resultó ser *Aphis gossypii*, aunque con menor eficiencia (Dickson *et al.*, 1951). *A. spiraecola* fue considerado como vector en 1954, *T. auranti* en 1956 y *A. craccivora* en 1965 (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984).

Por su capacidad de transmisión, *T. citricida* ha tenido amplia relevancia en la historia de la tristeza de los cítricos. Se le ha atribuido la ruptura acelerada de la resistencia obtenida por protección cruzada en cultivos de pomelo en Florida (Powell *et al.*, 2003).

A. gossypii es la segunda especie en importancia, su alta capacidad de transmisión se ha evidenciado en la dispersión de CTV en epidemias de California (Yokomi y DeBorde, 2005), Florida (Garnsey y Jackson, 1975), España (Cambra *et al.*, 2000) e Israel (Bar-Joseph, 1978). La capacidad de transmisión de *A. gossypii*, tiene la particularidad de que parece no favorecer la transmisión de un tipo de aislamiento, de tal forma que posee la misma capacidad de transmisión para aislamientos severos que no severos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Transmisibilidad de aislamientos de CTV obtenidos con *T. citricida* y *A. gossypii* como vectores.

Raza	Aislamientos	<i>T. citricida</i> [¶]	<i>A. gossypii</i> [¶]	Origen-destino [§]	Referencias	
Severa	B13, B-53	59, 44	9-21	SO Vinous-ML	Yokomi <i>et al.</i> , 1994	
	T-308	-	28	SO-ML	Hermoso de Mendoza <i>et al.</i> , 1984	
	VT	-	58	SO-ML	Racciah <i>et al.</i> , 1976	
	T-514, SY567, SY 568	-	63, 63, 43	SO Vinous-SO	Roistacher <i>et al.</i> , 1984	
	T-387	-	30	SO Pineapple - ML	Hermoso de Mendoza <i>et al.</i> , 1988	
	ST, CT, VT	-	4, 4, 40	SO Vinous-SO	Bar-Joseph <i>et al.</i> , 1973	
	B10, B11, B14, B-27, B-30, B-31, B-42, B-47, B-53, B-58, B-65, B-76, B-77	-	35, 0, 50, 0, 25, 30, 10, 56, 40, 63, 22, 30, 70	SO Vinous-ML	Yokomi <i>et al.</i> , 1989	
	PB-44, PB47, PB-63, PB-64, PB-65, PB-66, PB-68, PB-72, PB-75, PB-87, PB-90, PB-100, PB-212	0, 0, 20, 15, 11.8, 5, 15, 25, 55, 10, 30, 20, 0	-	SO-SO	Broadbent <i>et al.</i> , 1996	
	Y-7, Y-6, Y-3, T-36, T-3, MG-3	3.6, 3.5, 2.4, 2, 0, 0	-	GF-ML	Lin <i>et al.</i> , 2002	
	FS-627, B-192	**	-	SO-ML	Brlansky <i>et al.</i> , 2003	
	T-36, Y-3, Y-6, Y-7	2, 2.4, 3.5, 3.6	-	GF-ML	Huang <i>et al.</i> , 2005	
	GS-1, GS-2, OS-1GFS-1, GFS-2, OFS-1, OFS-2	2, 1, 3, 3, 3, 3, 5, 3	-	GF-ML	Powell y Lin, 2005	
	B23, B11	47, 11	14, 0	SO-ML	Yokomi <i>et al.</i> , 1994	
	T-300	-	78	SO-ML	Hermoso de Mendoza <i>et al.</i> , 1984	
	T-300	-	90	SO Pineapple -ML	Hermoso de Mendoza <i>et al.</i> , 1988	
	No severa	B-12, B23	-	40, 60	SO Vinous-ML	Yokomi <i>et al.</i> , 1989
		PB23, PB-61, PB-62, PB-67, B-209,	0, 15, 25, 5, 0	-	SO-SO	Broadbent <i>et al.</i> , 1996
		T-30 (36 subaislamientos)	-	0-62 (17.7)	SO Vinous-ML	Yokomi y DeBorde 2005
		Y-23, T-4, T-26, T-30, Y-5, Y-26	3, 2, 1.2, 0, 0, 0 (Single)	-	GF-ML	Lin <i>et al.</i> , 2002
T-30, Y-23		0, 3	-	GF-ML	Huang <i>et al.</i> , 2005	
MCN2d		**	-	SO-ML	Brlansky <i>et al.</i> , 2003	
GM-1, GM-2, OM-1, OM-2	2, 1, 3, 4	-	GF-ML	Powell y Lin, 2005		

[¶] Porcentaje de transmisión obtenido

[§] Hospedantes cítricos que fueron donadores o receptores: GF= pomelo, SO= naranja dulce, ML= Limón mexicano.

Mecanismos de transmisión en áfidos

La transmisión semi-persistente se refiere a un proceso en el cual, el virus no penetra en el hemocelo del vector, ni atraviesa ninguna membrana y permanece en el vector por horas o días. Algunos autores lo clasifican como transmisión no circulativa, el virus permanece en la porción inicial del tracto digestivo y en el estilete, en este caso la

eficiencia de la transmisión aumenta conforme el tiempo de alimentación es mayor, lo cual puede sugerir que el virus se une de manera estable hasta que los sitios de unión son saturados (Gray y Banerjee, 1999).

La forma de cómo las partículas se liberan del tejido del vector para su ingreso al hospedante vegetal, es poco estudiada y no hay evidencias experimentales de su mecanismo. Posiblemente durante el proceso de regurgitación, se liberen proteinasas en la saliva del insecto que cortan los sitios de unión del virus con el vector (Salomon, 1992).

La transmisión es un fenómeno altamente probabilístico si se toma en cuenta que en adquisición e inoculación no solo depende de la actividad del áfido sino también de la concentración o titulación del virus (Gray *et al.*, 1991). Últimamente se ha usado gráficas de registro de penetración (EPG), las cuales han sido útiles para conocer el comportamiento y dinámica de adquisición e inoculación de virus por áfidos. De esta manera se ha encontrado que los áfidos adquieren a los virus no persistentes en la última fase de la punción intracelular superficial (II-3), mientras que los virus persistentes son adquiridos durante la fase de alimentación del floema. Aun cuando no existe suficiente información que avale el mecanismo de adquisición de los virus transmitidos de manera semipersistente, los estudios realizados indican que están siendo adquiridos durante la alimentación del floema y sin la necesidad de un componente proteínico como la p1 reportadas para Potyvirus (Palacios *et al.*, 2002).

Reconocimiento y selectividad

En un evento de transmisión restrictiva, es altamente probable la selección de un solo tipo de genoma infeccioso que constituye por si solo un proceso evolucionario, que en su caso estará influenciado por las características inherentes al genoma original. Mientras que en inoculaciones con una población viral con variantes de secuencia diferentes, la competencia será de tal forma que una sola subpoblación tratará de ocupar todos los sitios de infección (Novella *et al.*, 1999).

Esta observación ha sido parcialmente confirmada en CTV pues en muestras iniciales con mezclas de aislamientos, varios de los subaislamientos aun presentaban

mezclas, inclusive de características biológicas diferentes (Brlansky *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 1993).

Efecto de la selección en subpoblaciones de variantes de secuencia

Cuando un virus depende exclusivamente de un vector para su perpetuación en el ecosistema, está sujeto a la pérdida de variabilidad que reduce su aptitud y capacidad general de adaptación. Sin embargo, en hospedantes perennes como los cítricos se ha evidenciado que la variabilidad persiste a nivel planta (Moreno *et al.*, 1990) Los virus transmitidos por vectores están continuamente sujetos a la reducción de su población efectiva e incrementan la posibilidad de seleccionar una población mutante (Domínguez *et al.*, 2001). Por el contrario, el movimiento de poblaciones masivas de virus genera mayor aptitud adaptativa. Con estas evidencias se presume que los cambios en la aptitud son rápidos, de tal forma que el paso por diferentes hospedantes se reflejará en una modificación en la distribución de la quasiespecie (Ayllón *et al.*, 2006).

En ocasiones, pueden coexistir dos subpoblaciones virales que compiten de manera equilibrada en el mismo hospedante por varias generaciones. Sin embargo, al compartir nichos biológicos es inevitable que una de ellas sea desplazada, la razón puede ser cambios ambientales que rompen el equilibrio inicial alcanzado entre ellas (Domínguez *et al.*, 2001). Este fenómeno ha sido documentado en la transmisión de aislamientos conocidos de CTV, en la cual ciertos aislamientos severos se pierden o encriptan durante algunas sub-transmisiones mediadas por *T. citricida* y resurgen en transmisiones posteriores.

T. citricida ha sido sujeto a ensayos de transmisión en donde mostró mayor aptitud para transmitir aislamientos severos, así como ser capaz de separar aislamientos severos indetectables de los no severos y expresarlos en transmisiones realizadas por un solo áfido (Broadbent *et al.*, 1996; Brlansky *et al.*, 2003; Powell y Lin, 2005). Esta aptitud no varía entre individuos adultos alados y ápteros (Lin *et al.*, 2002). Las evidencias muestran la necesidad de modificar los procedimientos de diagnóstico aplicados en material vegetal de propagación, al no ser capaces de detectar aislamientos severos de baja frecuencia o enmascarados.

MANEJO DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

El manejo de la tristeza de los cítricos se ha abordado por diferentes métodos, mismos que se expondrán en los apartados siguientes como fueron usados a lo largo de la historia.

Protección cruzada

La protección cruzada es un fenómeno en el cual un virus es capaz de proteger a la planta contra de los efectos de otro, generalmente una variante del mismo virus; el virus protector se distingue del virus dañino porque se inocula primero en la planta. De las reacciones posibles que se pueden originar, las deseables son la protección unidireccional y recíproca (Müller y Costa, 1977; Ponz y Bruening, 1986).

El virus protector puede modificar varias condiciones dentro de la planta infectada y usar los recursos del hospedante que son necesarios para el virus invasor produciendo una molécula que interfiere con la replicación de éste. Asimismo compite en la replicación, de tal forma que replica viral (una RNA polimersa-RNA dependiente, RdRP) multiplica las cadenas más abundantes que son las del virus protector, encapsida el genoma del virus invasor impidiendo su multiplicación e inmoviliza el genoma del virus invasor por la cadena positiva del virus protector durante el ciclo de multiplicación (Ponz y Bruening, 1986).

Con los mecanismos de interferencia antes indicados, la protección cruzada tiene aplicaciones prácticas sobre todo con variantes del mismo virus altamente relacionadas.

En cítricos, la protección cruzada ha demostrado su eficiencia en áreas donde el CTV es de naturaleza endémica y con alta prevalencia de aislamientos agresivos. Por medio de esta práctica, se ha continuado con la producción en países como Brasil donde ha sido todo un éxito, que combinado con la búsqueda continua de aislamientos protectivos, entre otras cosas, ha permitido el establecimiento de más de 80 millones de plantas pre-inoculadas con el aislamiento "Pera IAC" (Costa y Müller, 1980; Müller *et al.*, 1999). Sudáfrica es otra región donde la condiciones distribución y poblaciones de aislamientos de CTV han justificado el uso de protección cruzada con el aislamiento "Nartia" (Van Vuuren *et al.*, 1993). Finalmente están los casos de Australia y Florida en Estados Unidos que también han incursionado en el uso de aislamientos de menor

severidad con fines protectivos (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Powell *et al.*, 1999). A pesar de no funcionar de manera eficiente en la combinación naranjo dulce/naranjo agrio, es deseable encontrar algún aislamiento o mecanismo funcional para dicha combinación, ya que posee alta tolerancia a blight y otros problemas (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Resistencia genética en los cítricos

Durante el proceso del ataque de un patógeno a su hospedante, se dan una serie de interacciones que pueden ocasionar diferentes procesos entre los cuales se encuentran: Susceptibilidad, definida como la incapacidad de superar los efectos de los daños causados por el factor patogénico. Resistencia, la cual es la capacidad para oponerse al desarrollo patogénico incluyendo el ingreso, establecimiento y dispersión interna del mismo y por otra parte puede ser una interferencia a algún proceso de reconocimiento patógeno-vector. En el hospedante la presencia o ausencia de síntomas está determinada por la sensibilidad (reacción con síntomas severos) o tolerancia (habilidad para soportar la invasión sin mostrar síntomas), respectivamente. Existe otra reacción conocida como hipersensitividad que es la máxima sensibilidad a nivel celular, pero a nivel macro es una resistencia que previene la invasión y dispersión del agresor y que se expresa como un síntoma de tipo necrótico (Bos y Parlevliet, 1995).

Hasta la fecha, después de muchos años de investigación en la interacción de CTV-cítricos, no hay reportes claros que evidencien los mecanismos de resistencia o tolerancia que pueda presentar una especie en particular, aunque se tienen caracterizados y reconocidos a cultivares y especies por su resistencia o tolerancia al CTV. Solo se ha encontrado resistencia genética en *Poncirus*, la cual está determinada, al parecer, por un gen dominante que provee resistencia de amplio espectro a CTV. Hasta la fecha no se conoce exactamente cuál es este gen aunque existen 10 posibles candidatos comprendidos en un segmento de 121 kb agrupados junto con un grupo de genes ligados a resistencia contra otros patógenos (Rai, 2006). Sin embargo, en un trabajo similar que incluyó a *C. aurantium* con una infección antigua, se encontraron al menos cinco tipos de interacción, lo cual parece desmentir la idea de un solo gen relacionado con la resistencia por lo que transferir el gen de resistencia de *P. trifoliata*, puede no funcionar contra el declinamiento (Bernet *et al.*, 2004).

El estudio con protoplastos para conocer la expresión de alguno de estos genes, sugiere que la resistencia al CTV detectada en la planta es debida a la incapacidad del virus para movilizarse y no por la inhibición de la replicación viral en las células (Albiach-Martí *et al.*, 2004). Esta especie, junto con un híbrido (citrumelo x citrange), posee combinaciones dominantes de los genes de CTV. Al parecer existen segregantes para el gen dentro de *Poncirus* en una relación 3:1, claro indicio del efecto de un gen dominante (Fang *et al.*, 1998).

En especies cultivadas comercialmente, no se han detectado genes que indiquen algún tipo de mecanismo involucrado en la tolerancia. De manera general, las especies del género *Citrus* son susceptibles a CTV ya que permiten la infección y establecimiento del virus, razón por la cual todos los materiales comerciales cultivados son catalogados como susceptibles o tolerantes pero no resistentes. Los estudios encaminados a conocer los mecanismos de resistencia involucrados en la interacción CTV-*Citrus*, detectaron actividad de 4 a 5 veces mayor de ribonucleasas y peroxidasas en combinaciones susceptibles de *C. sinensis*/*C. aurantium* (Beltrán *et al.*, 1976). Al parecer las plantas tolerantes con daño en los vasos conductores, sobrellevan la infección con la regeneración intensa de tejido floemático funcional hasta alcanzar el punto de equilibrio.

TRANSGÉNICOS CON PROTECCIÓN DERIVADA DE PATÓGENOS (PDR)

El primer reporte de la generación de una planta de tabaco (*Nicotiana* sp) con secuencias externas o ajenas de DNA insertas en su genoma, para obtener resistencia contra el Tobacco mosaic virus (virus del mosaico del tabaco), con lo que expresan resistencia derivada del patógeno (PDR) (Powell-Abel, 1986). Estas plantas referidas como transgénicas, han sido generadas actualmente con éxito para la resistencia a patógenos, insectos y factores ambientales, así como bioreactores para la síntesis dirigida de compuestos como vacunas, combustible, polímeros y el mejoramiento de cualidades nutricionales entre otras.

El área cultivada con este tipo de plantas ha ido en aumento en los últimos años, principalmente en los países desarrollados y que cuentan con menor biodiversidad. En 1996 se cultivaron 1.7 millones de hectáreas y para 2006, el área fue 100 millones, en

donde participaron 22 países, entre ellos México con soya y algodón. Los materiales más cultivados son aquellos que muestran tolerancia a herbicidas (68%), seguidos por materiales con tolerancia a insectos (19%) (James, 2003). Es interesante observar que más del 68 % está dirigida hacia el uso de herbicidas de una sola compañía y ninguna variedad de trigo transgénico ha sido establecida comercialmente.

Objetivo de los transgénicos con PDR

El principio de la resistencia derivada de patógeno (PDR) a través de la transgenia, implica que la planta transgénica, posea una porción del genoma del patógeno del cual se quiere proteger. La protección obtenida puede ser por una proteína o por medio de RNA de interferencia. En el caso de los virus, las regiones genómicas usadas con mayor frecuencia son las que corresponden a la capa proteica por su implicación en el reconocimiento y patogénesis y la replicasa en antisentido para inhibir la replicación viral; con menor frecuencia se ha usado las relacionadas a la proteína del movimiento viral en la planta, aunque en realidad cualquier porción del genoma viral es susceptible de ser usada si es capaz de interferir con algún proceso biológico (Lomonosoff, 1995).

El problema con la inserción del transgen, es que sigue parámetros aleatorios de los cuales los investigadores no tienen control. Por esta razón, mismas construcciones, vectores de transformación y material vegetal a inocular generan genotipos diferentes y por ende niveles así como formas de protección variables.

Tipos de resistencia obtenida con secuencias de capa proteica

Es posible encontrar dos tipos de resistencia en las plantas transgénicas con la porción de la capa proteica traducible: a) mediada por la expresión de la proteína que ofrece bajo nivel de protección pero de amplio espectro que puede actuar inclusive contra virus de la misma familia, el mecanismo parece basarse en evitar la des-encapsidación de los viriones por entropía (fuerza mínima para el equilibrio de partículas) o b) uso del viroplasma, sitio específico con condiciones iónicas idóneas para la des-encapsidación (Matthews, 1991). Otro tipo de protección es mediada por RNA (Baulcombe, 1996), la cual además de ser eficiente es también muy específica a

secuencias relacionadas que pueden requerir de un factor inductor, tal como niveles altos de transcritos para la activación del mecanismo de degradación (Lindbo y Dougherty, 1992; Pang *et al.*, 1994).

En términos globales, el silenciamiento postranscripcional de genes (PTGS por sus siglas en inglés) es un mecanismo que regula la PDR, dicho mecanismo está presente de manera natural en plantas y virus. El mecanismo de PTGS en los transgénicos se caracteriza por la degradación altamente específica de RNA mensajeros y cualquier otra secuencia similar o complementaria. Esta degradación impide que en la planta transgénica se acumulen cadenas de RNA viral (Waterhouse *et al.*, 2001).

En el caso de RNA transcrito por la planta y con el mismo sentido que el RNA viral, se ha sugerido que la RNA polimerasa de la planta, hace una copia complementaria del RNA transgénico (cRNA) y que los cRNAs pequeños potencian la degradación del RNA objetivo. Teóricamente, el RNA en antisentido actúa por medio de la unión e hibridización con el RNA objetivo, formando dsRNAs que son degradadas por dsRNAsas o simplemente impidiendo su traducción (Baulcombe, 1996).

Antecedentes exitosos de PDR

La resistencia convencional como estrategia de control duradera contra virus, ha sido exitosa en máximo diez virus (Fraser, 1990), por ejemplo, el control del CTV en Brasil en la década de 1940 a 1950 se realizó con el cambio a portainjertos tolerantes. Mientras que la PDR ha sido usada de manera exitosa en condiciones experimentales contra varios virus con genoma RNA de cadena positiva, principalmente en plantas anuales (Powell-Abel, 1986; Lomonosof, 1995). Sin embargo, los casos de plantas transgénicas con PDR a virus u otros patógenos liberadas comercialmente, no totalizan el 1% del total de la superficie establecida. China es el único país donde se cultiva comercialmente una variedad de papaya transgénica resistente a virus. A pesar de que la PDR es una alternativa contra virus, patógenos destructivos y difíciles de manejar por su tipo de parasitismo, el retraso en la liberación de este tipo de materiales puede deberse a la necesidad de evaluar la estabilidad del transgene, los riesgos biológicos, ambientales y el potencial para su comercialización aún cuando es una herramienta

eficaz contra los virus, para los cuales se tienen pocas alternativas de control (Martelli, 2001).

Transformación genética de cítricos

La transformación genética en estas especies ha sido dirigida principalmente a la obtención de PDR y se ejemplifican en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Transformación genética realizada en cítricos.

Especie transformada	Resistencia	Gen inserto	Referencias
<i>Citrus limonia</i>	<i>Phytophthora nicotianae</i> y bacterias	opsinas bacterianas	Azevedo <i>et al.</i> , 2006
Citrange Carrizo	blight	p12	Kayim <i>et al.</i> , 2004
<i>Poncirus trifoliata</i>	Citrus mosaic virus (CiMV)	CP CiMV	Iwamani <i>et al.</i> , 2004
<i>C. aurantium</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	p25 CTV	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1997
<i>C. paradisi</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	RdRp y p25	Moore <i>et al.</i> , 2000
<i>C. aurantifolia</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	p25 CTV	Domínguez <i>et al.</i> , 2000
Citrange Troyer	<i>Citrus tristeza virus</i>	RdRp CTV	Piestun <i>et al.</i> , 2000
<i>C. paradisi</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	P25 no traducible (NT)	Yang <i>et al.</i> , 2000
<i>C. aurantium</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	p25 CTV	Ghorberl <i>et al.</i> , 2000
<i>C. paradisi</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	RdRp, p20, p27 y 3'end	Febres <i>et al.</i> , 2003
<i>C. macrophylla</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	p23+UTR 3'end	Batuman <i>et al.</i> , 2006
<i>C. paradisi</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	RdRp No traducible,	Cevik <i>et al.</i> , 2006
<i>C. aurantifolia</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>	P23	Fagoaga <i>et al.</i> , 2006
Con propósito diferente a PDR			
Citrange Carrizo	Sales	HAL2 de <i>Sacharomyces</i>	Cervera <i>et al.</i> , 2000
Citrange Troyer	herbicidas	Basta	Piestun <i>et al.</i> , 2000
Ponkan	--	ribonucleasa	Li <i>et al.</i> , 2002

Evaluación de tolerancia y métodos de inoculación

Los trabajos de evaluación de variedades transgénicas de cítricos ha sido hechos en condiciones de invernadero o en campo (Estación Experimental Agrícola de Texas), ya que aun no se liberan comercialmente, la evaluación de plantas transgénicas con PDR contra CTV la transgenia se ha realizado en pocos casos, debido posiblemente a que la transmisión mecánica de este virus es difícil. Debido a lo anterior las inoculaciones para la evaluación de PDR, se han realizado vía injerto, en esas condiciones las evidencias indican rompimiento de la resistencia (Febres *et al.*, 2003), probablemente por la gran cantidad de viriones inoculados. El mecanismo de protección por expresión proteica tiene pocas probabilidades de detener la infección con alta carga de inóculo, mientras que la resistencia mediante RNA de interferencia que si soporta

este tipo de inoculación puede no estar presente o activado en la planta transgénica. Esto se soporta en otro trabajo, en donde plantas transformadas con capa proteica de CTV inoculadas por injerto o áfidos sí mostraron resistencia e incluso en algunos casos diversos grados de tolerancia (Domínguez *et al.*, 2002).

Durante la evaluación de PDR en plantas de *C. aurantifolia* transformadas con el gen p23, se detectó con análisis tipo Northern (evalúa la cantidad de RNA viral producido), que la resistencia obtenida es resultado del silenciamiento postranscripcional de genes, activada incluso antes de la inoculación. Asimismo se detectó metilación de la secuencia transgénica en plantas resistentes al virus sin acumulación de RNA pequeños de interferencia (siRNA) y demetilación en plantas susceptibles (Fagoaga *et al.*, 2006).

En un grupo de *C. macrophylla* transformados con p23+UTR3', se evaluó la PDR obtenida con la expresión de dsRNAs de esta secuencia, los resultados indicaron que la resistencia obtenida no fue estable ni duradera después de la infección (Batuman *et al.*, 2006). Una metodología para evaluar la PDR según la secuencia viral, fue realizada en protoplastos transgénicos a CTV e infectados con TMV en polietilenglicol (Olivares-Fuster *et al.*, 2003).

Un recurso novel en la evaluación de transgénicos que permita monitorear la carga viral y el haplotipo aislado usado en una evaluación es el uso de PCR cuantitativa, de la cual aún no hay casos reportados de su uso en esta área.

En el análisis de los mecanismos involucrados en la protección cruzada y la derivada de patógenos (transgénicos) se infiere que: la protección cruzada puede ofrecer mayor protección que PDR al ocupar los sitios de infección por el virus protector (Dodds, 1982), uso de todo el genoma viral y de una amplia gama de variantes de secuencia. Además en la protección cruzada el efecto es en toda la planta por la infección sistémica del virus protector, mientras que PDR puede no ser translocable, sin embargo, los casos de protección en toda la planta involucran fenómenos de silenciamiento transcripcional de genes que no se presenta en todos los transgénicos (Fagoaga *et al.*, 2006, Fuh-jyh *et al.*, 2000; Xieng y Guo, 2006).

En contraparte, algunas desventajas de la protección cruzada es que se encuentra limitada por la aparición de variantes que rompen la protección, el virus protector puede

inducir cierta pérdida productiva y la protección esta ligada al hospedante. La búsqueda de aislamientos altamente protectivos y transmisibles en general es por observación natural y no controlable. Pueden así mismo surgir cambios en el haplotipo dominante y aislamientos enmascarados (Muller y Costa, 1987; Souza *et al.*, 2002). Finalmente debe quedar claro que la protección cruzada no es una panacea para manejar aislamientos severos, solo debe ser usada para alargar la vida productiva de los árboles en áreas con alta incidencia de CTV.

LITERATURA CITADA

- Albiach-Marti, M. R., J. W. Grosser, S. Gowda, M. Mawassi, T. Satyanarayana, S. M. Garnsey, and W. O. Dawson. 2004. Citrus tristeza virus replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding* 14: 117-128.
- Ayllón, M. A., C. López, J. Navas-Castillo, M. Mawassi, W. O. Dawson, J. Guerri, R. Flores, and P. Moreno. 1999. New defective RNAs from Citrus tristeza virus: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. *Journal of General Virology* 80:817-821.
- Ayllón, M. A., C. López, J. Navas-Castillo, S. M. Garnsey, J. Guerri, R. Flores, and P. Moreno. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of the citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of the three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology* 146:27-40.
- Ayllón, M. A., L. Rubio, V. Sentandreu, A. Moya, J. Guerri, and P. Moreno. 2006. Variations in two gene sequences of Citrus tristeza virus alter host passage. *Virus Gene* 32:119-128.
- Azevedo, F. A., F. A. A. Mourão-Filho, B. M. J. Mendes, W. A. B. Almeida, E. H. Schinor, R. Pio, J. M. Barbosa, S. Guidetti-Gonzalez, H. Carrer, and E. Lam. 2006. Genetic transformation of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the bO (bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. *Plant Molecular Biology Reporter* 24:185-196.

- Bar-Joseph, M. 1978. Cross protection incompleteness: a possible cause for natural spread of citrus tristeza virus after a prolonged lag period in Israel. *Phytopathology* 68:1110-1111.
- Bar-Joseph, M., and G. Loebenstein. 1973. Effects of strain, source plant and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology* 63:716-720.
- Bar-Joseph, M., R. Marcus, and R. F. Lee. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27:291-316.
- Batuman, O., M. Mawassi, and M. Bar-Joseph. 2006. Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to Citrus tristeza virus sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* 33:319-327.
- Baulcombe, D. C. 1996. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell* 8:1833-1844.
- Beltran, J. P., Carbonell, J. and Conejero, V. 1976. Peroxidase and ribonuclease in resistant and susceptible orange trees affected by tristeza. *Revista Agroquímica y de Tecnología de Alimentos* (Abstract)
- Bernet, G. P., M. P. Bretó, and M. J. Asins. 2004. Expressed sequence enrichment for candidate gene analysis of citrus tristeza virus resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 108:592-602.
- Bos, L., and J. E. Parlevliet, 1995. Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward a consensus in plant pathology and crop protection. *Annual Review of Phytopathology* 33:69-102.
- Bracho, M. A., M. Moya, and E. Barrio. 1998. Contribution of *Taq* polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *Journal of General Virology* 79:2921-2928.
- Brlansky, R. H., V. D. Damsteegt, D. S. Howd, and A. Roy. 2003. Molecular analyses of *Citrus tristeza virus* subisolates separated by aphid transmission. *Plant Disease* 87:397-401.
- Broadbent, P., R. H. Brlansky, and J. Indsto. 1996. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80:329-333.

- Cambra, M., M. R. 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.
- Cervera, M., C. Ortega, A. Navarro, L. Navarro, and L. Peña. 2000. Generation of transgenic citrus plant with the tolerance to salinity gene HAL2 from yeast. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75:26-30.
- Cevik, B., R. F. Lee, and C. L. Niblett. 2006. Genetic transformation of *Citrus paradisi* with antisense and untranslatable RNA-dependent RNA polymerase genes of Citrus tristeza closterovirus. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30:173-182.
- Costa, A. S., and G. W. Muller. 1980. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Disease* 64:538-541.
- d'Urso, F. D., A. Sambade, A. Moya, J. Guerri, and P. Moreno. 2003. Variation of haplotype distributions of two genomic regions of *Citrus tristeza virus* populations from eastern Spain. *Molecular Ecology* 12: 517-526.
- d'Urso, F., M. A. Rubio, L. Ayllón, A. Sambade, A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri, 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.
- Dickson, R. C., R. A. Flock, and McD. Jhonson. 1951. Insect transmission of citrus Quick-Degeneration Virus. *Journal of Economic Entomology* 44:173-176.
- Dodds, J. A. 1982. Cross protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Virology* 118:235-240.
- 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., V. A. Karasev, and V. E. Koonin. 1994. Molecular biology and evolution of closterovirus. *Annual Review of Phytopathology* 32:261-285.

- Domingo, E., C. Escarmís, N. Sevilla, A. Moya, S. F. Elena, J. Quer, I. S. Novella, and J. J. Holland. 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB Journal* 10:859-864.
- Domingo, E., C. K. Biebricher, M. Eigen, and J. J. Holland. 2001. Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. Landes Biosciences. Texas. USA. 180p.
- Domínguez, A., A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri, M. Cambra, L. Navarro, P. Moreno, and L. Peña. 2002. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10:1-10.
- Domínguez, A., J. Guerri, M. Cambra, L. Navarro, P. Moreno, and L. Peña. 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 19:427-433.
- Fagoaga, C., C. López, A. H. Mendoza, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores, and L. Peña. 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology* 60:153-165.
- Fang, D. Q., C. T. Federici, and M. L. Roose. 1998. A High-Resolution Linkage Map of the Citrus Tristeza Virus Resistance Gene Region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* 150: 883–890.
- Fauquet, C.M., and J. Stanley. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* 150: 2151–2179.
- Febres, V. J., C. L. Niblett, R. F. Lee, and G. A. Moore. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cells Reports* 21:241-428.
- Febres, V. J., H. R. Pappu, E. J. Anderson, S. S. Pappu, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 1994. The diverged copy of the citrus tristeza virus coat protein is expressed *in vivo*. *Virology* 201:178-181.

- Febres, V. J., L. Asholuin, M. Mawassi, M. Bar-Joseph, K. L. Manjunath, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86:1331-1335.
- Fernandez Valiela, M. V. 1961. Citrus virus diseases in Argentina. *In: Proc. 2nd Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Price, W. C. (ed.) Gainesville, Florida. pp:231-237.
- Fraser R. S. S. 1990. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28:179-200.
- Fuh-Jyh, J., C. Fagoaga, S. Z. Pang, and D. A. Gonsalves. 2000. Single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *Journal of General Virology* 81:2103-2109.
- García-Arenal, F., A. Fraile, and M. J. Malpica. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39:157-186.
- Garnsey, S. M., and J. L. Jackson. 1975. A destructive outbreak of tristeza in central Florida. *Proceedings of Florida State Horticulturist Society* 88:65-69.
- Ghorbel, R., A. Domínguez, L. Navarro, and L. Peña. 2000. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiology* 20:1183-1189.
- Gmitter, G. F. 1995. Origin, evolution and breeding of the grapefruit. *Plant Breeding Reviews* 13:345-363.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey, M. Cambra, P. Moreno, M. Irey, and J. Borbon. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits* 52:397-404.
- Gowda, S., T. Satyanarayana, C. L. Davis, J. Navas-Castillo, M. R. Albiach-Marti, M. Mawassi, N. Valkov, M. Bar-Joseph, P. Moreno, and W. O. Dawson. 2000. The p20 gene product of citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274:246-254.
- Grant, T. J., and A. S. Costa. 1950. A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology* 41:117-122.

- Grant, T. J., and R. P. Higgins. 1956. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* 47:272-276.
- Gray, S. M., A. G. Power, D. M. Smith, A. J. Seaman, and N. S. Altman. 1991. Aphid transmission of barley yellow dwarf virus: acquisition access periods and virus concentration requirements. *Phytopathology* 81:539-545.
- Gray, S. M., and N. Banerjee. 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:128-148.
- Guerri, J., P. Moreno, N. Muñoz, and M. E. Martínez. 1991. Variability among Spanish Citrus tristeza virus isolates revealed by double-stranded RNA analysis. *Plant Pathology* 40:38-44.
- Gutiérrez-E, M.A., D. Luth, and G.A. Moore. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Report* 16: 745-753.
- Hermoso de Mendoza, A. J. F. Ballester-Olmos, and L. J. A. Pina. 1988. Comparative aphid transmission of a common citrus tristeza virus isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. In: Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol. Timmer, L. W., S. M. Garnsey, and L. Navarro. Riverside, California. Pp: 68-70.
- Hermoso de Mendoza, A., J. F. Ballester-Olmos, and J. A. Pina. 1984. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. In: Proc. 9th Conf. Int. Org. Citrus Virol. L. W. Timmer, and J. A. Dodds (eds.) Riverside, California. pp: 23-27.
- Hilf, M. E., Karasev, A. V., Pappu, H. R., Gumpf, D. J., Niblett, C. L. and Garnsey. S. M. 1995. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208:576–582.
- Hilf, M. E., Mavrodieva, V. A., and Garnsey, S. M. 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* 95:909-917.

- Huang, Z., P. A. Rundell, X. Guan, and C. 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.
- Huang, Z., P. A. Rundell, X. Guan, and C. A. Powell. 2005. Evaluation of the transmission of different field sources of citrus tristeza virus and the separation of different genotypes by single brown citrus aphids. *Hortscience* 40:687-690.
- Iwanami, T., T. Shimizu, T. Ito, and T. Hirabayashi. 2004. Tolerance to citrus mosaic virus in transgenic trifoliolate orange lines harboring capsid polyprotein gene. *Plant Disease* 88:865-868.
- James, C. 2003. Global review of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs # 30. www.biotech.pd.cnr.it/docs/commerc_trangenici.pdf.
- Karasev, A. V., V. P. Boyko, S. Gowda, O. V. Nikolaeva, M. E. Hilf, E. V. Koonin, C. L. Niblett, K. Cline, D. J. Gumpf, R. F. Lee, S. M. Garnsey, D. J. Lewandowski, and W. O. Dawson, 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208:511-520.
- Kayim, M., T. L. Ceccardi, M. J. G. Berretta, G. A. Barthe, and K. S. Derrick. 2004. Introduction of a citrus blight-associated gene into Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbc. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 23:377-385.
- 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.
- Li, D. D., W. Shi, and X. X. Deng. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Reports* 21:153-156.
- Lin, Y., R. H. Brlansky, and C. A. Powell. 2002. Inefficient transmission of citrus tristeza virus from grapefruit by single brown citrus aphids. *Hortscience* 37:936-939.
- Lindbo, J. A., and Dougherty, W. G. 1992. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189:725-733.

- Lodish, H., S. A. Berk, P. Matsudaira, A. C. Kaiser, M. Krieger, F. H. Lodish, P. M. Scott, L. Zipursky, and J. Darnell. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th edition. W. H. Freeman & Co. 961 p.
- Lomonosoff, G. P. 1995. Pathogen derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 33:323-343.
- Lopez, C., J. Navas-Castillo, S. Gowda, P. Moreno, and R. Flores. 2000. The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* 26: 462-470.
- Martelli, G. P. 2001. Transgenic resistance to plant pathogens: benefits and risks. *Journal of Plant Pathology* 83:37-46.
- Martelli, G. P., A. A. Agranovsky, M. Bar-Joseph, D. Boscia, T. Candresse, R. H. A. Coutts, V. V. Dolja, B. W. Falk, D. Gonsalves, W. Jelkmann, A. V. Karasev, A. Minafra, S. Namba, H. J. Vetten, G. C. Wisler, and N. Yoshikawa, 2002. The family closteroviridae revised. *Archives of Virology* 147:2039-2044.
- Matthews, R. E. F. 1991. *Plant Virology*. Third edition. Academic Press. USA. 835 p.
- Mawassi, M., E. Mietkiewska, M. E. Hilf, L. Ashoulin, A. V. Karasev, R. Gafny, R. F. Lee, S. M. Garnsey, W. O. Dawson, and M. Bar-Joseph. 1995^a. Multiple species of defective RNAs in plants infected with citrus tristeza virus. *Virology* 214:264–268.
- Mawassi, M., R. Gafny, D. Gagliardi, and M. Bar-Joseph. 1995^b. Populations of citrus tristeza virus contain smaller-than-full-length particles which encapsidate sub-genomic RNA molecules. *Journal of General Virology* 76:651–659.
- Moore, G. A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of citrus from molecular markers. *Trends in Genetics* 17: 536-540.
- Moore, G. A., D. Luth, M. McCaffery, V. J. Febres, S. M. Garnsey, and C. L. Niblett. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) with genes from citrus tristeza virus. *Acta Horticulturae* 535:237-244.
- Moreno, P., and J. Guerri. 1997. Variability of citrus tristeza closterovirus (CTV): methods for differentiating isolates. pp. 97-108. *In: Filamentous viruses of woody plants*. P. L. Monette, ed. Trivanderum, India.

- Moreno, P., J. Guerri, J. F. Ballester-Olmos, R. Albiach, and M. E. Martínez. 1993. Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42:35-41.
- Moreno, P., J. Guerri, and N. Muñoz. 1990. Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology* 80:477-482.
- Müller, G. W., and A. S. Costa. 1977. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *International Society of Citriculture: Proceedings of the International Society of Citriculture* 3:868-872.
- Muller, G. W., and A. S. Costa. 1987. Search for outstanding plant in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica* 19:197-198.
- Müller, G. W., M. L. P. N. Targón, and M. A. Machado. 1999. Trinta anos do uso do clone pré-imunizado 'Pera IAC' na citricultura paulista. *Laranja* 20: 385-398.
- Mushegian, R.A., and J. R. Shepherd. 1995. Genetic Elements of Plant Viruses as Tools for Genetic Engineering. *Microbiological Reviews* 59:548–578.
- Nagy, P. D., and J. J. Bujarski. 1998. Silencing homologous RNA recombination hot spots with GC-rich sequences in Brome mosaic virus. *Journal of Virology* 72:1122-1130.
- Niblett, C. L., H. Genc, B. Cevik, 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.
- Novella, I. S., J. Quer, E. Domingo, and J. J. Holland. 1999. Exponential fitness gains of RNA virus populations are limited by bottleneck effects. *Journal of Virology* 73:1668-1671.
- Olivares-Fuster, A., G. H. Fleming, M. R. Albiach-Martí, S. Gowda, W. O. Dawson, and J. W. Grosser. 2003. Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic citrus based on virus challenge of protoplasts. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 39:567-572.

- Olson, E. O. 1956. Mild and severe strains of tristeza virus in Texas citrus. *Phytopathology* 46:336-341.
- Olson, E. O. 1958. Responses of lime and sour orange seedlings and four scion-rootstock combination to infection by strains of tristeza virus. *Phytopathology* 48:455-459.
- Palacios, I., M. Drucker, S. Blanc, S. Leite, A. Moreno, and A. Fereres. 2002. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology* 83: 3163-3171.
- Pang, S. Z., J. H. Bock. C. Gonsalves, J. L. Slightom, and D. Gonsalves. 1994. Resistance of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants to tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospoviruses: evidence of involvement of the N protein and N gene RNA in resistance. *Phytopathology* 84:243-249.
- Piestun, D. O. Batuman, X. Che, R. Gofman, V. Filatov, and S. Zypman. 2000. Truncated version of the citrus tristeza virus (CTV) replicase and basta resistance genes incorporated in transgenic troyer citrange. *Acta of Horticulturae* 535:223-230.
- Ponz F., and G. Bruening. 1986. Mechanism of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 24:355-381.
- Powell, C. A., and Y. Lin. 2005. Separation of citrus tristeza virus isolates in mixed infections through transfer by single brown citrus aphids. *Hortscience* 40:694-696.
- Powell, C. A., R. R. Pelosi, and M. Cohen. 1992. Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus. *Plant Disease* 76:141-144.
- Powell, C. A., R. R. Pelosi, P. A. Rundell, and M. Cohen. 2003. Breakdown of cross protection of grapefruit from decline inducing isolates of citrus tristeza virus following introduction of the brown citrus aphid. *Plant Disease* 87:1116-1118.
- Powell, C. A., R. R. Pelosi, P. A. Rundell, E. Stover, and M. Cohen. 1999. Cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of citrus tristeza virus. *Plant Disease* 83:989-991.

- Powell-Abel, P. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Raccah, B., G. Loebenstein, and M. Bar-Joseph. 1976. Transmission of citrus tristeza virus by the melon aphid. *66*: 1102-1104.
- Raccah, H.B., G. Loebenstein, and S. Singer. 1980. Aphid transmissibility variants of citrus tristeza virus in infected citrus trees. *Phytopathology* 70:89-93.
- Rai, M. 2006. Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Molecular Biology* 61:399-414.
- Rocha-Peña, M. A., R. F. Lee, R. Lastra, C. L. Niblett, F. M. Ochoa-Corona, S. M. Garnsey, and R. K. Yokomi. 1995. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79:437-445.
- Roistacher, C. N., M. Bar-Joseph, and D. J. Gumpf. 1984. Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by small populations of *Aphis gossypii*. *Plant Disease* 68:494-496.
- Roman M. P., M. Cambra, J. Juárez, P. Moreno, N. Duran-Vila, F. A. O. Tanaka, E. Alves, E. W. Kitajima, P. T. Yamamoto, R. B. Bassanezi, D. C. Teixeira, W. C. Jesus J., A. J. Ayres, N. Gimenez-Fernandes, F. Rabenstein, L. F. Giroto, and J. M. Bove. 2004. Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. *Plant Disease* 88:453-467.
- Rosner, A., and M. Bar-Joseph. 1984. Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology* 139:189-193.
- 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. In: Proc. 14th Conf. Int. Org. of Citrus Virol. Yokomi, R. K., J. V. da Graça and R.F. Lee (eds.). Riverside, California. pp:12-17.
- Ruiz-Jarabo C.M., A. Arias, E. Baranowski, C. Escarmilla, and E. Domingo. 2000. Memory in Viral Quasispecies. *Journal of Virology* 74: 3543–3547.

- Salomon, R. 1992. Proteolytic cleavage of the N-terminal region of potyvirus coat protein and its relation to host recovery and vector transmission. *Archives of Virology Suppl.* 5:75-76.
- Sambade, A. L. Rubio, S. M. Garnsey, N. Costa, G. W. Müller, M. Peyrou, 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* 51:257-263.
- Satyanarayana, T., S. Gowda, M. A. Ayllón, and W.O. Dawson. 2004. Closterovirus bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proceedings of the National Academy of Science* 101:799-804.
- Satyanarayana, T., S. Gowda, M. A. Ayllón, M. R. Albiach-Martí, S. Rabindran, and W. O. Dawson. 2002. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 300:140–152.
- Satyanarayana, T., S. Gowda, M. Mawassi, M. R. Albiach-Martí, M. A. Ayllón, C. Robertson, S. M. Garnsey, and W. O. Dawson. 2000. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278:253-265.
- Satyanarayana, T., S. Gowda, V. P. Boyko, M. R. Albiach-Marti, M. Mawassi, J. Navas-Castillo, A. V. Karasev, V. Dolfa. M. E. Hilf, D. J. Lewandowski, P. Moreno, M. Bar-Joseph, S. M. Garnsey, and W. O. Dawson. 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proceedings of the National Academy of Science* 96:7433–7438.
- Schneider, H. 1973. Cytological and histological aberrations in woody plants following infection with viruses, mycoplasmas, ryketssias and flagellates. *Annual Review of Phytopathology* 19:119-146.
- Silva Vara, S., M. A. Peña del Río, R. Peña-Martínez, N. Villegas-Jiménez, K. F. Byerly-Murphy, and M. A. 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. P. N. Targón, M. A. Takita, and M. A. Machado. 2002. Stability of the mild protective 'PIAC' isolate of citrus tristeza virus. Proc. 15th Conf. Int. Org. Citrus Virol. Milne, R. G., N. Durán-Vila and J. V. da Graça (eds.). Riverside, California. Pp:131-135.
- Van Vuuren, S. P., R. P. Collins, and J. V. da Graça. 1993. Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. Plant Disease 77:24-28.
- 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.
- Wallace, J. M. 1978. Virus and virus like disease. In: Reuther, W. Calavan, E. C. and Carman, G. E. Eds. The Citrus Industry. Vol. IV, 67-184.
- Wallace, J. M. and Drake, R. J. 1961. Seedling yellows in California. In: Proc. 2nd Conf. Int. Org. Citrus Virol. Price, W. C. (ed.) Gainesville, Florida. Pp:141-149.
- Wallace, J. M., and H. S. Fawcett. 1947. Quick decline of orange trees- a virus disease. Science 105: 315-316.
- Waterhouse, P. M., W. Ming-Bo, and T. Lough. 2001. Gene silencing as an adaptative defense against viruses. Nature 411:834-842.
- Weber, H. J. 1943. The tristeza disease of sour-orange rootstock. Proceedings of the American Society of Horticultural Science 43:160-168.
- Weiss, B. G., and S. Schlesinger. 1991. Recombination between Sindbis virus RNAs. Journal of Virology 65: 4017-4025.
- Xieng, Q., and H. S. Guo. 2006. Systemic antiviral silencing in plants. Virus Research 118:1-6.
- Yang, G., M. Mawassi, R. Gofman, R. Gafny, and M. Bar-Joseph. 1997. Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of citrus tristeza virus molecules. Journal of Virology 71: 9800-9802.
- Yang, Z. N., I. L. Ingelbrecht, E. Louzada, M. Skaria, and T. E. Mirkov. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). Plant Cell Reports 19:1203-1211.

- Yokomi, R. K., and R. L. DeBorde. 2005. Incidence, transmissibility, and genotype analysis of Citrus tristeza virus (CTV) isolates from CTV eradicated and noneradicated districts in central California. *Plant Disease* 89:859-866.
- Yokomi, R. K., R. Lastra, M. R. Stoetzel, V. D. Damsteegt, R. F. Lee, S. M. Garnsey, T. R. Gottwald, M. A. Rocha-Peña, and C. L. Niblett. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera:Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *Journal of Economic Entomology* 87:1078-1085.
- Yokomi, R. K., S. M. Garnsey, E. L. Civerolo, and D. J. Gumpf. 1989. Transmission of exotic citrus tristeza virus isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease* 73:552-556.

III. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y MOLECULARES DE AISLAMIENTOS DEL *CITRUS TRISTEZA VIRUS* DE VERACRUZ, TAMAULIPAS Y YUCATÁN

EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF CITRUS TRISTEZA VIRUS ISOLATES FROM VERACRUZ, TAMAULIPAS AND YUCATÁN STATES

Emiliano Loeza-Kuk¹, Patricia Rivas-Valencia¹, Elvia Carmelita Palacios Torres¹, Gustavo Mora-Aguilera¹, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa², Ángel Villegas-Monter², Eugenio Perez-Molphe-Balch³, Juan Jasso Argumedo⁴ y Ricardo Álvarez Ramos⁵.

RESUMEN

Los reportes indican que al convivir *T. citricida* y el *Citrus Tristeza Virus* (CTV), la proporción de aislamientos severos tiende a aumentar. Sin embargo, también existen datos que contravienen este comportamiento. En este trabajo, se estudiaron dos huertas de cítricos de Tamaulipas con incidencias iniciales de árboles infectados con CTV denominados como TH1=55 y TH2=66 árboles positivos sin la presencia de *T. citricida*, así como una huerta de Yucatán denominada como YH1 con incidencia inicial de 11 árboles infectados, con presencia de *T. citricida* desde 2001. La caracterización inicial de estos aislamientos por inmunocaptura RTPCR anidada y conformación polimórfica de la cadena sencilla de DNA, indicó que los aislamientos no son severos y tienen baja variabilidad: TH1= un haplotipo y TH2= siete y YH1=3. Después de tres años, la incidencia de árboles positivos aumentó a TH1=66, TH2=134 y YH1=75 árboles positivos. En el caso de YH1, los nuevos árboles positivos generalmente fueron del haplotipo tipo uno, sin evidencia de la presencia de

¹Fitopatología y ²Fruticultura Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México, C.P. 56230(loeza01@colpos.mx, ldaniel@colpos.mx). ³Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, C.P. 20100 Ags., Ags. México. ⁴Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Yucatán, Cd. Industrial, Mérida, Yucatán, México. ⁵Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Tamaulipas, Abasolo 12 Cd. Victoria Tamaulipas, México.

aislamientos severos en los árboles analizados ni en el vector. Esta transmisión difirió a lo observado en invernadero, en donde individuos de *A. gossypii* alimentados en plantas de naranjo infectadas con los aislamientos provenientes de Yucatán, Veracruz y Tamaulipas fueron infestadas para realizar pruebas de transmisión.

Palabras clave: *Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, SSCP, transmisión

ABSTRACT

Reports indicate that coexisting *T. citricida* and *Citrus Tristeza Virus* the ratio of severe isolate increases over no severe. However, there is also evidence where this behaviour has not been detected. In this work, two orchards from Tamaulipas (TH1 and TH2) and Yucatán (YHa) States were studied. Initial incidence was TH1=55, TH2=66 and YH1=11 positive trees, without and with *T. citricida* presence since 2001 respectively. The isolates in these initial populations were characterized through immunocapture nested RT-PCR as no severe. SSCP analysis detected for TH1 one haplotypes, seven for TH2 and three for YH1. In YH1 orchard, new positives usually were haplotype type one, no severe isolates were detected in new positive trees or *T. citricida* analyzed with the same method. Transmission results differs from obtained greenhouse transmission performed with *A. gossypii* reared on CTV positive trees containing isolates from Yucatán, Veracruz and Tamaulipas.

Keywords: *Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, SSCP, transmission

3.1. INTRODUCCIÓN

La tristeza de los cítricos es una enfermedad de importancia económica mundial causada por el *Citrus Tristeza Virus* (CTV). Desde su detección en 1937 en Brasil por Costa y Grant (1951), el patógeno ha ocasionado la muerte de más de 65 millones de árboles en varios países del mundo, siendo los más afectados España (60 %), Argentina (15 %), Brasil (9%), Venezuela (9 %) y EUA (3%) (Rocha-Peña *et al.*, 1995; Cambra *et al.*, 2000a).

Este virus presenta numerosas variantes que difieren en sintomatología, transmisibilidad, velocidad de dispersión y prevalencia. Estas características son determinantes en el comportamiento epidemiológico de la enfermedad y en los daños

ocasionados (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Gottwald *et al.*, 1998). En infecciones a nivel de campo, el CTV existe como mezcla de aislamientos o variantes de secuencia (Vs), especialmente en árboles expuestos por periodos prolongados a la infestación y alimentación por áfidos (Grant y Costa, 1950; Grant y Higgins, 1956; Powell *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1993). Históricamente se ha reportado a *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) como el vector más eficiente y con capacidad de inducir cambios en la población en beneficio de aislamientos severos; mientras que *Aphis gossypii* (Glover), *Aphis craccivora* (Koch), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) y *Aphis spiraecola* (Patch.) son de menor importancia (Yokomi *et al.*, 1994; Raccah, 1980; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; Gottwald, *et al.*, 1997; Halbert *et al.*, 2004). Estos insectos, especialmente *A. gossypii* y *T. citricida*, han sido empleados para separar mezclas de aislamientos originales. Durante estas transmisiones se ha reportado que un aislamiento puede desaparecer en una generación y reaparecer en la siguiente (Brlansky *et al.*, 2003; Broadbent *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1993; Ballester-Olmos *et al.*, 1993).

En el manejo de la enfermedad, desde la perspectiva regulatoria, una de las principales estrategias ha sido la erradicación de árboles infectados para reducir fuentes de inóculo y contagio. Según la variante viral y los vectores presentes, el CTV se puede diseminar localmente en un período de cuatro a ocho años (Gottwald *et al.*, 1997), dependiendo de la combinación cultivar-portainjerto (Broadbent *et al.*, 1996), condiciones climáticas y manejo de la plantación (Fishman *et al.*, 1983).

Se ha estipulado que el pulgón café (*T. citricida*), provoca dispersión en agregados, mientras que *A. gossypii* induce distribución aleatoria en áreas de hasta 200 metros (Gottwald *et al.*, 1996 y 1997). Así mismo se ha propuesto una direccionalidad en la dispersión que afectan árboles dentro del mismo surco (Marcus *et al.*, 1984; Bar-Joseph *et al.*, 1989).

El diseño de estrategias para el manejo de enfermedades virales, se debe sustentar en el estudio de la variante del virus y sus interacciones con los componentes del sistema epidemiológico (Randles, 1986). Para determinar la variante de un virus es necesaria la caracterización biológica, serológica y/o molecular con técnicas como el análisis de la cadena doble de RNA (dsRNA siglas en inglés),

hibridación con sondas específicas, análisis en la conformación polimórfica de la cadena sencilla de DNA (SSCP siglas en inglés) y secuenciación son las más usuales (Moreno y Guerri, 1997).

A nivel molecular los aislamientos del CTV poseen alta variación en el extremo 5', por lo que constituyen una población de variantes de secuencia, una de ellas dominante. El estudio estructural de una población de aislamientos mezclados puede generar resultados diferentes en función de la técnica de caracterización (Broadbent *et al.*, 1996; García-Arenal *et al.*, 2001; López *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1992).

El análisis por SSCP, ha permitido caracterizar la complejidad de una población de aislamientos de CTV e identificar cambios durante su transmisión (d'Urso *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000; Sambade *et al.*, 2002). Así mismo por asociación con reacciones fitopatogénicas ha sido posible asociar perfiles de SSCP con severidad (Sambade *et al.*, 2003)

La amplificación de secuencias por PCR con iniciadores específicos, también permite caracterizar aislamientos de CTV y discriminar rápidamente gran número de ellos (Ayllón *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2008).

En México se han detectado aislamientos asociados a declinamiento con el anticuerpo MCA13 (Permar *et al.*, 1990), pero los árboles infectados no desarrollan la sintomatología típica no son similares a aislamientos severos como T-36 (Silva-Vara *et al.*, 2001; Nava-Coronel *et al.*, 1999).

Debido a que no existen estudios epidemiológicos cuantitativos en la frecuencia y estructura de la población de los aislamientos del CTV en condiciones de campo en México, en este trabajo se aborda el estudio de la dispersión del CTV con la hipótesis del efecto diferencial de velocidad y estructura de focos inducida por la presencia o ausencia de *T. citricida*. Así mismo, se planteó que pueden ocurrir cambios mayores en la composición y predominancia de haplotipos del CTV en aquellas regiones con *T. citricida* determinado por medio de técnicas moleculares y de transmisibilidad por áfidos de aislamientos provenientes de Tamaulipas, Veracruz (sin presencia de *T. citricida*) y Yucatán (con presencia de *T. citricida*).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Epidemiología

Sitios de estudio

En 2001 se seleccionó una huerta en Llera, Tamaulipas (TH1), debido a la detección de un árbol positivo a CTV por personal de la campaña contra el VTC del estado. En torno a este positivo se definió un área experimental de 16 ha con 2477, en función a la edad de los árboles (40 años), copa (*C. sinensis*) y portainjerto (*C. aurantium* L.) (Figura 1B).

En el 2002 se seleccionó una segunda huerta de Mante, Tamaulipas (TH2), de 13.4 ha. con 4000 árboles de naranjo dulce (*C. sinensis* cv. Valencia) injertado en agrio (*C. aurantium* L.) de 20 años de edad. En estas dos huertas, se detectó la presencia de cuatro especies de pulgón reconocidos como vectores de CTV, pero sin la presencia de *T. citricida*.

La huerta de Yucatán (YH1) es de una hectárea con cerca de 350 árboles de *C. sinensis* cv. Valencia injertada en *C. aurantium* de 20 años de edad y otros frutales intercalados (*Cocus nucífera* y *Persea americana*), enclavada en un área citrícola de 72 has.

Cuadro 1: Sitios, fechas de muestreo y métodos serológicos empleados.

Huerta	Fechas de muestreo	Método serológico
TH1	Octubre y diciembre 2001, marzo 2002,	DASI-ELISA
	Junio 2002	Inmunoimpresión
TH2	Febrero 2003 y marzo 2004	DASI-ELISA
YH1	Mayo 2003, abril 2004 y marzo 2006	Inmunoimpresión

Colecta de muestras

Debido al carácter asintomático del CTV en las regiones estudiadas, la detección de los positivos se realizó con las dos técnicas indicadas en el cuadro 1. Para DASI-ELISA las muestras se cortaron en las horas diurnas de menor temperatura, cada muestra consistió de ocho brotes jóvenes con las hojas expandidas las cuales fueron eliminadas; los brotes fueron cortados de uno a dos metros de altura en los cuatro

puntos cardinales del dosel del árbol. A los brotes se les quitó la corteza misma que fue cortada en pedazos pequeños, envuelta en papel absorbente y deshidratada a temperatura ambiente. Porciones de 0.4 g de muestras individuales de cada cinco árboles contiguos fueron mezclados para formar muestras compuestas las cuales se conservaron a una temperatura de 18 a 21 °C hasta su análisis. En el caso de inmunopresión, las muestras consistieron de cinco hojas nuevas totalmente expandidas con pecíolo, se colectaron y procesaron como se ha descrito previamente (Ruiz-García *et al.*, 2005).

Estos análisis se realizaron empleando la infraestructura del laboratorio acreditado ante SENASICA-SAGARPA para el diagnóstico del CTV de la Unión Agrícola Regional de Citricultores de Tamaulipas. Con los datos obtenidos en los censos se elaboraron mapas de distribución espacial y se colectó tejido de árboles positivos para mantener los aislados en invernadero.

Conservación *in vivo* de muestras

Se colectaron cuatro brotes de la periferia de los árboles positivos a CTV por DAS-ELISA e inmunopresión de las huertas en estudio para su mantenimiento *in vivo* en invernadero por injerto. Plantas de *C. sinensis* injertadas en *C. aurantium*, fueron injertadas con tres yemas del tejido proveniente de los árboles positivos y confinadas en un invernadero de acceso restringido autorizado por la Dirección General de Sanidad Vegetal dentro de una jaula cubierta con malla antiáfidos con temperatura promedio de 15 a 32°C.

Caracterización molecular

Obtención de dsRNA y/o RNA

A partir de siete gramos de corteza y nervadura central de brotes y hojas jóvenes provenientes de las plantas positivas injertadas en invernadero, se aisló RNA de doble cadena (dsRNA) siguiendo el protocolo propuesto por Dodds *et al.*, (1987) o RNA total a partir de 100 mg de tejido utilizando el producto Trizol™, de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Síntesis de cDNA y PCR

La retrotranscripción y amplificación (RT-PCR) se llevó a cabo en dos pasos según el protocolo de Kong *et al.* (2000) con iniciadores específicos a las regiones que codifican para p25 y p23 (Cuadro 2). Para discriminar aislamientos (Ayllón *et al.*, 2001), las muestras se sometieron a RT-PCR en dos pasos con los iniciadores PM34, PM35 y PM33 para detectar aislamientos del tipo T-385, T-36 y T-388, respectivamente (Cuadro 2).

En la obtención de cDNA se precalentaron 5 μ L de dsRNA + 1 μ L de dNTPs 10 mM + 100 ng del iniciador de polaridad negativa a 70°C por 10 min. Se adicionaron 15 μ L de una mezcla de reacción [50 mM de Tris-HCl, pH 8.4 + 75 mM KCl, 3mM de MgCl₂ + 10 mM de DTT + 20 unidades de RNaseOUT + 200 U de Superscript II (Invitrogen)] y se sometió a 45 °C por 50 minutos y después por 15 min a 72 °C.

La PCR se realizó en 50 μ L de reacción con 2 μ L de cDNA, 50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 100 μ M de cada primer y 0.6 U de Taq pol (Invitrogen). Las muestras fueron incubadas a 94 °C por un minuto y después se sometieron a 40 ciclos de un minuto a 94 °C, un minuto a 50 ó 55 °C, un minuto a 72 °C y una extensión final por cinco minutos a 72 °C. La detección de los productos amplificados fue en geles de agarosa al 2% a 100 V por 45 minutos y teñidos con bromuro de etidio.

Análisis de SSCP

Para un análisis preeliminar de la composición de la población se llevó a cabo el análisis de la conformación polimórfica de la cadena sencilla (SSCP). Para tal fin se mezclaron 5 μ L del producto de PCR del segmento p25 con 5 μ L de la mezcla de desnaturalización (formamida 95 % + 20 mM EDTA pH 8.0 + 0.05% bromofenol azul + 0.05% de xilen cianol), los tubos se calentaron por cinco minutos a 99 °C y a continuación se colocaron en hielo. Esta mezcla se cargó en un gel de poliacrilamida (acrilamida/bis) al 8% y se realizó la electroforesis con TBE 1x (89 mM Tris-borate, pH 8.0, 2 mM EDTA) como amortiguador de corrida y voltaje constante de 300 V por 1.5 h a 4°C (Kong *et al.*, 2000). También se incluyó un marcador de peso molecular de 50 bases a 50 ng/ μ L (Gibco BRL™), al igual que producto de RT-PCR para p25 de los aislamientos T-36

(procedente de Florida) y T-385 (proporcionado por el Dr. Pedro Moreno del IVIA, España). Los aislamientos que mostraron variación en su patrón electroforético también fueron analizados para p23, en este caso la electroforesis fue en geles de acrilamida al 8% a 300 V por 5 h a 4 °C (Sambade *et al.*, 2002). La detección de bandas se realizó por tinción con plata (Beidler *et al.*, 1982) y se fotografió con luz blanca en un digitalizador UVP Epichem II™.

Clonación y secuenciación

Para corroborar los resultados de la amplificación selectiva, se obtuvo cDNA con el iniciador CN304. Con este cDNA se amplificaron fragmentos de p25, p25-p27 y las últimas 1202 bases del extremo 3' con los iniciadores VF12/VF16, VF53/VF54 y VF36/VF37, respectivamente. La clonación se realizó según lo indicado por Sambrook *et al.* (1989) con los plásmidos pUC118/35S poly 4-1 y pUC118/FMV poly 2-4 (Febres *et al.* 2003) para todas las construcciones. Todos los plásmidos recombinantes fueron clonados en *E. coli* cepa DH5. Los fragmentos fueron secuenciados y comparados con las secuencias publicadas del GenBank.

Transmisión de aislamientos

Con la finalidad de conocer la capacidad de transmisión de los aislamientos mas frecuentes se realizaron ensayos de transmisión con áfidos.

Colecta de muestras

Las muestras de *T. citricida* se colectaron de árboles de cítricos que fueron positivos a CTV en mayo 2004 y marzo 2006, después de realizar censos por inmunopresión en la huerta de Yucatán (YH1). Para capturar las partículas virales, con la punta de un microtubo se machacaron individualmente 20 áfidos en papel Whatman 3MM estéril. También se imprimieron en el mismo papel cinco cortes transversales de los brotes vegetales donde se colectaron los áfidos.

Detección de CTV en muestras impresas

La separación del RNA y la reverso-transcripción se realizó siguiendo el protocolo para inmunocaptura/RT-PCR (IC/RT-PCR) desarrollado por Cambra *et al.* (2000b), con los iniciadores CPN (cuadro 2). La mezcla inicial de reacción consistió en 50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4), 10mM DTT, 2.5 mM de MgCl₂, 100µM dNTPs y

1ng de cada iniciador. En cada tubo sensibilizado se colocaron 45 μ L de esta mezcla y se calentó a 70 °C por 5 minutos. Se dejó enfriar y se adicionaron 5 μ L de otra mezcla que contenía 10 U de inhibidor de RNAsa, 50 U de MMLV (Promega) y 1.25 U de Taq pol (Promega). Se usó el programa de 94 °C por 2 minutos y 35 ciclos a 30 s a 94°C, 1 min a 55 °C y 1 min a 74 °C y una extensión final de 5 minutos a 74°C.

El producto de esta amplificación se usó como molde para un segundo ciclo de amplificación con los iniciadores CPK (cuadro 2). Se tomaron 2 μ L del producto de RT-PCR anterior y se adicionaron 23 μ L de la mezcla de reacción (50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM de MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 1ng de cada iniciador y 0.6 U de Taq pol (Invitrogen). Se usó el programa de 94 °C por 2 minutos y 35 ciclos a 30 s a 94°C, 30 s a 50 °C y 40 s a 74 °C y una extensión final de 5 minutos a 74°C. Los controles negativos fueron impresiones de naranjo agrio obtenido de semilla y *A. gossypii* criados en *Hibiscus sp.* y los positivos impresiones de plantas inoculadas con CTV por injerto.

Detección por SSCP de variantes de secuencia en planta y su adquisición por áfidos

Para identificar las variantes de secuencia adquiridas por los áfidos, se analizó por SSCP las muestras positivas a la amplificación. Para lo cual, las muestras se procesaron como anteriormente se mencionó. La electroforesis se realizó en un minigel no desnaturizante de poliacrilamida al 12% (8x10cmx 0.75mm, BIORAD Protean II) y la tinción de las bandas se realizó con plata (Beidler *et al.*, 1989).

Transmisión por *A. gossypii*

Con los aislamientos conservados en invernadero se hicieron pruebas de transmisión siguiendo un esquema similar al de Yokomi y De Borde (2005), con *A. gossypii* como vector. Antes de la transmisión se corroboró la presencia del virus en las plantas donadoras, las cuales fueron naranjo dulce con brotes tiernos, en ellas se colocaron los pulgones colectados con un pincel, se cubrieron con tela antiáfidos y se les permitió un tiempo de adquisición de 72 horas. Después se colocaron 30 de estos pulgones en brotes jóvenes de plantas sanas de *C. aurantifolia* y *C. sinensis*, durante un periodo de acceso de 72 horas, después de los cuales los insectos fueron eliminados con Paratión metílico (1mL/L). Muestras de estos áfidos se colectaron y

conservaron en alcohol al 70% previo a la aplicación del insecticida, los cuales analizaron para detectar adquisición y presencia de variantes de secuencia. Después de la inoculación las plantas fueron mantenidas en invernadero y evaluadas por IC/RT-PCR a los 30, 60 y 120 días.

Cuadro 2: Iniciadores utilizados en RT, RT-PCR e IC/RT-PCR anidado para la caracterización de aislamientos de CTV procedentes de Tamaulipas, Veracruz y Yucatán.

Primers	Sentido	Secuencia 5' a 3'	Alineamiento [¶]	Referencia
CPN-F	+	ATGGACGACGAAACAAAG	16155	Narváez et al., 2000
CPN-R	-	TCAACGTGTGTTGAATTTCC	16826	
CPK-F	+	AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA	16554	Kong et al. 2000
CPK-R	-	TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC	16763 (T36)	
p23-F	+	ACTAACTTTAATTCGAACA	18347	Sambade et al., 2002
p23-R	-	AACTTATCCGTCACCTTC	19026 (T36)	
PM33	+	CCCGTACCCTCCGGAATCACG	16-37 (VT)	Ayllón et al., 2001
PM34	+	TGGTGTAATCCCAACCAGACGGTTG	57-82 (T385)	
PM35	+	ATCGCGCATCTGGCGCAAAC	170-189 (T36)	
RF-137	-	CCGTAGAGGGACTATCGGC	266-284	
CN304 [§]	-	atgcGGATCCATGGGGCCCTGGACCTATGTTGGCCCCCAT	19296 (T36)	
VF16 [¶]	+	TTATTATGCGGCCGCATGGACtAatAAACAAGAAATTGAAG	16155 (T36)	Febres et al., 2003.
VF12 [¶]	-	AAACTCCCTCGAGCCGATAGAAACCGGGAATCGG	16871 (T36)	
VF36 [¶]	+	TATATACTCGAGATGAGGTACATGAGTTCTTAGTCACACC	18094 (T36)	
VF37 [¶]	-	ATATATGGGCCCTGGACCTATGTTGGCCCCCAaTAGG	19296 (T36)	
VF53	+	GTCATATGAGCAGAGACGTGGC	15291	Febres, 2001. No publicado
VF54	-	TGAAACTCCACCATCCCGATA	16873	

[¶] Alineamiento en el genoma: T-385 aislamiento no severo de España; T-36 aislamiento moderadamente severo de Florida y VT aislamiento de Israel más severo que T-36.

[§] iniciador específico para el extremo terminal 3' del CTV, contiene sitios de restricción extra *BamHI*, *NcoI*, *ApaI* (itálicas) y una secuencia inicial extra (minúsculas).

[¶] Iniciadores específicos para la capa proteica del CTV y contienen sitios de restricción extra *NotI* y *XhoI* (itálicas). VF16 tiene tres mutaciones puntuales en las posiciones +7, +9 y +10 (minúsculas).

[¶] Iniciadores específicos para las últimas 1202 bases del extremo 3' con sitios de restricción extra *Xho I* y *Apa I* (itálicas). VF37 cambia una G por una A (en minúscula).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Epidemiología

La incidencia inicial (Y_0) y la incidencia de nuevos árboles infectados (Y_1) fue diferente en cada huerta. En Tamaulipas, la huerta TH1 tuvo valores de $Y_0=2.22\%$ y $Y_1=2.66\%$ con incremento mensual (r) de 0.0493% , mientras que en TH2 $Y_0=2.54\%$,

$Y_1=3.35\%$ y $r=0.0675$, la mayor aparición de nuevos árboles infectados (Y_1) observada en TH2, podría deberse a las especies de pulgones presentes y su abundancia, así como a la mayor proximidad de los árboles (8x6), ya que Y_0 fue similar entre ambos huertos al inicio del estudio. La dispersión de la enfermedad a partir de los árboles infectados en la huerta TH1, es ligeramente similar a la observada en huertas del estado de Nuevo León, con incidencia inicial de 4.34% y un incremento de 0.27% después de tres años de dispersión, siendo *A. spiraecola* el áfido más abundante y en ausencia de una estrategia de erradicación (Silva *et al.*, 2001).

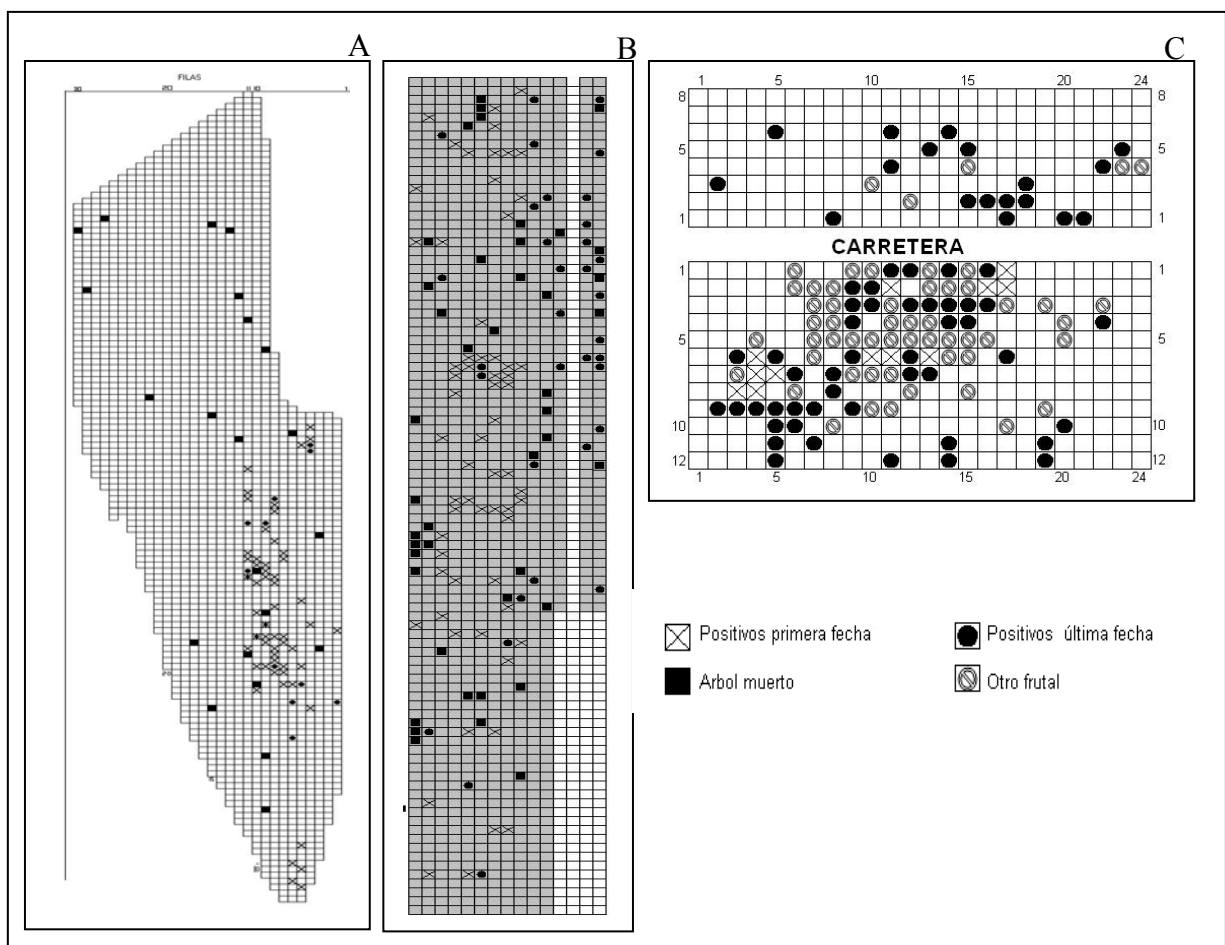


Figura 1. Cambios en la distribución y dispersión de árboles positivos al *Citrus Tristeza Virus* (CTV) en huertas de Tamaulipas (TH1 y TH2) y Yucatán (YH1). (A) TH1 (octubre 2001 a junio 2002) y B) TH2 (febrero 2003 a enero 2004); c) YH1 (mayo 2003 a marzo 2006).

En TH1 la dispersión fue preferentemente en árboles vecinos de la misma hilera o surco. La dependencia espacial continua ($P=0.01$) fue del orden 3 (24 m) en dirección de las hileras (SE-NO), de 1 (8 m) entre plantas (SO-NE) y de 2 (11.31m) en dirección diagonal. Esto sugiere la conformación de agregados (o focos) longitudinales al surco de 24 x 8m.

En la huerta TH2, la dispersión observada fue predominantemente en árboles próximos a positivos pero con orientación en la diagonal, aunque esta dirección tuvo menor dependencia espacial ($P=0.01$) del orden 1 (10 m), en contraste con la dependencia en dirección de los surcos del orden 4 (32 m) y del orden 1 (6m) en dirección perpendicular al surco. En este caso nuevamente se observó la formación de agregados longitudinales al surco de 32 x 6m. Esto presupone la dispersión predominante por áfidos que colonizan a los árboles infectados y por efecto de manejo cultural. En estudios espaciales previos se encontraron patrones aleatorios en regiones sin presencia de *T. citricida* y con predominancia de *A. gossypii* (Gottwald *et al.*, 1997). En México, la mayor predominancia en regiones del Golfo de México corresponde a *A. spiraecola*, el cual también muestra un mayor índice de movilidad superior a *T. aurantii*, vector con hábito colonizador (Cisneros, 2003). Es probable que ambas especies sean responsables de esta dispersión y que su baja eficiencia (Yokomi *et al.*, 2004) sea compensada por su alta densidad poblacional.

En la primera fecha del muestreo en Yucatán (mayo, 2003), se censó una hectárea (400 árboles), la cual fue delimitada en función de la ubicación de los positivos iniciales, combinación cultivar/portainjerto, edad de los árboles, continuidad espacial de la plantación y dirección de los vientos dominantes para los estudios espaciales. En el primer censo $Y_0= 3.43\%$. Por la presencia de positivos en orilla de parcela se decidió extender el área de estudio a un huerto aledaño separado por un camino local (Figura 1C). En mayo de 2004 la incidencia en el bloque adicional fue de $Y_0= 9$ y $Y_1= 53$ (35 nuevos positivos para el área de muestreo anterior). En el último censo de marzo del 2006 se tuvo un valor de $Y_2=21.42\%$ y $r= 0.529\%$ (Figura 1C). Este comportamiento con tasas altas de dispersión, si se consideran los individuos susceptibles a ser infectados de la población estudiada, es similar al observado en Costa Rica y República Dominicana en donde se han aportado

evidencias espaciales del incremento de la dispersión atribuida a *T. citricida* después de varios años de su ingreso (Gottwald *et al.*, 1997 y 1998). Sin embargo, en YH1 esta dispersión no puede atribuirse al ingreso del vector en forma conclusiva debido a la ausencia de datos espaciales previos en ausencia de dicho vector. Por otra parte, después de siete años del ingreso de *T. citricida* no se han detectado la aparición de árboles con síntomas de tipo severo como ocurrió en Florida (Halbert *et al.*, 2004). No se han encontrado reportes con condiciones espaciales similares YH1 en la que existen árboles no cítricos que rompen la continuidad espacial. Asimismo en esta huerta el manejo de cultivo realizado sin maquinaria, no influye en la dirección de la dispersión como ocurre lo observado por Marcus *et al.*, (1984), contrario a lo que pudiera ocurrir en las huertas de Tamaulipas.

La ausencia de *T. citricida* pudiera explicar los bajos valores de Y_1 observados en las huertas de Tamaulipas comparadas con las de Yucatán, ya que hasta la fecha no hay reportes de la presencia de este vector en Tamaulipas (SENASICA, 2007; <http://mail2.senasica.gob.mx/default.asp?id=1010>).

En números absolutos y a pesar de la erradicación, la mayor cantidad de árboles positivos se observó en TH2, lo cual evidencia la importancia del complejo de vectores distintos a *T. citricida* en la dispersión de la enfermedad, como se ha demostrado en España e Israel particularmente con *A. gossypii* (Cambra *et al.*, 2000). En Tamaulipas la aparición de nuevos positivos fue en el área del huerto con dispersión activa del virus, aunque éstos no necesariamente fueron adyacentes a los árboles positivos más antiguos. Mientras que en YH1, la presencia de *T. citricida*, (cuyo ingreso a la región ocurrió en el 2001) la mayoría de los nuevos positivos aparecieron en la vecindad inmediata a un positivo histórico sin erradicar.

Caracterización molecular del virus en la planta

Análisis SSCP

Se analizaron muestras de árboles positivos a CTV procedentes de Veracruz, Tamaulipas y Yucatán para un fragmento de p25. En TH2, los patrones electroforéticos permitieron agrupar a los aislamientos provenientes en siete haplotipos además de un aislamiento detectado y erradicado en el 2002 (Figura 3).

En el caso de TH1, las tres plantas con injerto exitoso fueron similares entre sí y diferentes de los aislamientos de TH2. Mientras que en el caso de YH1, las 10 muestras iniciales analizadas se distribuyeron en 3 patrones de haplotipos (Figura 3). Las muestras de Veracruz fueron similares entre sí, a excepción de dos muestras obtenidas por subinjerto, las cuales fueron catalogadas preliminarmente como no severas por el número de bandas observadas (Sambade *et al.*, 2002). En el caso de las muestras TH1a y TH2a (Tamaulipas), *cz1e* y *cz1c* (Veracruz), la presencia de más de tres bandas puede deberse a una mezcla de aislamientos en la misma muestra, pues la amplificación con iniciadores específicos no detectó secuencias de aislamientos severos. En diversos trabajos, la técnica de SSCP se ha usado para conocer el número de aislamientos presentes en un mismo árbol así como para caracterizar individuos establecidos en campo y tiempo después de haberlos replicado en diferentes hospedantes en invernadero (Kong *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2000; d'Urso *et al.*, 2000).

Con esta técnica, también se ha determinado que la mayoría de los aislamientos severos generalmente presentan un patrón electroforético más complejo con más de cuatro bandas a diferencia de los aislamientos no severos que tienen de dos a tres bandas (Sambade *et al.*, 2002). Con los resultados obtenidos con SSCP y amplificación específica, todos los aislamientos de Veracruz, Yucatán y Tamaulipas se consideran no severos y de escasa variabilidad, a excepción de TH1a y TH2a como se verá más adelante.

Amplificación con primers para secuencias asociadas a severidad

Ninguna de las muestras analizadas amplificó con el iniciador PM33 que amplifica secuencias de variantes tipo VT (asociadas a aislamientos muy severos). Todas las muestras, excepto TH2a, mostraron una señal de tenue a marcada con el iniciador PM34 (asociada a variantes similares a T-385). Las muestras TH1a y TH2a, con patrón electroforético diferente fueron catalogadas como severas debido a que amplificaron con el iniciador PM35, pero no tuvieron secuencias similares a T-36 (Ayllón *et al.*, 2001). En todos los análisis realizados los testigos positivos de las variantes T-385 y T-36 amplificaron con PM34 y PM35, respectivamente. No se descarta que la presencia de varias bandas en los patrones SSCP de aislamientos

procedentes directamente de campo, sea debida a más de un aislamiento en la muestra, o que una de las cadenas amplificadas pueda tener dos conformaciones estructurales estables (Rubio *et al.*, 1996; 2000).

Clonación y secuenciación

Como dato comprobatorio de los análisis de SSCP y amplificación selectiva, se secuenciaron porciones del genoma de algunos aislamientos que fueron catalogados como severos o no severos. La NTCP (capa proteica no traducible), p27-CP y el 3'END fueron clonados exitosamente en orientación antisentido en pUC118/FMV poly 2-4 y pUC118/35S poly 4-1.

Las secuencias del aislamiento TH2a, catalogado como severo, fue similar en 98% con secuencias de un aislamiento de Portugal (gb AF184114) y de Tamaulipas (gb AF342890) para la porción de NTCP. Para este mismo aislamiento, el segmento 3'END fue similar (94 %) a T30 y T385 (gb AF260651, emb Y18420). El aislamiento proveniente de Yucatán, identificado como aislamiento no severo, fue similar (99%) a los aislamientos T30 y T385 para la secuencia de las capas proteicas p25-p27.

Transmisión de aislamientos

Las muestras de *T. citricida* provenientes de YH1 y de los brotes donde se colectaron estos insectos, fueron analizadas por IC/RT-PCR/PCR anidado, seguido por SSCP de parte de p25 (CPK), con amplificación en varias de ellas (Figura 2).

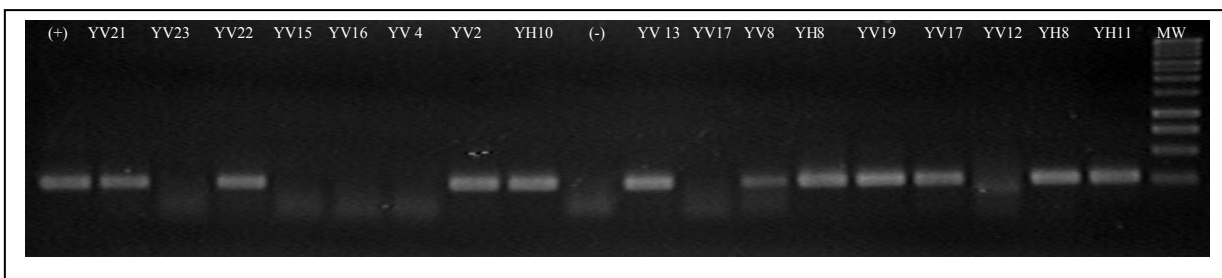


Figura 2. Detección por IC/RT-PCR/PCR anidado de CTV con iniciadores CPK, en áfidos y árboles procedentes de Yucatán colectados en 2003. YH: planta; YV: áfido del mismo brote; Testigos negativos: agua y/o N. agrario; Positivo: planta injertada con TH1a; YV23 áfidos colectados de un árbol negativo en 2004.

El análisis de las variantes de secuencia (Vs) de CTV en brotes y pulgones por SSCP, en árboles positivos detectados en 2003, indicó que la Vs más abundante en la muestra no siempre es adquirida durante el proceso de alimentación (Figura 3). El muestreo se restringió a brotes colonizados por pulgones de árboles detectados previamente como positivos, aún así se tuvieron muestras negativas tanto de pulgones y como de brotes (Pa/Pb). De un total de 22 muestras de áfidos, únicamente se encontraron 13 positivas consistentes en muestras compuestas por 3-4 áfidos. Un resultado similar fue encontrado por d'Urso *et al.* (2000), cuando analizaron muestras individuales de pulgones alimentados en la misma hoja, por la distribución heterogénea del virus en la planta, en donde el posible efecto del instar del vector se descarta pues únicamente se emplearon adultos ápteros.

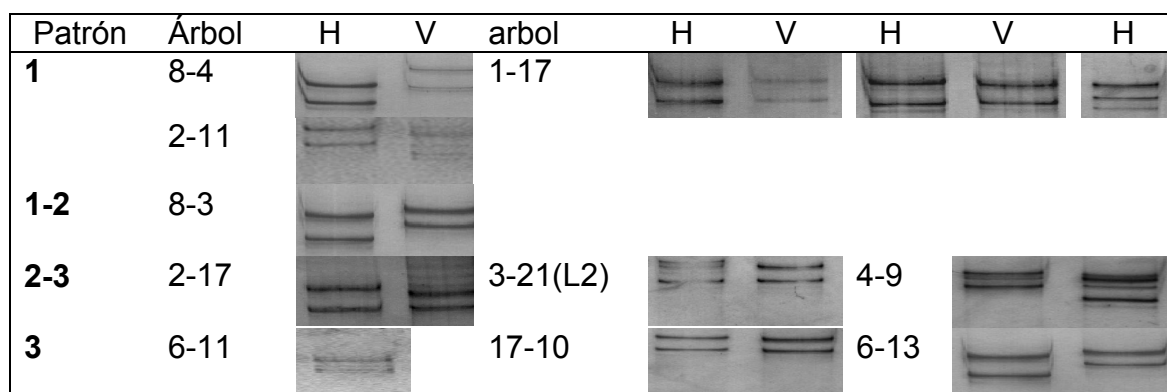


Figura 3. Adquisición de variantes de secuencia de CTV por *T. citricida* detectado por SSCP de CPK en muestras de campo de Yucatán. 3-21, 17-10, 2-11 (2004) y 4-9 (2006) son nuevos positivos. H:Árbol; V: Áfido.

El muestreo inicial se intentó repetir en los años siguientes, sin embargo, en la época de brotación principal de 2005 y 2006, las poblaciones de *T. citricida* fueron bajas, esto restringió las oportunidades de encontrar pulgones en los nuevos árboles positivos. Así en marzo de 2006, únicamente se colectaron tres muestras de pulgones y de las cuales solo una fue positiva (4-9, Figura 3), procedentes de una colonia de *T. citricida* bien establecida. Existen reportes de los cambios inducidos por *T. citricida* en la frecuencia de aislamientos CTV de una región, en donde aquellos de tipo severo como el que induce el picado de tallo, tienden a aumentar (Halbert *et al.*, 2004). En este estudio con *T. citricida* presente, esta tendencia no fue detectada, a

pesar de que los patrones de las variantes de secuencia encontradas en los áfidos no siempre correspondió con los existentes en el hospedante. Este mismo comportamiento se encontró en experimentos de transmisión con *T. citricida*, en los cuales existió la pérdida y/o aparición de aislamientos no detectados en las muestras originales (Brlansky *et al.*, 2003; Powell y Lin, 2005).

En 2003, se detectaron cuatro árboles positivos que contenían al haplotipo 3, mientras que únicamente se encontró uno con el haplotipo 1. Sin embargo, después de tres años el número de árboles con el haplotipo 1 se incrementaron en mayor proporción (16/73) que aquellos con el haplotipo 3 (11/73) y no se detectó la transmisión del haplotipo 2 ó de mezclas (Figura 4).

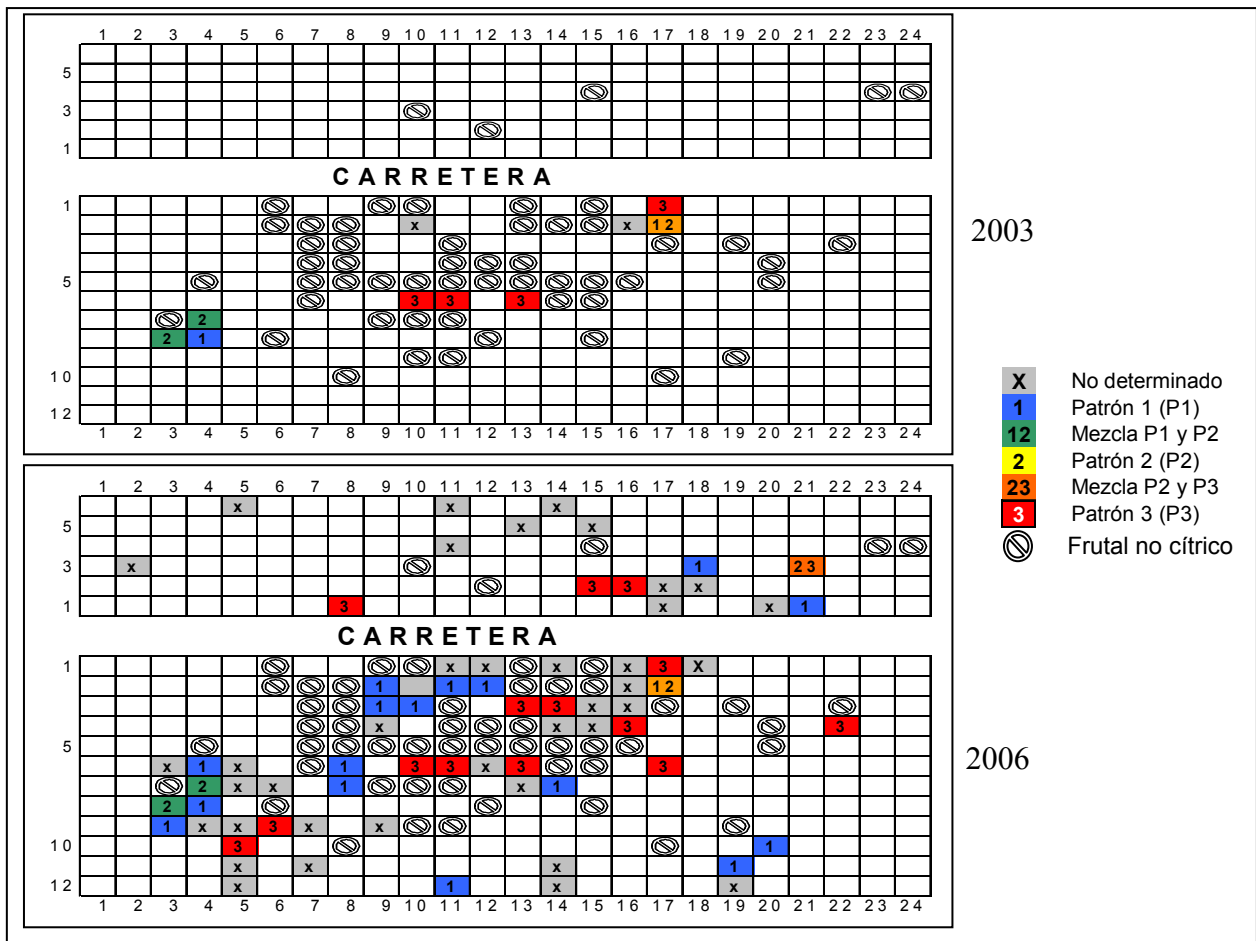


Figura 4. Dispersión de variantes de secuencia en la huerta de Yucatán (YH1), período 2003-2006 detectada por SSCP a CPK.

Similarmente Rivas-Valencia (2008), detectó que la variante de secuencia predominante en el árbol, no fue la que se detectó con mayor frecuencia en los

nuevos positivos. Este comportamiento puede explicarse por los resultados donde la variante de secuencia detectada en el vector no fue coincidente con el de la planta.

Los haplotipos de árboles positivos por infecciones secundarias, no mostraron las variantes de secuencia observados en los pulgones en fechas anteriores, por lo que es posible que estas variantes sean poco exitosas para su establecimiento en campo, o bien, debido a que las muestras vegetales inicialmente para caracterizar la población se conformaron por submuestras de todo el árbol y es posible que los aislamientos se enmascaran *in vivo* dentro de la población o *in vitro* durante la RT-PCR.

Transmisión en invernadero

En los ensayos de transmisión y/o separación de variantes de secuencia de siete aislados mediante *A. gossypii*, únicamente en 5 se detectó la adquisición del virus (Figura 5). De un total de 40 plantas sometidas a un proceso de transmisión, únicamente se detectaron por RT-PCR 3 plantas positivas de limón mexicano.

Los haplotipos transmitidos fueron del tipo 3 de Yucatán (YH1c) y el 5 de Tamaulipas (TH2e). De manera similar a lo observado en la transmisión en campo, las variantes de secuencias adquiridas por *A. gossypii*, no siempre correspondieron con las presentes en las plantas donadoras, pero sí con las encontradas en las plantas receptoras positivas lo cual demuestra la transmisión exitosa. En este caso se observó que YH1c, uno de los haplotipos transmitidos en YH1, también fue transmitido en invernadero (2 positivas/10 receptoras).

Con estos datos se evidencia que la transmisión por áfidos realizada en nuestras condiciones no fue eficiente, aún cuando las muestras ensayadas provinieron de áreas con dispersión activa. Las muestras de TH1 (TH1a) y TH2 (TH2d), catalogadas como severa y no severa respectivamente, no fueron transmitidas en ningún caso, aún en fechas y con especies receptoras diferentes (*C. sinensis* y *C. aurantifolia*).

Las muestras de Yucatán con secuencia similar en 99% a T-30, presentaron baja eficiencia de transmisión, dado que Yokomi y DeBorde (2005) obtuvieron tasas de transmisión de 0 a 62% con media de 17.2%, con el mismo tipo de aislamiento y especie de pulgón.

Estado	Patrón	PD	Áfido	Áfido	Áfido	PR	PR
Yucatán	YH1a						
	YH1a-b (mezcla)						
	YH1b-c						
	YH1c						
Tamaulipas	TH2d						
	TH2e						
	TH1a						

Figura 5. Adquisición y transmisión de variantes de secuencia de CTV por *Aphis gossypii* en condiciones de invernadero detectada por SSCP a CPK. PD: planta donadora; PR: planta receptora.

Por otra parte, el haplotipo 3 en condiciones de campo se encontró 7% menos que el haplotipo dominante tipo 1, el cual no fue transmitido por *A. gossypii*. La posibilidad de la transmisión específica de los haplotipos 3 y 1 por *A. gossypii* y *T. citricida* que sugiere este estudio, requiere una población más grande y de pruebas simultáneas en ambos vectores, que por restricciones cuarentenarias no fueron posibles. En los árboles positivos de Veracruz, Tamaulipas y Yucatán, hasta la fecha no se han observado los síntomas típicos de este tipo de aislamientos moderadamente severos reportados por otros autores (Halbert *et al.*, 2004). Lo anterior puede deberse a que existe algún tipo de interferencia o protección cruzada en las mezclas de variantes existentes, entre otras cosas o bien, al efecto del hospedante, ya por ejemplo se sabe *C. paradisi* no es un buen hospedante para CTV y no permite la elevada replicación de algunos aislamientos como *C. aurantifolia* (Dodds *et al.*, 1987). Esto tiene implicaciones epidemiológicas importantes puesto que los aislamientos severos pueden ser dispersados de manera diferencial y ser transmitidos más eficientemente por *T. citricida* como se ha estipulado (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Broadbent *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1990). De confirmarse, la tendencia a una alta velocidad de aparición de nuevos árboles infectados observados

en Yucatán, vinculados a la presencia de *T. citricida*, pone en riesgo las huertas de Tamaulipas donde se encontraron aislamientos severos.

3.4. CONCLUSIONES

Los aislamientos de CTV detectados en los estados de Tamaulipas, Veracruz y Yucatán, son mayoritariamente no severos y de escasa variabilidad. Con excepción de dos muestras de Tamaulipas identificadas como severas.

T. citricida ha provocado aparentemente un aumento en la aparición y velocidad de dispersión del virus en la huerta de Yucatán comparado con las de Tamaulipas. Sin embargo, requiere de estudios temporales adicionales.

En Yucatán *T. citricida* es el principal responsable de la dispersión y aparición de nuevos árboles positivos, pero sin provocar un aumento en la frecuencia de aislamientos severos. Sin embargo, se aportan evidencias de cambios en la estructura de variantes de secuencia debidos al sistema vector, aunque éstas no son conclusivas.

En las huertas estudiadas, la dispersión y la aparición de nuevos árboles positivos siempre fueron en la cercanía de un positivo detectado en el muestreo anterior.

Variantes de secuencia presentes en la planta donadora no siempre son detectadas en el áfido alimentado sobre ellas, pero pueden aparecer en las plantas receptoras inoculadas. Ciertos haplotipos poseen una baja capacidad de transmisión con el biotipo de *A. gossypii* empleado.

3.5. LITERATURA CITADA

- Ayllón, M. A., C. López, J. Navas-Castillo, S. M. Garnsey, J. Guerri, R. Flores, and P. Moreno. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of the citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of the three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology* 146:27-40.
- 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 virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27:291-316.
- Beidler, J. L., P. R. Hilliard, and R. L. Rill. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acid with silver. *Analytical Biochemistry* 126:374-380.
- Brlansky, R. H., V. D. Damsteegt, D. S. Howd, and A. Roy. 2003. Molecular analyses of *Citrus tristeza virus* subisolates separated by aphid transmission. *Plant Disease* 87:397-401.
- Broadbent, P., R. H. Brlansky, and J. Indsto. 1996. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80:329-333.
- Cambra, M., M. R. Gorris, C. Marroquín, M. P. Román, A. Olmos, M. C. Martínez, A. Hermoso de Mendoza, A. López, and L. Navarro. 2000a. Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the valencian community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.
- Cambra, M., A. Olmos, M. T. Gorris, C. Marroquin, O. Esteban, S. M. Garnsey, R. Llauguer, L. Batista, L. Peña, and A. Hermoso de Mendoza. 2000b. Detection of citrus tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plant tissues and single aphids. *In: Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* J. K. da Graça, R. Lee, and R. Yokomi, (eds.). Riverside, California. pp: 42-49.
- Cisneros-Hernández, J. 2003. Diversidad y fluctuación de áfidos sobre brotes de cítricos en el municipio de Cuitlahuac, Veracruz. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo. 92 p.
- Costa A. S., and T. J. Grant. 1951. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. *Phytopathology* 41:105-113.
- d'Urso, F., M. A. Rubio, L. Ayllón, A. Sambade, A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri, 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.

- Febres, V. J., C. L. Niblett, R. F. Lee, and G. A. Moore. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cells Reports* 21:241-428.
- Fishman, S., R. Marcus, H. Talpaz, M. Bar-Joseph, Y. Oren, R. Salomon, and M. Zohar. 1983. Epidemiological and economic models for spread and control of citrus tristeza virus disease. *Phytoparasitica* 11: 39-49.
- García-Arenal, F., A. Fraile, and M. J. Malpica. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39:157-186.
- Gottwald, R.T., M. Cambra, P. Moreno, E. Camarasa, and J. Piquer. 1996. Spatial and temporal analysis of citrus tristeza virus in eastern Spain. *Phytopathology* 86:45-55.
- Gottwald, T. R., S. M. Garnsey, M. Cambra, P. Moreno, M. Irey, and J. Borbon. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits* 52:397-404.
- Gottwald, T.R., S. M. Garnsey, and J. Borbón. 1998. Increase and pattern of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphids, *Toxoptera citricidus*. *Phytopathology* 88:621-636.
- Grant, T. J., and A. S. Costa. 1950. A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology* 41: 117-122.
- Grant, T. J., and R. P. Higgins. 1956. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* 47:272-276.
- Grant, T. J., and R. P. Higgins. 1956. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* 47:272-276.
- Halbert, S. E., H. Genc, B. Cevik, L. G. Brown, I. M. Rosales, K. L. Manjunath, M. Pomerinke, D. A. Davison, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 2004. Distribution and characterization of *Citrus tristeza virus* in south Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 88:935-941.
- Hermoso de Mendoza, A., J. F. Ballester-Olmos, and J. A. Pina. 1984. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. *In: Proc. 9th*

- Conf. Int. Org. Citrus Virol. L. W. Timmer, and J. A. Dodds (eds.) Riverside, California. pp: 23-27
- 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.
- López, C., M. A. Ayllón, J. Navas-Castillo, J. Guerri, P. Moreno, and R. Flores. 1998. Molecular variability of the 5'- and 3'- terminal regions of the citrus tristeza virus RNA. *Phytopathology* 88: 685-691.
- Marcus, R., S. Fishman, H. Talpaz, R. Salomon, and M. Bar-Joseph. 1984. On the spatial distribution of citrus tristeza virus disease. *Phytoparasitica* 12:45-52.
- Moreno, P., and J. Guerri. 1997. Variability of citrus tristeza closterovirus (CTV): methods for differentiating isolates. pp 97-108. *In: Filamentous viruses of woody plants*. P. L. Monette Trivanderum, India.
- Moreno, P., J. Guerri, J. F. Ballester-Olmos, R. Albiach, and M. E. Martínez, 1993. Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42:35-41.
- Moreno, P., J. Guerri, and N. Muñoz. 1990. Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology* 80:477-482.
- Narváez, G., B. S. Skander, M. A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerri, and P. Moreno. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* 85:83-92.
- Nava-Coronel, M., S. Silva-Vara, A. Morales-Loredo, V. J. Febres, C. L. Niblett, R. F. Lee, and M. A. Rocha-Peña. 1999. Caracterización serológica y molecular de algunos aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos de Nuevo León, México. Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, México. Resumen No. 284.
- Permar, T. A., S. M. Garnsey, D. J. Gumpf, and R. F. Lee. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:224-228.

- Powell, C. A., and Y. Lin. 2005. Separation of citrus tristeza virus isolates in mixed infections through transfer by single brown citrus aphids. *Hortscience* 40:694-696.
- Powell, C. A., R. R. Pelosi, and M. Cohen. 1992. Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus. *Plant Disease* 76:141-144.
- Racchah, H.B., G. Loebenstein, and S. Singer. 1980. Aphid transmissibility variants of citrus tristeza virus in infected citrus trees. *Phytopathology* 70:89-93.
- Randles, J. W. 1986. Strain identification for monitoring virus distribution and spread with special reference to molecular hybridization analysis. In: *Plant virus epidemics: monitoring, modeling and predicting outbreaks*. Academic Press. Australia. 550p.
- Rocha-Peña, M. A., R. F. Lee, R. Lastra, C. L. Niblett, F. M. Ochoa-Corona, S. M. Garnsey, and R. K. Yokomi. 1995. Citrus tristeza virus and its vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79: 437-445.
- 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. *In: Proc. 14th Conf. Int. Org. of Citrus Virol.* Yokomi, R. K., J. V. da Graça and R.F. Lee (eds.). Riverside, California. pp:12-17
- Rubio, L., M. A. Ayllón, J. Guerri, H. Pappu, C. Niblett, and P. Moreno. 1996. Differentiation of citrus tristeza virus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology* 129:479-489.
- Ruiz-García, N., G. Mora-Aguilera, P. Rivas-Valencia, D. Ochoa-Martínez, C. Góngora-Canul, E. Loeza-Kuk, A. Gutiérrez-Espinosa, G. Ramírez-Valverde, and R. Álvarez-Ramos. 2005. Probability model of CTV detection on the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. *In: Proc. 16th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Hilf, M. E., N. Duran-Vila and M. A. Rocha-Peña. pp.193-203.

- Sambade, A. L. Rubio, S. M. Garnsey, N. Costa, G. W. Müller, M. Peyrou, 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* 51:257-263.
- Sambade, A., C. López, L. Rubio, R. Flores, J. Guerri, and P. Moreno. 2003. Polymorphism of a specific region in the gene p23 of Citrus tristeza virus allows differentiation between mild and severe isolates. *Archives of Virology* 148:2281-2291.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and T. Maniatis. 1991. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Silva-Vara, S., M. A. Peña del Río, R. Peña-Martínez, N. Villegas-Jiménez, K. F. Byerly-Murphy, y M. A. 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.
- Rivas Valencia, P. 2008. Estructura poblacional de Citrus Tristeza Virus (CTV) en México y Brasil. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo. 131 p.
- Yokomi, R. K., and R. L. DeBorde. 2005. Incidence, transmissibility, and genotype analysis of Citrus tristeza virus (CTV) isolates from CTV eradicated and noneradicated districts in central California. *Plant Disease* 89:859-866.
- Yokomi, R. K., R. Lastra, M. R. Stoetzel, V. D. Damsteegt, R. F. Lee, S. M. Garnsey, T. R. Gottwald, M. A. Rocha-Peña, and C. L. Niblett. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera:Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *Journal of Economic Entomology* 87:1078-1085.

IV. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN POMELO Y LIMÓN MEXICANO TRANSFORMADOS CON EL GEN p25 DEL CTV

Emiliano Loeza-Kuk¹, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa¹, Ángel Villegas-Monter², Gustavo Mora-Aguilera¹, Elvia Carmelita Palacios Torres¹, Eugenio Perez-Molphe-Balch³.

RESUMEN

Plantas de *Citrus paradisi* y *C. aurantifolia* transformadas vía *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* con el gen p25 del *Citrus tristeza virus* (CTV), fueron multiplicadas en *C. aurantium* y *C. volkameriana* e inoculadas por injerto y transmisión con *A. gossypii* con aislamientos mexicanos de CTV para determinar su resistencia. El comportamiento de estas plantas evaluadas por RT-PCR y PCR en tiempo real con SYBR-green para el gen p18, indicó que las plantas transgénicas de *C. paradisi* tuvieron menor concentración del virus comparadas con las no transformadas, mientras que *C. aurantifolia* permitió una replicación similar a las plantas no transformadas. Comportamiento similar fue observado en condiciones *in vitro* con los mismos materiales. La inoculación por *A. gossypii* no fue eficiente por la baja transmisibilidad de los aislamientos empleados. Entre los factores a evaluar se consideró al portainjerto para lo cual cada lote se injertó en *C. aurantium* y *C. volkameriana*, sin embargo, en este caso, no fue posible encontrar diferencias debidas por este factor.

ABSTRACT

Grapefruit and mexican lime plants were transformed with p25 CTV gen using *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* as transforming vector. These regenerated plants were grafted onto *C. aurantium* y *C. volkameriana* rootstocks, after one season growing were graft and aphid inoculated with mexican isolates of CTV in

¹ Programa de Fitopatología y ²Fruticultura Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México, C.P. 56230(loeza01@colpos.mx, ldaniel@colpos.mx). ³Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, C.P. 20100 Ags., Ags. México.

order to determine their resistance. Evaluation was done through Real Time PCR for p18 gen using SYBRgreen as intercalating dye. Results suggest that transgenic grapefruit lines have minor concentration of viral RNA strands than their wild ones. However, transgenic Mexican limes viral concentration was slightly similar to wild plants. This behaviour of plants in greenhouse was similar with *in vitro* conditions. Inoculation by *A. gossypii* was not efficient since isolates transmissibility was low. Among tested factors, rootstocks were initially considered, but no effect was detected by this factor.

4.1. INTRODUCCIÓN

El virus causante de la tristeza de los cítricos es un patógeno relevante en todas las zonas cítricas del mundo (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Además de los daños directos que ha provocado, la enfermedad obligó al cambio de porta-injertos con menor plasticidad y adaptabilidad ambiental. Este reemplazo originó una búsqueda continua de fuentes de resistencia como la encontrada en *Fortunella crassifolia* y *Poncirus trifoliata* (L. Raf.) (Gmitter *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1998). Por poseer una biología reproductiva compleja y periodos juveniles prolongados, los programas de mejoramiento cítrico han presentado pocos avances en este aspecto (Domínguez *et al.*, 2002b).

Alternativas de manejo como la protección cruzada, han permitido sostener la producción cítrica comercial en algunas regiones después del establecimiento endémico de la enfermedad. Sin embargo, existen casos donde esta protección ha sido rebasada por lo que su uso es temporal (Costa y Müller, 1980; Van Vuuren *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 1999).

Una solución a largo plazo, sería la obtención de materiales comerciales con resistencia a este virus. Por los problemas en el mejoramiento convencional, la transformación genética parece ser una alternativa atractiva, al permitir transferir un carácter deseable sin modificar la genética de la planta (Domínguez *et al.*, 2002a).

En la resistencia derivada del patógeno (PDR, por sus siglas en inglés, pathogen-derived resistance), plantas de interés comercial se transforman con una parte del genoma viral para interferir con los ciclos normales de replicación viral (Sanford y Johnston, 1985). Las plantas transformadas pueden expresar la información

genética, o bien, transcribirla para inducir el silenciamiento de genes virales (Waterhouse *et al.*, 2001).

Plantas transformadas con segmentos genómicos del CTV han sido infectadas con este virus para evaluar la resistencia obtenida, aunque los resultados no han sido promisorios. Las plantas de limón mexicano ([*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.] transformadas con el fragmento p25 de la capa proteica del CTV mostraron atraso en la aparición de síntomas o resistencia a la infección en una porción de las plantas (Domínguez *et al.*, 2002b), mientras que plantas de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) cv. Duncan transformadas con insertos del gen p25 de la capa proteica y de la helicasa, no mostraron resistencia al ser infectadas con un aislamiento severo (Febres *et al.*, 2003).

El grupo interdisciplinario de cítricos del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, ha generado plantas transgénicas con genes de CTV tales como el gen p25, doble construcción de las capas proteicas p25 y p27, el extremo 3' tanto en sentido como en antisentido, las cuales se han corroborado mediante PCR y análisis Southern como transformadas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia a la infección con el CTV en plantas transformadas genéticamente con el gen p25 (capa proteica) en dos líneas de pomelo cv. Star Ruby y una selección de limón mexicano con espinas.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material evaluado

Segmentos internodales de plántulas de pomelo cv. Star Ruby, germinadas *in vitro* en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) y etioladas por 6 a 8 semanas, se inocularon con la cepa EHA 101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria contenía el plásmido pGA482GG que posee los genes b-glucoronidasa (*gus*) y de resistencia a kanamicina (*nptII*) y gentamicina, así como la secuencia del gen p25 del CTV que codifica la capa proteica del aislamiento T-36 originario de Florida (Gutiérrez *et al.*, 1997), los brotes regenerados fueron evaluados para detectar aquellos transgénicos (Palacios-Torres *et al.* 2001)

Por otro lado, segmentos internodales de plántulas de limón mexicano germinadas *in vitro* y etioladas por tres meses fueron inoculadas con la cepa A4 tipo agropina de *Agrobacterium rizógenes* que induce la generación de raíces transformadas. Posteriormente se regeneraron brotes transformados a partir de estas raíces siguiendo el procedimiento de Pérez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo (1998). En este caso la cepa contenía plásmido binario pGA482GG-B249CP, con los genes de *npfl*, b-glucoronidasa (*gus*) y el gen p25 del aislamiento B-249 de Venezuela (Febres *et al.*, 2003).

Inoculación de plantas transgénicas

Se utilizaron dos líneas de pomelo cv. Star Ruby (CpP1 y CpP2) y una de limón mexicano (CpL) positivas a la acumulación de proteína de la capa proteica en la prueba de análisis Western y con una copia de T-DNA comprobado por análisis Southern. Se injertaron 36 plantas en *C. aurantium* y 60 en *C. volkameriana* para su multiplicación. Las líneas de pomelo seleccionadas fueron las primeras plantas regeneradas donde se detectó una inserción estable y traducible del gen p25 del aislamiento T36 del CTV. Asimismo, se estudió el comportamiento de estos transgenes en portainjertos de *C. aurantium* por su importancia histórica y aptitud agronómica y en *C. volkameriana* por ser una especie que puede utilizarse como sustituto.

Todas estas plantas fueron mantenidas en invernadero con una temperatura media de 15 a 33 °C. Cuando los brotes alcanzaron de 30 a 50 cm de longitud, se inocularon tres plantas de cada especie con un aislamiento severo (TH2a) y uno no severo de Tamaulipas (TH2d) (Loeza-Kuk *et al.*, 2004) para evaluar los tratamientos indicados en el Cuadro 1.

Inoculación por injerto

Una porción de corteza infectada de aproximadamente 0.5 cm², se cortó de la planta de *C. sinensis* infectada con cada uno de los aislamientos del CTV y se injertó por el método de parche en el portainjerto de cada planta transgénica o control por triplicado. Se colectaron porciones similares de tejido infectado para determinar la carga viral mediante PCR en tiempo real.

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar resistencia al *Citrus tristeza virus* en plantas transgénicas de dos líneas de pomelo y una de limón mexicano inoculados por injerto y áfidos.

Material	Portainjerto	Inoculación	Aislamiento Severo (S) [§]	Aislamiento No severo (NS) [§]
CpP1		Injerto (I)	CpP1/Ca-IS ^P	CpP1/Ca-INS
CpP1		Áfido (A)	CpP1/Ca-AS	CpP1/Ca-ANS
CpP2	Ca	Injerto	CpP2/Ca-IS	CpP2/Ca-INS
CpP2		Áfido	CpP2Ca-AS	CpP2/Ca-ANS
Pomelo [¶] (P)		Injerto	P/Ca-IS	P/Ca-INS
Pomelo [¶] (P)		Áfido	P/Ca-AS	P/Ca-ANS
CpP1		Injerto	CpP1/Cv-IS	CpP1/Cv-INS
CpP1		Áfido	CpP1/Cv-AS	CpP1/Cv-ANS
CpP2	Cv	Injerto	CpP2/Cv-IS	CpP2/Cv-INS
CpP2		Áfido	CpP2/Cv-AS	CpP2Cv-ANS
CpL		Injerto	CpL/Cv-IS	CpL/Cv-INS
CpL		Áfido	CpL/Cv-AS	CpL/Cv-ANS
Pomelo [¶]		Injerto	P/Cv-IS	P/Cv-INS
Pomelo [¶]		Áfido	P/Cv-AS	P/Cv-ANS
<i>Limón mex.</i> [¶] (L)		Injerto	L/Cv-IS	L/Cv-INS
<i>Limón mex.</i> [¶] (L)		Áfido	L/Cv-AS	L/Cv-ANS

[¶] Plantas control sin transformar.

[§] Tres plantas inoculadas por tratamiento.

^P Pomelo (CpP1 y CpP2) y limón mexicano (CpL) transgénicos, inoculados por áfidos (A) o injerto (I), portainjerto *C. aurantium* (Ca) o *C. volkameriano* (Cv), aislamientos no severo (NS) o severo (S).

Inoculación por áfidos

Grupos de 30 adultos ápteros de *Aphis gossypii*, alimentados en plantas de naranjo dulce positivas a CTV, fueron colocados en cada planta receptora con hojas tiernas y mantenidos a una temperatura aproximada de 22 a 25 °C en invernadero; de estas mismas poblaciones se conservaron réplicas en alcohol al 70% para cuantificar la carga viral mediante PCR en tiempo real. Después de 5 días los pulgones se eliminaron con la aplicación de paratión metílico (2mLL⁻¹).

Ensayo de inoculación *in vitro*

Para conocer el comportamiento probable de los transgénicos a la inoculación, se diseñó un ensayo *in vitro* con el mismo material vegetal usado en invernadero (CpP1, CpP2, CpL, P y L). En este caso, se utilizaron secciones de tallo

desinfestados sin hojas y con una yema, de los cuales se establecieron 12 explantes *in vitro* de cada material, en 50 mL de medio Mursahige-Skoog (1962) semi-sólido en cajas magenta. Una vez que brotaron se inocularon por injerto con una sección de tallo del material infectado con CTV. Se les incubó en una cámara de ambiente controlado con una temperatura de 23 a 25 °C y fotoperíodo de 16 horas luz. La evaluación de la transmisión fue a los 21 días después del injerto (DDI) con RT-PCR para p18 usando RNA extraído de cada brote con el injerto vivo. A los explantes positivos se les retiró el segmento injertado y se evaluaron a los 60 DDI con RT-PCR y PCR en tiempo real.

Detección del CTV en plantas inoculadas

Después de 75 días de la inoculación (DDI), las plantas fueron evaluadas para detectar al virus mediante inmunocaptura-reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa (IC-RT-PCR) con los iniciadores p18f (5'-TTCTATCGGGATGGTGGAGT-3') y p18r (5'-GACGAGATTATTACAACGG-3') que flanquean al gen p18 del genoma del CTV (Sambade *et al.*, 2002). La evaluación se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Febres (2001) con las siguientes modificaciones: en tubos para PCR de 200 µL se colocaron 60 µL de anticuerpo policlonal producido por AGDIA a una dilución de 1:200 en buffer de cobertura (0.02 M Na₂CO₃, 0.03 M NaHCO₃, pH 9.6) y se incubaron toda la noche a 4 °C, posteriormente se lavaron tres veces con PBST (10 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl, 2.68 mM KCl, pH 7.4, 0.04% Tween 20) y un lavado final con agua destilada estéril. Posteriormente, en cada tubo se colocaron 50 µL de un extracto obtenido del macerado de 100 mg del tejido a analizar en 2 mL de PBST más 1% de PVP-40 y se incubó toda la noche a 4 °C. Una vez lavados como en el paso anterior, se agregaron 45 µL de una mezcla de disrupción (50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 10mM DTT, 2.5 mM MgCl₂, 100µM dNTPs y 1 ng de cada primer) y se incubaron en el termociclador Touchgene Gradient (Techne Princeton NJ, USA) a 70 °C por 5 minutos. Después se enfriaron y se agregaron 5µL de la mezcla de reacción RNaseout 10U (Invitrogen), 50U de MMLV-RT y 1.25U de Taq DNA polimerasa (Promega). La RT-PCR se realizó con el siguiente perfil: una hora a 42 °C, 35 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 55°C y 40s a 74°C seguidos de 5 minutos a 74°C. Los

productos de la reacción de 424pb fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio en un fotodocumentador (UVP Epichem II).

Análisis de resistencia

Una vez que se detectaron plantas positivas a la transmisión de CTV, se realizó la extracción de RNA total en 100mg de brotes tiernos colectados en dos sitios de la planta con Trizol reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante más un lavado adicional con etanol al 75% y resuspendido en 50 μ L de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato al 0.01%.

Se sintetizó cDNA a partir de 4 μ g de RNA cuantificado por UV-espectrofotometría (Nano Drop-1000 Spectrophotometer). El RNA cuantificado se estandarizó a 11 μ L y se calentó a 70 °C por 10 minutos junto con 10 mM de dNTPs y 500 ng de hexámeros aleatorios. Los tubos se colocaron en hielo y a cada uno se le adicionaron 7 μ L de la mezcla de reacción para tener un volumen total de 20 μ L que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3mM MgCl₂ y 10 mM de DTT. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente por 50 minutos a 42 °C.

Para la cuantificación absoluta del número de copias presentes de genomas virales en las muestras, se elaboró una curva de estandarización externa con el producto de PCR del fragmento del gen p18 purificado por columnas siguiendo el protocolo del fabricante (Qiaquick PCR Purification) y cuantificado por UV-espectrofotometría (Swillens *et al.*, 2004). Las diluciones seriales se realizaron con ayuda del programa MB Advanced DNA Analysis para determinar el peso de un pmol del fragmento en 0.258232 μ g en su conformación bicatenaria (0.258232×10^{-12} g/mol), mismo que, de acuerdo con la constante de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas/mol) contenía 1.555×10^{11} moléculas. Con estos datos se aplicó la siguiente fórmula (concentración en ng de la muestra UV-espectrofotometría x pmoles/ μ g)(1/1000 ng/ μ L) (número de partículas en un pmol) para determinar el número de partículas presentes en la muestra purificada y realizar las diluciones pertinentes para obtener concentraciones de 4×10^9 a 4×10^1 fragmentos de p18.

La PCR en tiempo real fue realizada con el kit platinum SYBR green qPCR supermix UDG (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron

12.5 μ L de SYBR mix, 0.5 μ L del colorante de referencia ROX, 100 ng de cada iniciador que amplifica a p18 y 2 μ L del producto de cDNA por cada reacción en volumen de 25 μ L. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). Los tubos se sometieron por 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15s a 94°C, 30s a 55°C y 40s a 72 °C, 5 minutos a 72 °C y finalmente un proceso de calentamiento progresivo para elaborar una curva de disociación para detectar posibles dímeros y amplificaciones no específicas. Con el propósito de conocer la concentración absoluta de partículas virales de cada muestra, fue necesario incluir en cada grupo de reacción, una muestra de concentración conocida, para ajustar la eficiencia y usar los parámetros de la curva de estandarización externa. Cada reacción fue incluida por triplicado.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas evaluadas amplificaron para la capa proteica, expresaron la proteína detectada por transferencia Western y de acuerdo con los resultados de la transferencia Southern, se determinó que las líneas CpP1 y CpP2 poseían una copia del fragmento al igual que CpL (resultados no mostrados). Debido a la variación entre especies, vectores de transformación, plásmidos y el aislamiento usado para obtener el fragmento de p25, se incluyeron controles adecuados para cada caso. En el ensayo *in vitro*, sobrevivieron 23 injertos (38%). La detección de la transmisión con RT-PCR para p18 a los 21 DDI, indicó que varios explantes, sobre todo no transgénicos, fueron infectados (23%) (Figura 1). Se evaluaron en PCR en tiempo real los positivos en RT-PCR.

Para conocer la carga viral fue necesario elaborar una curva de estandarización con la cual fue posible cuantificar hasta 400 copias de p18 que hacen referencia al mismo número teórico de partículas virales (Figura 2), adicionalmente se incluyó un análisis de disociación (melting curve) por la naturaleza de la reacción. El uso de PCR en tiempo real para determinar la resistencia en las líneas transgénicas, aportó algunas herramientas útiles en la evaluación.

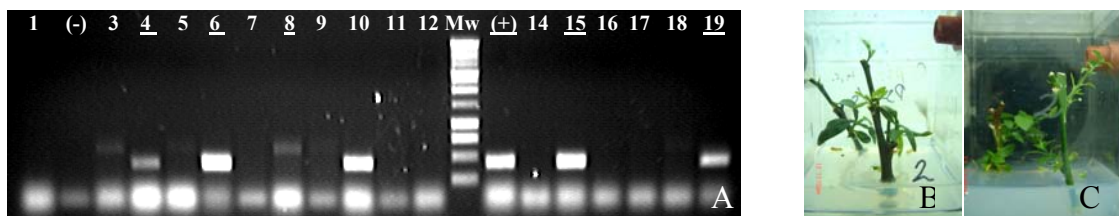


Figura 1. Evaluación *in vitro* de la replicación de CTV en materiales transformados y no transformados. A) Amplificación de p18: pomelo no transgénico (P) inoculado con aislamiento no severo (NS) (carriles 4, 9 y 15); limón transgénico inoculado con NS (1 6, 8, 10 y 18); pomelo transgénico (CpP) inoculado con NS (carriles 3 y 5); limón no transgénico con NS (19); P inoculado con aislamiento severo (S) (17); limón sin injertar (12); testigo negativo (-) y testigo positivo (+) es RNA de planta positiva a CTV, explantes evaluados con el injerto no viable (11, 14 y 16), marcador de peso molecular de 1 Kb (MW). B) Apariencia de explante sin amplificación (carril 17) y C) con amplificación (carril 19).

Por costo y facilidad se prefirió al fluorógeno intercalante SYBR green y DNA producto de PCR para elaborar la curva de estandarización. Sin embargo, la exactitud en la cuantificación siempre se vio comprometida a bajas concentraciones de la secuencia objetivo. Este comportamiento observado entre concentraciones puede deberse a pequeñas variaciones entre la alineación inicial de primers y secuencias objetivo, así como de componentes presentes en la reacción provenientes incluso de la planta (Wong y Medrano, 2005). Por lo cual, se prefirió la Ct y no el número absoluto de copias en la evaluación de resistencia, a pesar de que los dos parámetros están relacionados.

En diversos trabajos con cuantificación de acumulación o carga viral, los resultados fueron reproducibles y de alta exactitud (Picó *et al.*, 2005;). Sin embargo, se emplearon sondas Taqman (Olmos *et al.*, 2005) las cuales poseen una mayor especificidad (Bustin, 2000). Mientras que en donde se empleó SYBR-green, debido a la estrategia de replicación del virus *Cucumber vein yellow virus* (CVYV), no se generan otras especies de RNA (dRNAs, sgRNAs) como en el CTV (Hilf *et al.*, 1995; Cambra, 2005¹, Comunicación personal).

En este ensayo los brotes no transgénicos de limón mexicano (L) y pomelo (P) tuvieron mayor acumulación de cadenas virales que sus contrapartes transgénicas

¹ Investigador del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas, Valencia, España, (mcambra@ivia.es).

(CpLNS y CpP1NS, Figura 3). Como se observa en la Figura 3, el ciclo umbral donde se detectó señal de amplificación (Ct) de cada grupo, disminuyó a medida que la concentración viral aumentó conforme avanza el tiempo después de la inoculación (de la fecha uno a la fecha dos).

Algunas inconsistencias se presentaron en las muestras de CpP1 en donde la concentración no aumentó con el paso del tiempo (Figura 3). En el caso del testigo negativo (Isi), se observó reducción de Ct debida a la fluorescencia registrada por el aparato que correspondió a dímeros y no a la amplificación del segmento esperado.

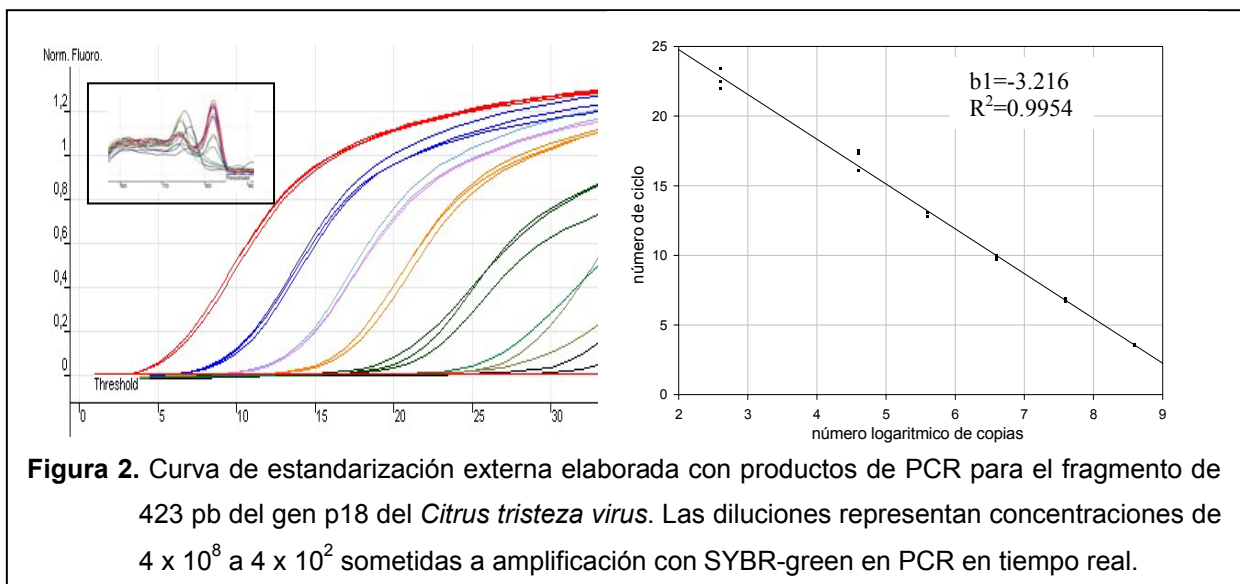


Figura 2. Curva de estandarización externa elaborada con productos de PCR para el fragmento de 423 pb del gen p18 del *Citrus tristeza virus*. Las diluciones representan concentraciones de 4×10^8 a 4×10^2 sometidas a amplificación con SYBR-green en PCR en tiempo real.

En condiciones de invernadero, la carga viral (copias cuantificadas) determinada por PCR en tiempo real del material injertado y positivo al virus en las plantas transgénicas y no transgénicas inoculadas por injerto y áfidos fue de $4,125,443 \pm 1.04 \times 10^6$ copias para tejido infectado con un aislamiento no severo y de $125,215 \pm 2.91 \times 10^3$ para tejido infectado con un aislamiento severo.

Por otro lado, la carga viral en los áfidos alimentados en plantas donadoras infectadas con el aislamiento no severo fue de 27 copias, mientras que para áfidos alimentados de plantas infectadas con el aislamiento severo fue de 64 copias, sin embargo, la curva de disociación indicó que este último resultado no es producto de amplificación. Debido a que después de 4 meses de la inoculación por injerto o áfidos no se detectaron muestras positivas, se reinocularon los materiales en las

mismas condiciones experimentales que en la primera inoculación, excepto que en la reinoculación se redujo en promedio de 5 a 10°C la temperatura máxima (30 °C) de incubación.

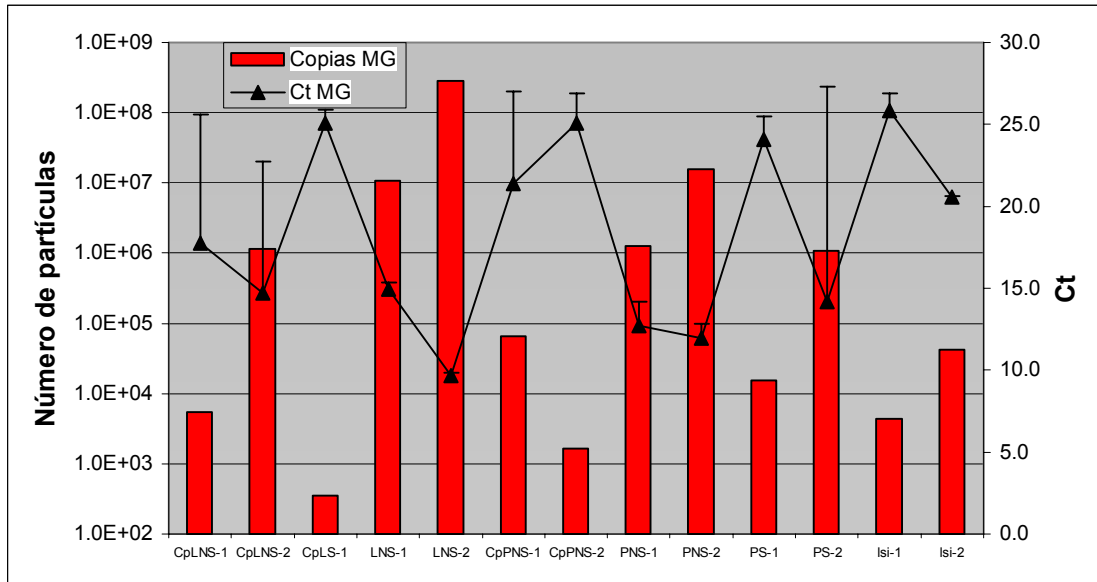


Figura 3. Número de cadenas (media geométrica, MG) virales del CTV en líneas de pomelo (CpP) y limón mexicano transgénicas (CpL) y no transgénicas (P y L respectivamente) inoculadas por injerto *in vitro* con un aislamiento no severo (NS) y severo (S), determinadas por PCR en tiempo real con SYBR-green para el gen p18 del virus a los 21 (1) y 60 días (2) después de inoculación. i.e. *CpL-1*: limón mexicano transgénico inoculado con un aislamiento no severo; Isi: explante de L sin injertar.

Con esta última modificación se tuvieron muestras positivas por RT-PCR de un solo paso a los 60 días después de la inoculación, principalmente en las plantas testigo inoculadas por injerto.

En las plantas sometidas a inoculación por injerto, las dos líneas transgénicas de pomelo presentan menor acumulación de partículas virales para ambos aislamientos inoculados que las plantas testigo no transgénicas, lo cual sugiere que las plantas transformadas afectan de manera negativa la replicación del virus sin tener claro el mecanismo de acción. Este resultado difiere de lo reportado por Febres *et al.*, (2003) en plantas de pomelo inoculadas con un aislamiento severo.

Cuadro 2. Carga viral en plantas transgénicas de pomelo y limón mexicano inoculadas con CTV y analizadas por PCR en tiempo real con SYBR-green para el gen p18 a los 60 y 90 días después de la inoculación (DDI).

TRATAMIENTO	Carga viral estimada			
	60 DDI		90 DDI	
	Ct (MG) [¶]	Copias	Ct (MG)	Copias
CpP1/Ca-INS [§]	24.4 ± 0.2	7217 ± 5272	24.4 ± 1.1	3364 ± 2.4 x10 ³
CpP1/Cv-INS	23.3 ± 1.1	16001 ± 15.7	24.1 ± 0.5	4296 ± 1.2 x10 ³
CpP2/Ca-INS	NC ^p	NC	24.2 ± 1.1	692 ± 4.292 x10 ³
CpP2/Cv-INS	18.0 ± 0.1	727089 ± 12.6	24.2 ± 1.5	3383 ± 3.6 x10 ³
P/Ca-INS	13.9 ± 0.4	193298 ± 28334	12.6 ± 0.1	16131657 ± 1423.0 x10 ³
CpL/Cv-INS	14.9 ± 7.7	33374 ± 7416049	9.1 ± 0.8	230869522±78778 x10 ³
L/Cv-INS	24.1 ± 0.4	134 ± 16.7	6.6 ± 0.1	1236671889 ± 130035 x10 ³
CpP1/Ca-IS ³	NC	NC	21.6 ± 2.7	3595 ± 43.4 x10 ³
CpP1/Cv-IS	23.6 ± 0.4	1533 ± 6026	21.3 ± 1.8	40703 ± 90.4 x10 ³
CpP2/Ca-IS	23.6 ± 0.9	13418 ± 5409	24.9 ± 0.6	912 ± 1.2 x10 ³
CpP2/Cv-IS	20.7 ± 0.6	104588 ± 26741	22.9 ± 3.1	6817 ± 40.5 x10 ³
P/Ca-IS	19.3 ± 0.0	1153 ± 17.7	24.8 ± 0.8	3410 ± 2.8 x10 ³
P/Cv-IS	NC	NC	25.4 ± 0.9	1710 ± 1.3 x10 ³
CpL/Cv-AS	16.3 ± 8.3	40948 ± 4431650	10.8 ± 5.9	9461614 ± 242393.3 x10 ³
L/Cv-IS	21.9 ± 0.1	40251 ± 720	8 ± 0.1	1388256± 162213.5 x10 ³
CpP1/Cv-ANS	NC	NC	25.0 ± 0.6	698 ± 1.1 x10 ³
CpP2Cv-ANS	NC	NC	24.6 ± 0.1	1006 ± 1 x10 ³
P/Ca-ANS	23.3 ± 0.4	14633 ± 2676	25.4 ± 2.0	2189 ± 1.7 x10 ³
P/Cv-ANS	NC	NC	25.5 ± 1.5	3024 ± 20.5 x10 ³
CpP1/Cv-AS	23.5 ± 1.0	13682 ± 17375	25.2 ± 0.6	2042 ± 0.9 x10 ³
CpP2/Cv-AS	24.4 ± 0.4	5459 ± 3.40 X 10 ³	24.3 ± 0.7	2401 ± 2. 2 x10 ³
P/Ca-AS	NC	NC	24.5 ± 0.7	2797 ± 1.6 x10 ³
P/Cv-AS	NC	NC	25.0 ± 0.5	1540 ± 0.6 x10 ³

[¶] Ct(MG): Media geométrica del ciclo umbral de detección.

[§] Pomelo (CpP1 y CpP2) y limón mexicano (CpL) transgénicos, P y L material no transformado, inoculados por áfidos (A) o injerto (I), portainjerto *C. aurantium* (Ca) o *C. volkameriano* (Cv), aislamientos no severo (NS) o severo (S).

^p NC= no cuantificados por resultar negativos en RT-PCR de punto final.

Según los valores de Ct en PCR en tiempo real del cuadro 2, con 90 días incubación se determinó que independientemente del portainjerto, los pomelos CpP1

tuvieron menor concentración de partículas virales cuando se inocularon con el aislamiento no severo. Un comportamiento similar tuvieron las plantas de la línea CpP2. Por su parte, las plantas de limón mexicano CpL, aun cuando presentaron menor concentración de partículas virales que las plantas control no transgénicas de la misma especie inoculadas tanto con el aislamiento severo como no severo, la diferencia entre ambas no fue tan marcada como la observada entre los pomelos.

A nivel de aislamientos, es importante resaltar que el no severo tuvo una acumulación mayor en las plantas inoculadas de CpL y no transgénicas, con respecto al aislamiento severo, aún cuando la secuencia inserta en la planta y la usada como inóculo no son de secuencias similares (Tennant *et al.*, 2001), mientras que entre CpP1 y CpP2, no se detectó diferencia.

El porcentaje de plantas infectadas mediante inoculación por áfidos no fue tan alto como el registrado con la inoculación por injerto en las dos fechas evaluadas. Estos resultados son opuestos a los reportados por Domínguez *et al.*, (2002b), quienes fueron capaces de realizar la inoculación eficiente empleando un número mayor de individuos de *A. gossypii*. Asimismo, se observó que las plantas testigo resultaron negativas durante el desarrollo del experimento de acuerdo con los resultados de RT-PCR de punto final (Cuadro 2).

Este resultado sugiere una baja transmisibilidad de los aislamientos por *A. gossypii* evidenciado por la baja concentración viral encontrada en los áfidos con PCR en tiempo real. Especialmente al considerar que la colonia usada se alimentó por un periodo mínimo de ocho días en las plantas infectadas, y el periodo de alimentación en las plantas receptoras fue de cinco días en donde se corroboró la alimentación. A pesar de su complejidad, este método de inoculación se prefiere al injerto pues al ser modo natural de infección, puede prevenir el rompimiento de la resistencia por cargas excesivas de inóculo así como evitar inocular otros patógenos transmisibles por injerto (Febres *et al.*, 2003).

Ravelonandro *et al.*, (2000) mencionaron que existían pocos reportes de la evaluación de PDR en transgénicos de frutales leñosos. Esta situación es similar en el caso de cítricos. Hasta la fecha la evaluación de PDR en cítricos contra el *Citrus tristeza virus* se restringe a plantas transformadas de pomelo con p25 de varios

aislamientos, limón mexicano con p25 (Domínguez *et al.*, 2002b), pomelo con p25 y la replicasa viral (RNA polimerasa-RNA dependiente, RdRp) (Febres *et al.*, 2003) y limón mexicano con p23 (Fagoaga *et al.*, 2006). Otro reporte de PDR en cítricos contra un virus diferente a CTV, es *Poncirus trifoliata* transformado con el gen que codifica para la capa proteica de *Citrus mosaic virus* (CiMV) (Iwamani *et al.*, 2004, Batuman *et al.*, 2006).

Es posible que las plantas transgénicas con siete años de transformación incrementen la expresión del transgen de la capa proteica al ser inoculadas, mecanismo que no involucra el silenciamiento de RNA o silenciamiento post-transcripcional (Al-Kaff *et al.*, 1998). Asimismo, se sabe que tejido de plantas transformadas y sometidas al ensayo GUS antes de su inoculación, resultan positivas y no muestran silenciamiento de este gen después de seis años de su inserción (Domínguez *et al.*, 2002b). Aunque las pruebas ofrecen resultados confiables, es necesario realizar análisis más robustos como transferencia tipo Northern antes y después de la inoculación para corroborarlos (Fagoaga *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos con las plantas de limón mexicano, requerirán confirmaciones futuras después de haber reevaluado la transgenia en los brotes sometidos. Sin embargo, en esta evaluación inicial de los materiales generados, el comportamiento de los pomelos a la inoculación, aporta elementos que permitirán continuar con el estudio del resto de transgénicos con miras a extrapolar su evaluación en condiciones de campo.

4.4. CONCLUSIONES

Las plantas de pomelo con una inserción estable del gen de la capa proteica mayor de CTV que su contraparte sin transformar, tuvieron menor concentración del *Citrus Tristeza Virus*.

La inoculación del aislamiento tipo severo empleado en este trabajo fue menos exitosa que el aislamiento tipo no severo.

La inoculación mediada por *A. gossypii* no fue eficiente por una carga viral menor con respecto al tejido injertado.

No se detectó efecto por el portainjerto usado para la multiplicación de los materiales en la concentración viral.

La carga viral presente en los áfidos fue muy baja que no permite la cuantificación confiable por PCR en tiempo real con SYBR green.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Xoconostle, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, México D. F., por las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo.

Al M. C. Ivan Córdoba del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán., por la capacitación en el uso del PCR en Tiempo Real

Al Dr. Vicente Febres, Universidad de Florida, Gainesville, Florida, U. S. A., por la orientación en el desarrollo y escritura del presente trabajo.

Al Vivero Cazones, Veracruz, Certificado bajo la NOM-079-FITO-2002., por la donación de los portainjertos.

4.5. LITERATURA CITADA

Al-Kaff S. N., N. S. Covey, M. M. Kreike, M. A. Page, R. Pinder, and J. P. Dale. 1998.

Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279: 2113-2115.

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

Batuman, O., M. Mawassi, and M. Bar-Joseph. 2006. Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to Citrus tristeza virus sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* 33:319-327.

Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169–193

Costa, A. S., and G. W. Müller. 1980. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Disease* 64:538–541.

- Domínguez, A., C. Fagoaga, L. Navarro, P. Moreno, and L. Peña. 2002a. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Molecular Genetic and Genomics* 267: 544-556.
- Domínguez, A., A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri, M. Cambra, L. Navarro, P. Moreno, and L. Peña. 2002b. Pathogen-derived resistance to citrus tristeza virus (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.)Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 1:1-10.
- Fagoaga, C., C. López, A. Hermoso de Mendoza, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores, and L. Peña. 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology* 60:153-165.
- Fang, D. Q., C. T. Federici, and M. L. Roose. 1998. A high-resolution linkage map of the Citrus Tristeza Virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* 150:883-890.
- Febres, V. J., C. L. Niblett, R. F. Lee, and G. A. Moore. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Reports* 21:421-428.
- Gmitter, F., S. Y. Xiao, S. Huang, X. L. Hu, S. M. Garnsey, and Z. Deng. 1996. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance region. *Theoretical Applied Genetics* 92:688-695.
- Gutiérrez-E, M. A., D. Luth, and G. A. Moore. 1997. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 16: 745–753.
- Hilf, M. E., A. V. Karasev, H. R. Pappu, D. J. Gumpf, C. L. Niblett, and S. M. Garnsey. 1995. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208:576–582
- Iwanami, T., T. Shimizu, T. Ito, and T. Hirabayashi. 2004. Tolerance to citrus mosaic virus in transgenic trifoliolate orange lines harboring capsid polyprotein gene. *Plant Disease* 88:865-868.

- Loeza-Kuk, E., E. C. Palacios-Torres, D. L. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, M. A. Gutierrez-Espinoza, V. J. Febres, G. A. Moore, and R. Alvarez-Ramos. 2005. Molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from Veracruz and Tamaulipas States, Mexico. *In: Proc. 16th Int. Org. Citrus Virol.* Hilf, M. E., N. Durán-Vila, and M. A. Rocha-Peña. pp. 407-411.
- Luth, D., and G. A. Moore. 1999. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 57: 219-222.
- Müller, G. W., M. L. P. N. Targón, e M. A. Machado. 1999. Trinta anos do uso do clone pré-imunizado 'Pera IAC' na citricultura paulista. *Laranja* 20: 385-398.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Olmos, A., E. Bertolini, M. Gil, and M. Cambra. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods* 128:154-155.
- Palacios Torres, E. C., M. A. Gutiérrez Espinosa, and G. A. Moore. 2001. *Agrobacterium* mediated transformation of 'Marsh' and 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) and 'Valencia' sweet orange [*C. sinensis* (L.)Osbeck] with the coat protein gene of Citrus Tristeza Closterovirus. *In: Proc. Interamerican Soc. for Tropical Hort.* Ledesma, N. and R. J. Campbell. eds. 44:107-110.
- Pérez-Molphe-Balch, E., and N. Ochoa-Alejo. 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. *Plant Cell Reports* 17:591-596.
- Picó, B., A. Sifres, and F. Nuez. 2005. Quantitative detection of cucumber vein yellowing virus in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 128:14-20.
- Ravelonandro, M., R. Scorza, A. Callahan, L. Levy, C. Jaquet, M. Monison, and V. Damsteegt. 2000. The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. *Virus Research* 71:63–69.

- Sambade, A., L. Rubio, S. M. Garnsey, N. Costa, G. W. Müller, M. Peyrou, 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* 51:257-263.
- Sanford, E. M., and S. A. Johnston. 1985. The concept of parasite derived resistance: deriving resistance from parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 115:395-405.
- Swillens, S., J. C. Goffard, Y. Maréchal, A. K. d'Exaerde, and H. Housni. 2004. Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucleic Acids Research* 32:53-59.
- Tennant, P., G. Fermin, M. M. Fitch, R. M. Manshardt, S. L. Slightom, and D. Gonsalves. 2001. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *European Journal of Plant Pathology* 107:645-653.
- Van Vuuren, S. P., R. P. Collins, and J. V. da Graca. 1993. Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 50:112-116.
- Waterhouse, P. M., M. B. Wang, and T. Lough. 2001. Gene silencing as an adaptative defence against viruses. *Nature* 411:834-842.
- Wong, M. L., and F. J. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85.

V. ADQUISICIÓN DE *CITRUS SUDDEN DEATH ASSOCIATED VIRUS* Y HAPLOTIPOS DE *CITRUS TRISTEZA VIRUS* POR *Toxoptera citricida* Y *Aphis spiraecola* Y SU RELACIÓN CON MUERTE SÚBITA

Emiliano Loeza-Kuk¹, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez¹, Gustavo Mora-Aguilera¹, Patricia Rivas-Valencia¹, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa², Waldir Cintra de Jesús Junior³, Ángel Villegas-Monter², Nelson Arno Wulff³ y Eugenio Perez-Molphe-Balch⁴.

RESUMEN

Con el fin de encontrar una relación entre la presencia del virus asociado a la muerte súbita de los cítricos (CSDaV) o en su defecto la prevalencia de un haplotipo de *Citrus Tristeza Virus* (CTV) en árboles con síntomas de muerte súbita (CSD), se analizaron muestras de áfidos colectados en 16 huertas comerciales de las regiones citrícolas de Sao Paulo y Minas Gerais, Brasil. Las huertas de Minas Gerais fueron seleccionadas por la presencia de árboles con síntomas de CSD, en las huertas de Sao Paulo el criterio fue por la presencia de variantes severas de CTV. Al analizar las muestras provenientes de las localidades de Comendador Gómez, Frutal, Prata y Uberlandia, Minas Gerais por RT-PCR/anidado se encontró frecuentemente a CSDaV; mientras que en ninguna muestra de Sao Paulo se obtuvo amplificación con los mismos iniciadores. Debido a que el propósito inicial fue encontrar una relación entre la presencia de una variante específica de CTV y la expresión de CSD, se utilizaron sondas específicas con secuencias asociadas a severidad. Sin embargo, no se alcanzó este objetivo por la baja concentración viral en las muestras. Como alternativa se optó por determinar las variantes de secuencia adquiridas por los

¹Programa de Fitopatología y ²Fruticultura Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México, C.P. 56230(loeza01@colpos.mx, ldaniel@colpos.mx). ³Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil. ⁴Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad 940, C.P. 20100 Ags., Ags. México. ⁵FUNDECITRUS A.C. CEP 14807-040, Araracuara, SP, Brasil.

áfidos por SSCP y en su caso para determinar si existía mayor predisposición para la adquisición de uno de los virus involucrados. En las muestras de áfidos no se detectaron variantes de secuencia que fueran exclusivos de árboles con síntomas de CSD como tampoco se pudo establecer una mayor frecuencia en la adquisición de alguno de los dos virus en particular. Se confirmó la presencia de CSDaV en áfidos colonizando árboles sintomáticos y asintomáticos a CSD.

ABSTRACT

Aphids collected in 16 commercial citrus orchards of the Sao Paulo and Minas Gerais States, Brazil citrus regions were analyzed. Orchards of Minas Gerais were selected due to the presence of trees with symptoms of citrus sudden death (CSD) and from Sao Paulo due the presence of severe variants of *Citrus Tristeza Virus* (CTV), in order to detect genomic sequences of any of these viruses that could be associated to CSD. In samples made up of 20 aphids from the localities of Comendador Gomes, Frutal, Prata and Uberlandia, in the State of Minas Gerais, CSDaV was often found through RT-PCR/Nested; while in samples from Sao Paulo, none showed positive for the same primers. With the aim of finding some relation between the presence of a specific variant of CTV and the expression of CSD, specific probes were used for sequences associated to severity of isolates. The results were not achieved and the most promising option was to detect CTV sequence variants acquired by aphids through SSCP, to determine if there was a preference for any of the viruses. No CTV sequence variants exclusive to trees with CSD symptoms were detected in aphids, and no prevalence for acquisition for any virus was established. However, results confirm the presence of CSDaV in aphids colonizing trees with or without CSD symptoms.

Key words: Aphid virus acquisition, *Citrus Tristeza Virus*, Citrus sudden death.

5.1. INTRODUCCIÓN

En 1999, una nueva enfermedad apareció en los campos cítricos brasileños, su principal sintomatología es el colapso acelerado de las plantas afectadas, debido a lo cual se le denominó como muerte súbita de los cítricos (CSD, por sus siglas en inglés). Con el objetivo de identificar al agente causal se han conducido varios experimentos, con los cuales se han descartado como agentes causales a hongos, viroides y bacterias endógenas; sin embargo, los resultados preliminares establecen que se transmite por injerto y es de tipo biótico (Román *et al.*, 2004).

Debido a que el comportamiento de CSD comparte varios aspectos en común con la tristeza de los cítricos tales como deterioro en el punto de unión del injerto, declinamiento rápido (asociado a ciertos aislamientos del *Citrus Tristeza Virus* (CTV) y distribución espacial (Bassanezi *et al.* 2003), se postuló que algún mutante o aislamiento nuevo del CTV pudo haber roto la protección obtenida con el uso de portainjertos tolerantes a CTV y la protección cruzada después de 30 años de uso extensivo (Müller y Costa 1977; Müller *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2004).

Como en otros virus con genoma de RNA, los tejidos infectados con CTV contienen una población de variantes genómicas. En los cítricos, al ser cultivos perennes esta acumulación es más evidente y se ha documentado ampliamente aún cuando los síntomas pueden permanecer enmascarados (Powell *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1993) y modifica la adquisición de este virus (Broadbent *et al.*, 1996).

El análisis espacial y temporal de los datos epidemiológicos de CSD indica que su dispersión puede estar asociada a un vector alado, probablemente un áfido (Bassanezi *et al.*, 2003). Esta característica reforzaría la hipótesis de que CSD está asociada a un mutante de CTV, pues existen indicios que entre aislamientos hay diferencias en la eficiencia de adquisición y transmisión de este virus por áfidos (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Brlansky *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005).

Una segunda hipótesis del agente causal de CSD establece que se debe a otro patógeno, pues hasta la fecha no se ha detectado algún aislamiento de CTV que esté directamente implicado en la enfermedad después del análisis molecular extensivo de muestras procedentes de diversas regiones (Targon *et al.*, 2003; Roman *et al.*, 2004). Esta hipótesis implica la presencia de un marafivirus asociado

con CSD, al cual de manera preliminar se le ha denominado Citrus sudden death-associated virus (CSDaV por sus siglas en inglés). Este virus ha sido encontrado consistentemente en muestras con muerte súbita y ausente en zonas sin la enfermedad (Macherroni *et al.*, 2005). Debido a la rápida dispersión de esta enfermedad (Bazanessi *et al.*, 2003; Roman *et al.*, 2004), debe precisar de un vector alado para su transmisión efectiva. Por sus altas poblaciones y distribución en las regiones citrícolas brasileñas, así como por su probada capacidad para la transmisión selectiva es probable que *T. citricida* esté involucrado en su dispersión, aunque no se descartan otras especies de áfidos.

El presente estudio trató de determinar si la estructura poblacional de haplotipos de CTV adquiridos por áfidos en zonas con CSD es diferente de la que se encuentra en regiones sin esta enfermedad, bajo la suposición de que la diversidad viral es más restrictiva en el vector; así como conocer si existe un cambio en la composición de variantes de secuencia inducido por la adquisición de CSDaV.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Las colectas se realizaron en septiembre y octubre del 2005, en áreas citrícolas de los estados de Minas Gerais y Sao Paulo, Brasil. Se muestrearon 17 sitios (cuadro 1), en donde se colectaron áfidos que estaban colonizando brotes de cítricos, los cuales se cortaron y sumergieron en alcohol al 70%. En varias huertas se estaban aplicado insecticidas para el control de diversos insectos plaga por lo que en estos casos no se encontraron colonias de áfidos establecidas dentro de la huerta y fue necesario capturar pulgones en huertas y áreas periféricas con poco manejo, pero también con problemas de CSD. Los áfidos se conservaron a 4°C en el alcohol hasta la extracción de RNA.

Extracción de RNA total

Se siguió el protocolo de Gibas-Mackenzie modificado por Freitas-Astúa, 2005¹, el cual consistió en tomar 20 áfidos adultos ápteros, se les retiró el alcohol y se maceraron en tubos eppendorf estériles que contenían 100 µL de buffer CTAB 2%.

¹EMBRAPA Researcher, Centro APTA Silvio Moreira-IAC, Sao Paulo, Brasil,(jfastua@cedntrodecitricultura.br).

Cuadro 1. Localidades y huertas muestreados para la colecta de áfidos en Brasil.
Octubre de 2005.

Ubicación	Huerta	Muestras colectadas
Con presencia de CSD		
	CG1	3
	CG2	8
	CG3	1
	FR1	19
	FR2	4
	FR3	2
	FR4	2
	FR5	3
	FR6	1
	PR1	11
	PR2	2
	PR3	1
Uberlandia (UB), MG (Figuras 2c y 2d)	UB1	12
Con aislamientos no severos de CTV		
Botucatu (BT), SP (Figura 2g)	BT	6
Con síntomas de aislamientos severos		
Capela do Alto (CA), SP (Figura 2i)	CA	6
Capao Bonito (CB),SP (Figura 2h)	CB	5

[†] SP: Sao Paulo, MG: Minas Gerais.

(NaCl 1.4M, Tris-HCl 0.1M pH 8.0) después de lo cual se mantuvieron en frío. Al término de la maceración se agregaron 500 µL de buffer CTAB 2% + 0.5% de β-mercaptoetanol preparado con agua DEPC, se mezclaron en vórtex y se incubaron en baño María a 55 °C por 20 minutos. Posteriormente se adicionaron 400 µL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se mezcló en vórtex y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se tomaron 400 µL de la fase acuosa y se transfirieron a un

tubo eppendorf estéril al cual se le agregaron nuevamente 400 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico.

Del sobrenadante se tomaron 400 μ L, se pasaron a un tubo eppendorf nuevo, se adicionaron 1/10 de volumen de acetato de amonio (40 μ L) y un volumen de isopropanol (400 μ L) y se precipitó a -20 °C por 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante con cuidado, se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70% preparado con agua DEPC y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Al término de la centrifugación se retiró el líquido de los tubos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secos los tubos, las pastillas se resuspendieron en 30 μ L de agua DEPC. La calidad y cantidad de RNA obtenido se corroboró en gel de agarosa al 1%.

RT-PCR y PCR anidada para detección de virus en áfidos

Para la detección de CTV y CSDaV en los pulgones, se realizó RT-PCR de un solo paso con los iniciadores CN119 y CN120 que flanquean el gen de la proteína p25 de la cápside del CTV (Cevik, 1995) así como los iniciadores CSDaVF de Alellix y CSDaVR de Fundecitrus (Cuadro 2) para la detección de CSDaV. La mezcla de reacción consistió de 50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4), 10mM DTT, 2.5 mM de MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 1 ng de cada iniciador, 50 U de MMLV (Promega) y 1.25 U de Taq pol (Invitrogen). De la mezcla de reacción se tomaron 20 μ L y se agregaron a 5 μ L de RNA total desnaturalizado a 70 °C por 5 minutos para tener un volumen final de 25 μ L. El programa para la RT-PCR fue el siguiente: 42°C por 60 min. seguido por una desnaturalización a 94 °C por 2 min. y 35 ciclos de amplificación consistentes en 94°C por 30 seg., 55 °C por 1min. y 72 °C por 1 min. seguida por una extensión final a 72°C por 5 min. para CTV.

En el caso de CSDaV se realizaron 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 55 °C por 1min. y 72 °C por 3 min. seguida por una extensión final a 72°C por 10 min. El producto de RT-PCR de ambas reacciones (p25 de CTV y RdRp CSDaV), se utilizó para realizar una segunda amplificación utilizando iniciadores internos para cada secuencia amplificada (CPK para CTV; C54 y C1 para variantes genómicas de CSDaV, ambas proporcionadas por T. Nagata) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Iniciadores específicos para detectar y discriminar variantes de *Citrus Tristeza Virus* (CTV) y citrus sudden disease associated virus (CSDaV) en *T. citricida* y *A. spiraecola*.

Iniciador	Secuencia (5' a 3')	Region	Lon [¶] (bp)
CN119-F [§]	AGATCTACCATGGACGACGAAACAAAG ^{§§}	CTV p25	703
CN120-R	GAATTCGCGGCCGCTCAACGTGTGTTAAATTTCC ^{¶¶}		
CPK-F	AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA	CTV p25	276
CPK-R	TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC		
CSDaV-F [¶]	ACCTTCCAGGAACCTTTAAGGTGGC	CSDaV-RdRp	2598
CSDaV-R	GTGAGGATGGGAGCAGAGGAAC		
C54-F [¶]	AACCTACCACCTGCCATCCTGA	RdRp-C54	366
C54-R	GCATTCGGTAAACAGCACAAAGG		
C1-F [¶]	CCGCTGTCACCATTGCTTCCAG	RdRp-C1	469
C1-R	AGATGGGATGTCCCGGTGAAGG		

[¶]Fragmento esperado (nt) de los productos de RT-PCR.

[§]Iniciadores complementarios a la cadena negativa (F) y complementarios a la cadena positiva (R).

[¶]Iniciadores usados para amplificar la region RdRp de CSDaV.

[¶]Iniciadores específicos para las variantes genómicas de CSDaV C54 y C1, se alinean internamente en los productos de PCR CSDaV-RdRp.

^{¶¶}EcoRI (GAATTC) y NotI (GCGGCCGC).

^{§§} BglII (AGATCT) y ACC (site NcoI: CC ATG GA).

La mezcla de reacción consistió en 50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM de MgCl₂, 100µM dNTPs, 100µM de cada iniciador y 0.6 U de Taq pol (Invitrogen). La PCR inició con una desnaturalización a 94 °C por 2 min. seguido por 35 ciclos de amplificación de 94°C por 30 seg. (Tm= 50 °C para CTV y C54, 55°C para C1) por 30 seg. y 72 °C por 30 seg., seguida por una extensión final a 72°C por 5 min.

El control negativo absoluto fue agua estéril y como control positivo se emplearon viriones purificados por gradientes provenientes de tejido de árboles infectados y sintomáticos a CSDaV y CTV proporcionados por el laboratorio de Fundecitrus.

Detección de variantes genómicas de CTV y CSDaV adquiridos por pulgones por conformación polimórfica de la cadena sencilla (SSCP)

La identificación de los patrones de SSCP fue realizada a partir del producto de PCR de acuerdo a metodología ya descrita (Sambade *et al.*, 2002). Los geles se tiñeron con nitrato de plata (Beidler *et al.*, 1982).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se colectaron 86 muestras de pulgones en 16 huertas. Las especies más abundantes fueron: *Toxoptera citricida* (65%) y *Aphis spiraecola* (34%). Debido al control de plagas aplicado, en varias huertas no se encontraron áfidos, por lo que fue necesario colectar en la periferia y en áreas con poco manejo.

Cuadro 3: Detección de *Citrus Tristeza Virus* (CTV) y citrus sudden disease associated virus (CSDaV) en muestras de *T. citricida* y *A. spiraecola* colectados en regiones con muerte súbita de los cítricos (CSD) de Minas Gerais y sin CSD de Sao Paulo (Capela do Alto, Capao Bonito y Botucatu), Brasil, 2005.

	<i>Toxoptera citricida</i>		<i>Aphis spiraecola</i>	
	CTV	CSDaV [§]	CTV	CSDaV [§]
Minas Gerais [¶]	44/44	23/44	23/25	3/25
Capao Bonito, SP	- [¶]	-	4/5	0/5
Capela do Alto, SP	5/6	0/6	-	-
Botucatu, SP	6/6	0/6	-	-
Total [¶]	55/56	23/56	27/30	3/30
Porcentaje	98%	48%	90%	10%

[¶] Minas Gerais (CSD presente) representa datos de 12 huertas.

[§] Variante de CSDaV C54.

[¶] X/Y (X=muestras positivas, Y= muestras analizadas).

[¶] Especie no encontrada durante el muestreo.

Los intentos para detectar a CTV por RT-PCR en pulgones fueron negativos debido posiblemente a la baja concentración de partículas virales, por ello se optó realizar RT-PCR anidada usando a CN119 y CN120 como iniciadores externos

(Cevik, 1995) y CPK como iniciadores internos (Kong *et al.*, 2001). Con esta adaptación, 55/56 muestras de *T. citricida* y 27/30 de *A. spiraecola* resultaron positivas a CTV (Cuadro 3).

En el caso de CSDaV, se usaron los iniciadores para intentar detectar en áfidos las variantes C54 y C1 reportadas a la fecha, encontrándose de manera consistente a la variante C54 en las huertas de Minas Gerais. Este producto de amplificación fue secuenciado y comparado con las secuencias del Genbank, en donde coincidió con las secuencias de citrus sudden death-asociated virus, citrus sudden death-asociated virus strain P15, accesiones AY884005.1 y DQ185573.1 respectivamente, lo cual confirmó que la banda obtenida fue del tamaño esperado y complementario a la región genómica objetivo.

Discriminación de variantes de CTV presentes en áfidos

La propuesta original en este apartado fue el uso de sondas marcadas en el extremo 3' con digoxigenina. Sin embargo, aún cuando se usó la sonda "0", que detecta todas las variantes de CTV (Cevik, 1995), mismas que fueron usadas exitosamente en muestras de plantas en Florida (Halbert *et al.*, 2004) únicamente detectó al CTV en RNA extraído de planta. Estos resultados indican que la sensibilidad de la técnica es insuficiente para detectar al CTV en áfidos.

Debido a lo anterior, se analizó por SSCP la variación de los haplotipos de CTV adquiridos por los pulgones colectados. Se consideró que cada banda obtenida corresponde a una cadena del DNA duplex del fragmento del gen p25 de la capa proteica. El análisis SSCP en las muestras de áfidos no permitió detectar un patrón específico que indicara una diferencia en la capacidad de adquisición de las variantes genómicas. Sin embargo, parece colocar al mismo nivel la capacidad de adquisición a *T. citricida* y *A. spiraecola* (Cuadros 4 y 5), aún cuando existe evidencia de lo contrario (Yokomi *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2005). Por otro lado, se detectó que *T. citricida* tuvo mayor capacidad para adquirir a CSDaV que *A. spiraecola* cuando CTV estuvo presente.

Cuadro 4. Variantes de secuencia de *Citrus Tristeza Virus* (CTV) y presencia de citrus sudden disease associated virus (CSDaV) en *T. citricida* colectado en huertas con síntomas de muerte súbita en Minas Gerais, Brasil, 2005.

	Huertas									
	FR1 [¶]		UB1		FR5		FR2		FR4	
	CTV	CSDaV [§]	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV
1	4	+	2a [¶]	-	3	+	2	+	1	+
2	-	-	2	-	2+1 [¶]	+	2	+	3	+
3	3	-	2	-	3+1	+				
4	3	+	2a	-						
5	2a	+	2a	-						
6	2a	+	3b	+						
7	2a	-	3b	-						
8	2	+	2	-						
9	2	+	3	-						
10	2a	+	2+1	-						
11	3	-								
12	2a	+								
13	3b	+								
14	2	-								
15	3b	+								

[¶] Para ubicación específica de las huertas (Cuadro 1).

[§] Variante genómica de C54 CSDaV

[¶] Haplotipos similares en muestras de la misma huerta.

[¶] Presencia de dos conformaciones estables de una de las cadenas de DNA.

Cuadro 5. Variantes de secuencia de *Citrus Tristeza Virus* (CTV) y presencia de citrus sudden disease associated virus (CSDaV) en *A. spiraecola* colectado en huertas con síntomas de muerte súbita en Minas Gerais, Brasil, 2005.

	Huertas							
	PR1 [¶]		CG2		FR2		FR3	
	CTV	CSDaV [§]	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV
1	3	-	2a [¶]	-	3	-	3	-
2	4C	+	-	-	-	+	2+1 [▫]	-
3	4C	+	3	-	2+1	+	1	-
4	3+1	-	3	-				
5	2+1	-	3	-				
6	2+1	-	2a	+				
7	3	-						
8	4	-						
9	2+1	-						
10	2	-						
11	2	-						

[¶] Para ubicación específica de las huertas ver cuadro 1.

[§] Variante genómica de C54 CSDaV

[¶] Haplotipos similares en muestras de la misma huerta.

[▫] Presencia de dos conformaciones estables de una de las cadenas de DNA.

Las tasas de adquisición de CSDaV fueron 48 y 88% menos efectivos en *T. citricida* y *A. spiraecola* respectivamente que los observados para CTV (Cuadro 3), lo que indica que CTV puede ser mas abundante y adquirido con mayor eficiencia. En

el caso de *A. spiraecola* la adquisición puede ser pasiva y con baja eficiencia en el campo.

El análisis puntual de ciertas muestras parece reforzar la hipótesis de CSDaV como causante de CSD. En ese sentido, las muestras 11 y 12 de la figura 1, ambas positivas a CSDaV, provienen de una huerta con CSD subinjertada con *Citrus reshni* (Hort.) sin mostrar remisión de síntomas. Mientras que las muestras de *T. citricida*, 1, 3 y 4, todas positivas a CSDaV, son de una huerta con todos los árboles sintomáticos a CSD (Figura 2f). Un caso interesante aparece en la muestra 8 positiva a CSDaV, fue colectada en una huerta con menos de un año de establecimiento.

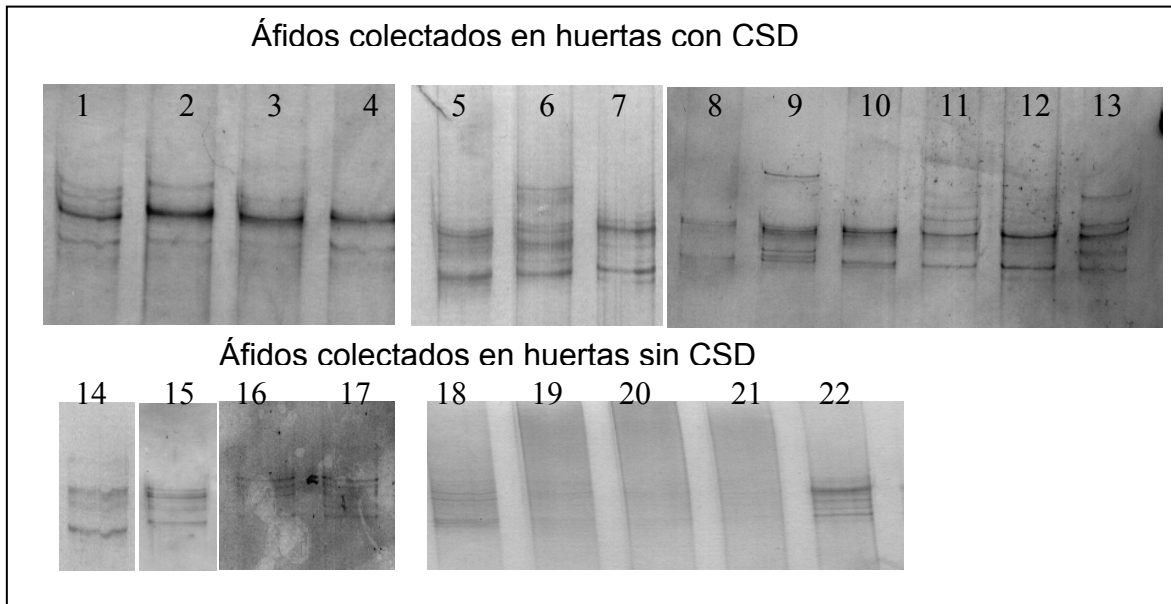


Figura 1. Perfiles de SSCP para una porción del gen p25 de CTV (CPK) presentes en áfidos. Carriles 1 a 7 son *T. citricida*; 8 a 13 son *Aphis spiraecola* de huertas con CSD. 14 y 15 son *Aphis spiraecola*, 16 a 22 son *T. citricida* provenientes de huertas sin CSD.

Tampoco se encontró una tendencia en los perfiles en función a la severidad de CSD, en la huerta de Uberlândia, donde previamente se realizó una clasificación de



Figura 2: Síntomas de CSD en hojas (a), corteza (b) y árbol (c); árbol sin CSD (d); árbol con síntomas del nivel dos de CSD (e), huerta en Minas Gerais (f), Botucatu (g), Capao Bonito (h) y Capela do Alto (i).

los árboles en función de la severidad de CSD por personal de Fundecitrus de acuerdo a los criterios descritos en Roman *et al.*, 2004, una muestra colectada de un árbol con severidad 1 (síntomas incipientes de CSD como pérdida de turgencia y brillo en las hojas) tuvo dos variantes de secuencia (Vs) de CTV, mientras que una muestra con severidad 2 dos mostró tres (Figura 2e), otras muestras con la misma severidad mostraron dos Vs, otras dos aparentemente sanas tuvieron una sola Vs.

Sin embargo, la presencia de este virus en su posible vector aporta mas elementos para el entendimiento del comportamiento de la enfermedad y reduce la posibilidad de que el causante de CSD sea debido a un aislamiento mutante de CTV. Por el otro lado, la homogeneidad de los haplotipos de CSDaV, aún entre muestras de huertas diferentes, puede sugerir el reciente surgimiento de este virus.

Si el agente causal de CSD es transmitido por un áfido o un vector alado como lo sugieren los antecedentes epidemiológicos (Bazanessi *et al.*, 2003; Roman *et al.*, 2004), entonces el vector como sistema debe ser explotado para confirmar la etiología de esta enfermedad.

Por el contrario, para confirmar la hipótesis de un aislamiento mutante de CTV como el causante de CSD, es necesario efectuar más estudios en donde los perfiles de CTV sean analizados de manera simultánea en áfidos y en los brotes donde éstos sean colectados por la distribución heterogénea del virus. En este estudio, solo se emplearon 11 primers y sondas para la región de p25. Probablemente otras regiones genómicas pudieran proveer más resultados, por lo que se deberían realizar más experimentos con otras herramientas moleculares, la complejidad de haplotipos de CTV en el vector fue menor que la encontrada en el hospedante lo que confirma nuestra hipótesis inicial en este estudio.

5.4. CONCLUSIONES

Se detectó Citrus Sudden Death associated Virus tanto en áfidos como en las muestras de árboles colectados en regiones citrícolas con la presencia de muerte súbita, mientras que muestras colectadas de huertas fuera de la región con muerte súbita fueron negativas a este virus. El análisis por SSCP de las variantes de

secuencia del *Citrus Tristeza Virus* presente en áfidos, no mostró una relación clara entre los patrones de árboles sintomáticos y asintomáticos a muerte súbita.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal de FUNDECITRUS por el apoyo técnico y logístico, así como a Juliana Freitas-Astúa por el procedimiento para el aislamiento de RNA.

5.5. LITERATURA CITADA

- 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.
- Bassanezi, R. B., A. Bergamin-Filho, L. Amorim, N. Gimenez-Fernández, 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, J. L., P. R. Hilliard, and R. L. Rill. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acid with silver. *Analytical biochemistry* 126:374-380.
- Brlansky, R. H., V. D. Damsteeggt, D. S. Howd, and A. Roy. 2003. Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Disease* 87:397-401.
- Broadbent, P., R. H. Brlansky, and J. Indsto. 1996. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80:329-333.
- Cevik, B. 1995. Detection and characterization of strains of citrus tristeza virus using the coat protein gene sequences. *Phytopathology* 86:s101.
- Halbert, S. E., H. Genc, B. Cevik, L. G. Brown, I. M. Rosales, K. L. Manjunath, M. Pomerinke, D. A. Davidson, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 2004. Distribution and characterization of citrus tristeza virus in south Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 88:935-941.

- Huang, Z., P. A. Rundell, X. Guan, and C. A. Powell. 2005. Evaluation of the transmission of different field sources of citrus tristeza virus and the separation of different genotypes by single brown citrus aphids. *Hortscience* 40:687-690.
- 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.
- Machado, M. A., M. L. P. N. Targón, H. D. Coletta-Filho, e G. W. Müller. 2004. Morte súbita dos citrus. *Laranja* 25:69-79.
- Macherroni, W., M. C. Alegria, C. C. Greggio, J. P. Piazza, R. F. Kamla, P. R. A. Zacharias, M. Bar-Joseph, E. W. Kitajima, L. C. Assumpsao, G. Camarote, J. Cardozo, E. C. Casagrande, F. Ferrari, S. F. Franco, P. F. Giacheto, A. Girasol, H. Jr. Jordao, V. H. A. Silva, L. C. A. Souza, C. I. Aguilar-Vildoso, A. S. Zanca, P. Arruda, J. P. Kitajima, F. C. Reinach, J. A. Ferro, and A. C. R. da Silva. 2005. Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae Family) associated with citrus sudden death disease. *Journal of Virology* 79:3028–3037.
- Moreno, P., J. Guerri, J. F. Ballester-Olmos, R. Albiach, and M. E. Martínez. 1993. Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42:35-41.
- Müller, G. W., and A. S. Costa. 1977. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proceedings of the International Society of Citriculturist* 3:868-872.
- Müller G. W., M. L. P. N. Targón, e M. A. Machado. 1999. Trinta anos do uso do clone pré-imunizado 'Pera IAC' na citricultura paulista. *Laranja* 20:385-398.
- Powell, C. A., R. R. Pelosi, and M. Cohen. 1992. Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus. *Plant Disease* 76:141-144.
- Roman M. P., M. Cambra, J. Juárez, P. Moreno, N. Duran-Vila, F. A. O. Tanaka, E. Alves, E. W. Kitajima, P. T. Yamamoto, R. B. Bassanezi, D. C. Teixeira, W. C. Jesus J., A. J. Ayres, N. Gimenez-Fernandes, F. Rabestein, L. F. Giroto, and

- J. M. Bove. 2004. Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. *Plant Disease* 88:453-467.
- Sambade, A., L. Rubio, S. M. Garnsey, N. Costa, G. W. Müller, M. Peyrou, 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* 51:257-263.
- Stoetzel, M. B. 1994. Aphids (homoptera:aphididae) of potential importance on citrus in the United States with illustrated keys to species. *Proceedings of entomological society of Washington* 96:74-90.
- Targon, M. P. N., G. Astúa-Monge, L. Kishi, J. Freitas-Astúa, A. A. Souza, F. A. Santos, G. W. Muller e M. A. Machado. 2003. Avaliação de haplotipos do CTV em plantas com sintomas de morte subita dos citros por SSCP e seqüenciamento dos genes da p20 e p23. *Summa Phytopatologica* 29:71-72.
- Yokomi, R. K., R. Lastra, M. R. Stoetzel, V. D. Damsteegt, R. F. Lee, S. M. Garnsey, T. R. Gottwald, M. A. Rocha-Peña and C. L. Niblett. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera:Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *Journal of Economic Entomology* 87:1078-1085.

VI. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

- Los aislamientos del *Citrus Tristeza Virus* encontrados en huertas de Tamaulipas, Veracruz y Yucatán presentaron baja variabilidad entre ellos al ser analizados por SSCP. Prácticamente todos fueron caracterizados como no severos y presentaron baja tasa de transmisión por *Aphis gossypii* en invernadero.
- La presencia de *T. citricida* en la huerta de Yucatán después de cinco años de infestar árboles en la región aún no provoca una selección o aumento en la frecuencia de aislamientos severos.
- La presencia de *T. citricida* en la huerta de Yucatán ha provocado una mayor incidencia de positivos comparado con las huertas de Tamaulipas en donde este vector está ausente.
- La distribución espacial de los nuevos positivos en ambos estados, generalmente fue en la vecindad de un positivo detectado en el muestreo anterior, aun cuando los vectores involucrados en cada caso fueron distintos.
- En el ensayo de inoculación practicado y con vectores diferentes a las plantas genéticamente modificadas, las plantas de pomelo transgénicos mostraron una menor concentración de cadenas de CTV que aquellas sin modificar, lo cual sugiere la existencia de algún tipo de mecanismo que interfiere en la replicación normal del virus. Por lo cual, en estudios sucesivos será necesario emplear herramientas como el estudio de la metilación de DNA o transferencia Northern antes y después de la inoculación.
- No se detectó efecto en la concentración de cadenas del virus entre los portainjertos *C. aurantium* y *C. volkameriana*.
- La especie *Aphis gossypii* usada para inocular a las plantas transformadas y no transformadas no fue eficiente en la transmisión, comparada con la inoculación por injerto. Es deseable generar una alternativa para inocular mecánicamente de una manera eficiente y susceptible a ser estandarizada a diferentes cargas virales, algo que con inoculación por áfido es difícil de lograr al intervenir varios factores inherentes al sistema.

- En nuestras condiciones la cuantificación de la concentración de virus por PCR en Tiempo Real con SYBRgreen funcionó correctamente a concentraciones mayores de 10^4 , por debajo de este umbral los resultados no fueron confiables ni reproducibles y no fue útil para el estudio en el vector.
- El análisis de los patrones de SSCP para los aislamientos de CTV, no reveló suficiente información para establecer una relación entre la presencia de un aislamiento mutante y el desarrollo de muerte súbita.
- Se detectó al marafivirus asociado a muerte súbita de los cítricos (CSDaV) principalmente en muestras de *T. citricida*, y *Aphis spiraecola* provenientes de huertas con presencia de CSD.
- Los componentes involucrados en la muerte súbita de los cítricos, hacen extremadamente difícil separar en el tiempo y espacio a los virus que infectan a los árboles provenientes de campo. Para tal fin, es necesario encontrar una especie vegetal que permita la inoculación por áfidos alimentados sobre plantas sintomáticas pero que solo permita la multiplicación del Marafivirus.
- Es posible que el Marafivirus únicamente haya adquirido la habilidad de utilizar los componentes del CTV para su transmisión, por lo que puede haber permanecido oculto por varios años. En México, sería conveniente realizar una exploración y caracterización fitosanitaria enfocada a este virus, para corroborar la ausencia de estas secuencias virales en la superficie citrícola nacional.